

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica e Imunologia

O uso da Microcalorimetria de Titulação Isotérmica na avaliação do metabolismo celular de ilhotas de Langerhans de ratos Wistar

Janete Maria da Silva Alves
Tese de Doutorado

Orientadores:

Prof. Dr. Marcelo Matos Santoro

Professor Adjunto do Departamento de Bioquímica e Imunologia - ICB - UFMG

Prof. Dr. Marcos Luiz dos Mares Guia (*in memoriam*)

Professor Emérito do Departamento de Bioquímica e Imunologia - ICB - UFMG

Pesquisador do Diabetes Research Institute - University of Miami School of Medicine

Co-orientadora:

Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar

Professora Titular do Departamento de Bioquímica - IQ - USP

Belo Horizonte

22 de Janeiro de 2007

JANETE MARIA DA SILVA ALVES

**O USO DA MICROCALORIMETRIA DE TITULAÇÃO
ISOTÉRMICA NA AVALIAÇÃO DO METABOLISMO
CELULAR DE ILHOTAS DE LANGERHANS
DE RATOS WISTAR**

**Tese apresentada à Universidade Federal de
Minas Gerais como requisito para obtenção do
grau de Doutor em Bioquímica.**

**Orientadores: Prof. Dr. Marcelo Matos Santoro
Prof. Dr. Marcos Luiz dos Mares Guia**

**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Belo Horizonte - Janeiro de 2007**

Em memória do inesquecível professor
Marcos Luiz dos Mares Guia

Agradecimentos

Ao professor Marcos Luiz dos Mares Guia (*in memoriam*), pela acolhida, pela amizade e pela eloquência em contagiar a todos com suas idéias. Pelo seu refinado senso de humor que, aliado à sua simplicidade e competência, me instigou a percorrer os caminhos da ciência.

Ao professor Marcelo Matos Santoro, pela amizade, pela orientação, pelos ensinamentos, pelo exemplo de ética no fazer científico, pela generosidade e confiança.

À professora Mari Cleide Sogayar, pela amizade, sensibilidade e carinho. Pela incansável disposição em contribuir com o trabalho em diversos âmbitos, por sua competência, pelo seu profissionalismo e compromisso com a Tese.

À professora Maria Norma Melo, pela amizade, carinho e por sua valiosa colaboração nos experimentos utilizando *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

Ao professor Cândido Celso Coimbra, do Laboratório de Endocrinologia do Departamento de Fisiologia e Biofísica - ICB - UFMG, por permitir que as dosagens de insulina e lactato fossem realizadas em seu laboratório. E por estar sempre disposto a contribuir e a ensinar.

Ao professor Antônio Carlos Boschero, do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da Unicamp, por me receber em seu laboratório para o treinamento no isolamento de ilhotas de Langerhans de ratos.

Aos professores Alfredo Miranda de Góes e Kenneth John Gollob, ambos do Departamento de Bioquímica e Imunologia - ICB - UFMG, por permitirem a utilização de seus laboratórios durante a purificação e o cultivo de ilhotas de Langerhans.

À professora Iolanda Midea Cuccovia, do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP, por permitir a utilização do microcalorímetro de titulação isotérmica nos experimentos preliminares com as ilhotas humanas.

Aos funcionários Soraia de Oliveira Silva, pela ajuda na obtenção e no cultivo das promastigotas das Leishmanias, e André Luis Pimenta de Faria, pela assistência nas determinações da insulina e do lactato, muitíssimo obrigada!

Aos estudantes de iniciação científica: Ellen, Matheus, Letúzia e, de forma especial, Cris, Priscilla e Simara, que participaram de grande parte da execução da Tese contribuindo, de maneira exemplar, para a realização do trabalho, os meus mais sinceros agradecimentos!

Ao Jamil e à Jacque, amigos tão queridos, pelo apoio irrestrito, incentivo e pela ajuda incomensurável ao longo de todos esses anos, meu muito obrigada e o que seria do nosso trabalho se não fosse pelo profissionalismo de pessoas como vocês!

Aos meus “grandes amigos”, Malu, Waldney, Helen e Ivana que, mesmo de longe, sempre me apoiaram e me incentivaram a vencer esse desafio. MUITÍSSIMO obrigada pela força, pela paciência, pelo bom humor e muito carinho.

Ao Thiago, pela amizade, incentivo e apoio. Pelas nossas longas e frutíferas discussões pelo “Skype” e, sobretudo, por sua valiosa e irrestrita participação e colaboração desde a concepção desta pesquisa. Meu muito obrigada!

Aos colegas do Laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas Professor Marcos Luiz dos Mares Guia - pela amizade, agradável convivência, colaboração e apoio mútuo: Luciana e Agenor, Wanderley, Marcos Aurélio, Kádima, Marco Antônio André, Daniel, Thais, Carlos Henrique, Clara, Alexandre, Poliana, Rodrigo, Cecília, Cristina e sem me esquecer é claro do meu “ex-amigo” e companheiro de ITC, Márcio Tadeu.

À Carolzinha, Gisella e Daniel pela receptividade e pelo apoio na execução e documentação das diversas etapas do processo de isolamento e purificação das ilhotas de Langerhans de ratos. À Renata, Fernando, Miguel, Letícia, Patrícia, Zizi, Débora, Ricardo, Sandra e D^a Helena, pelas calorosas acolhidas na Unidade de Ilhotas Pancreáticas Humanas (LBCM) do Departamento de Bioquímica - IQ - USP.

Aos professores Leonides Rezende Júnior, Maria Elena de Lima Perez Garcia, Marcelo Porto Bemquerer, Míriam Martins Chaves, Carlos Alberto Tavares, Nelder de Figueiredo Gontijo, Mônica Alves Diniz Ferreira, Sílvia Passos Andrade, André Ricardo Massensini, Hélio Chiarini Garcia, Elizabeth Ribeiro da Silva, Regina Maria Nardi Drummond, Anna Carla Goldberg, Ângelo Rafael Carpinelli, Rui Curi,

Flávio Maximiano e Anderson Medeiros dos Santos que contribuíram, de fato ou informalmente, em diferentes etapas da Tese.

Ao professor Ronaldo Reis Júnior pelo comprometimento em colaborar e realizar as análises estatísticas utilizando o programa R.

Ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, na pessoa da professora Andréa Mara Macedo, pela dedicação e pelo profissionalismo com que conduz o programa de pós-graduação. A todos os professores que contribuíram para a minha formação. Aos funcionários e colegas, com quem tive o prazer de conviver durante a pós-graduação.

A CAPES e PADCT III pelo suporte financeiro que viabilizou a realização desse trabalho.

À Celise pelo carinho e dedicação.

Aos funcionários Goreth, Narciso, Julinho, Elimar e Rosane que sempre estiveram dispostos a colaborar na esterilização dos materiais a serem utilizados nos experimentos.

Aos professores Itagiba de Castro Filho, Maria Auxiliadora Amaral S. Gomes, Frederico de Siqueira Neves, Maria Aparecida de Queiroga Milagres Vieira, Marcelo Maia Ruas, Lucília Silva Gontijo, Ângela Madureira, Alfredo Maurício Batista de Paula, Cristina Andrade Sampaio, Fabiana Andrade, Eliete Fernandes Flávio, Karine Santos e Vera Lúcia Trabbold da Faculdade de Saúde Ibituruna de Montes Claros, pela colaboração, apoio e torcida.

Aos amigos de sempre Betânia, Maria Emília, Neila, Lemuel, Nanda, Marina, Magoo, Mariana, Bianca, Zabelê, Xu e tantos outros queridos amigos da Biologia e aos “amigos dos amigos” da Biologia, pelo apoio e, principalmente, pelos inestimáveis momentos de lazer e pura descontração!

Aos meus queridos pais Inês e Amaury, exemplos máximos de amor, dedicação, apoio, generosidade e compreensão. Por todo esforço e abdição devotados à minha formação. Às minhas queridas irmãs Juninha e Jacqueline e aos meus sobrinhos prediletos Víctor e Mônica. Ao Reinaldo, Oswaldo, Maria Célia e Sr.

Aluizio, Marli, Sandra, Eliene, a meus grandes amigos e a todas as pessoas que, mesmo à distância, fazem parte dessa conquista!

Ao Henrique, meu Lindinho, que sempre incentivou, de forma peculiar, toda essa trajetória. Pelos questionamentos inexoráveis e obstinados, pela objetividade e pelo exercício de paciência. Enfim, por ter partilhado as alegrias e as dificuldades, com amor, companheirismo e generosidade.

Resumo	iii
Abstract	iv
Lista de Abreviaturas	v
Lista de Ilustrações	vii
1) Introdução	1
1.1) Microcalorimetria de Titulação Isotérmica	1
1.2) Diabetes mellitus	4
1.3) O Pâncreas	6
1.4) Insulina	7
1.5) O transplante de ilhotas de Langerhans	9
2) Objetivos	15
2.1) Objetivo Geral	15
2.2) Objetivos Específicos	15
3) Materiais e Métodos	16
3.1) Microcalorimetria de Titulação Isotérmica	16
3.2) Microcalorimetria de Titulação Isotérmica (ITC) de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	17
3.3) Microcalorimetria de Titulação Isotérmica (ITC) de ilhotas murinas	19
3.3.1) Obtenção e isolamento das ilhotas	19
3.3.2) Purificação das ilhotas em gradiente de Ficoll	20
3.3.3) Viabilidade das ilhotas	21
3.3.4) Preparo da suspensão de ilhotas a ser avaliada no ITC	22
3.4) Protocolo experimental para avaliação das ilhotas no ITC	22
3.4.1) Ensaio na presença de glicose 2,8 mmol.L ⁻¹	22
3.4.2) Ensaio na presença de glicose 16,3 mmol.L ⁻¹	23
3.5) Determinação de insulina e lactato	23
3.6) Base de cálculos para interpretação dos resultados de microcalorimetria	24
3.7) Análises estatísticas	24
4) Resultados e Discussão	26
4.1) Calibração Elétrica	26
4.2) Calor de diluição do Metanol	27
4.3) Calibração Química	28

4.4) Calibração Biológica do ITC	29
4.5) Isolamento e purificação de ilhotas de Langerhans	34
4.6) Calor de diluição da Glicose	37
4.6.1) Glicose 2,8 mmol.L ⁻¹	37
4.6.2) Glicose 16,3 mmol.L ⁻¹	38
4.7) Termogramas obtidos nos ensaios com ilhotas estimuladas com glicose	39
4.8) Calor metabólico das ilhotas de Langerhans estimuladas com glicose nas concentrações de 2,8 e 16,3 mmol.L ⁻¹	43
4.9) Produção de Lactato pelas ilhotas estimuladas com glicose nas concentrações finais de 2,8 e 16,3 mmol.L ⁻¹	46
4.10) Secreção de insulina e sua relação com o calor metabólico	49
4.11) Avaliação da viabilidade de ilhotas de Langerhans	52
5) Conclusões	55
6) Perspectivas	56
7) Apêndice	56
7.1) Apêndice 1 - Artigos publicados	58
8) Anexos	86
8.1) Anexo 1 - Resultados preliminares com ilhotas humanas	86
9) Referências Bibliográficas	89

Resumo

A calorimetria consiste na medida do calor (potência, q , em Watt) liberado ou absorvido a temperatura constante em função do tempo (t) (calorimetria isotérmica) ou em função da variação da temperatura (T) (calorimetria de varredura) em um dado fenômeno biológico, e a microcalorimetria é simplesmente a medida deste calor na escala de micro-Watt (microJ/s). A microcalorimetria biológica, por ser uma técnica não específica e não destrutiva, permite que o sistema a ser analisado seja uma solução de compostos bioquímicos ou uma suspensão de células ou de microrganismos. Diante da escassez de dados utilizando a Microcalorimetria de Titulação Isotérmica (ITC) para avaliar o metabolismo celular, aliada à experiência prévia na utilização do Microcalorímetro de Condução nos estudos do metabolismo de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, no presente trabalho utilizou-se a ITC para avaliar o estado funcional de dois tipos celulares distintos: promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e ilhotas de Langerhans. Pela microcalorimetria de titulação isotérmica, o fluxo de calor metabólico liberado por promastigota de *Leishmania* incubada com frutose na concentração de $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ foi 204 pW, tendo sido previamente avaliado pela microcalorimetria de condução como sendo 105 pW, nas mesmas condições experimentais. Sugere-se que a maior sensibilidade do ITC e a própria variação biológica das amostras possam explicar a diferença encontrada entre os valores de fluxo de calor utilizando os dois tipos de microcalorímetros. Esse resultado permitiu validar o uso do ITC para avaliação do metabolismo celular de outros tipos celulares. Visando utilizar esta técnica (ITC) na avaliação da viabilidade das ilhotas de Langerhans para transplantes, foi proposto avaliar microcalorimetricamente os efeitos da glicose sobre ilhotas de Langerhans de ratos. Nesses ensaios ficou evidente o aumento significativo do calor metabólico produzido pelas ilhotas submetidas às concentrações de 2,8 e $16,3 \text{ mmol.L}^{-1}$ de glicose. Adicionalmente, determinou-se a quantidade de insulina secretada e concentração de lactato nas amostras de ilhotas incubadas nessas concentrações de glicose; as razões dos valores (para alta/baixa glicose) de insulina secretada, calor liberado e concentração de lactato obtidas foram significativamente maiores que a unidade. O índice (ou razão) de lactato mostrou um valor ($2,91 \pm 0,50$) que pode sugerir uma menor utilização da glicose por vias oxidativas aeróbicas e uma maior utilização da via glicolítica quando as ilhotas são submetidas à alta concentração de glicose nas condições testadas. Para a insulina secretada a razão foi $1,67 \pm 0,30$, a despeito das médias globais dos valores para alta e baixa concentração de glicose serem estatisticamente semelhantes para este parâmetro. O valor da razão para calor liberado ($1,72 \pm 0,13$) foi similar ao valor da razão para insulina liberada, o que levanta a importante possibilidade do índice (ou razão) do calor liberado substituir o índice (ou razão) de insulina secretada na avaliação da viabilidade das ilhotas de Langerhans para transplantes, com várias possíveis vantagens práticas em relação aos métodos correntemente utilizados. Por meio desses estudos foi possível demonstrar a viabilidade do uso do ITC para a avaliação do metabolismo celular de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* e de ilhotas pancreáticas de ratos, podendo ser esta técnica adaptada para o estudo da viabilidade metabólica de outros tipos celulares.

Abstract

Calorimetry consists of the measure of the heat (potency, q , in W) released or absorbed at constant temperature as a function of the time (t) (isothermal calorimetry) or as a function of the variation of the temperature (T) (scanning calorimetry) in a given biological phenomenon, and microcalorimetry is simply the measure of this heat in the micro-watt scale (microJ/s). The biological microcalorimetry, being a non specific and non destructive technique, allows the sample or system to be analyzed by a solution of biochemical compounds or a suspension of cells or microorganisms. Due to the shortage of data using Isothermal Titration Calorimetry (ITC) to evaluate the cellular metabolism, allied to the previous experience in the use of Heat Conduction Microcalorimetry (HCM) in the studies of the metabolism of promastigotes of *Leishmania (L.) amazonensis*, in the present work ITC was used to evaluate the functional state of two different cellular types: promastigotes of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and rat Langerhans islets. Using ITC, the flow of metabolic heat liberated by promastigotes of *Leishmania* incubated with fructose in the concentration of 2.5 mmol.L^{-1} was evaluated as 204 pW, having been previously evaluated by HCM as being 105 pW, in the same experimental conditions. It was suggested that the largest sensibility of ITC and the biological variation of the samples can explain the difference found among the values of heat released using the two types of microcalorimeters. This result allowed us to validate the use of ITC for evaluation of the cellular metabolism of other cellular types. Seeking to use this technique (ITC) in the evaluation of the viability of the islets of Langerhans for transplants, it was intended to evaluate microcalorimetrically the effects of the glucose on mice Langerhans islets. In those experiments it was evident a significant increase of the metabolic heat produced by the islets samples submitted to two consecutive concentrations of 2.8 and 16.3 mmol.L^{-1} of glucose. Additionally, it was determined the amount of secreted insulin and lactate concentration in the islets samples incubated in these glucose concentrations; the ratios of the values (for high/low glucose) of secreted insulin, released heat and concentration of lactate were significantly larger than the unit. The index (or ratio) of lactate showed a value (2.91 ± 0.50) that can suggest a smaller aerobic use of glucose and a larger use of glycolysis when the islets were submitted to the high glucose concentration in the tested conditions. For the secreted insulin the ratio was 1.67 ± 0.30 , in spite of the global averages values for high and low glucose concentrations are statistically similar for this parameter. The value of the ratio for released heat (1.72 ± 0.13) was similar to the value of the ratio for secreted insulin, and that raises the important possibility of the index (or ratio) of the released heat to substitute the index (or ratio) of secreted insulin in the evaluation of the viability of the islets of Langerhans for transplants, with several possible practical advantages in relation to the methods used currently. In short, by those studies it was possible to demonstrate the viability of the use of Isothermal Titration Calorimetry (ITC) for the evaluation of the cellular metabolism of promastigotes of *Leishmania (L.) amazonensis* and of rat Langerhans islets; this technique can be adapted for the study of the metabolic viability of other cellular types.

Lista de Abreviaturas

α - Alfa

β - Beta

ADP - Difosfato de adenosina

AMP - Monofosfato de adenosina

ATP - Trifosfato de adenosina

BSA - Albumina sérica bovina

[Ca²⁺]_i - Concentração de cálcio intracelular

CaCl₂ - Cloreto de cálcio

Cal - Caloria

CO₂ - Dióxido de carbono

δ - Delta

DAG - Diacilglicerol

Ditizona - Difeniltiocarbazona

DP - Energia diferencial

ELISA - Ensaio enzimático de imuno-adsorção

FADH₂ - Flavina adenina dinucleotídeo reduzido

GSIS - Secreção de insulina estimulada pela glicose

GLUT-2 - Receptor de glicose tipo 2

HBSS - Solução salina balanceada de Hank's

HCl - Ácido clorídrico

HEPES - Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico

HF - Fluxo de calor

IBMX - 3-isobutil-1-metilxantina

IEQ - Equivalente de ilhota

ITC - Calorimetria de Tilulação Isotérmica

IP₂ - Fosfatidil-inositol-4,5-bifosfato

IP₃ - Inositol trifosfato

K_{ATP} - Canais de Potássio sensíveis a ATP

KH₂PO₄ - Fosfato de potássio monobásico

KCl - Coreto de potássio

MD-29 - Meio quimicamente definido 29

MEM - Meio mínimo essencial

MgCl₂ - Cloreto de magnésio

MgSO₄ - Sulfato de magnésio

NaCl - Cloreto de sódio

NAD⁺ - Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado

NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido

NaHCO₃ - Bicarbonato de sódio

PBS - Solução tampão fosfato-NaCl

PFN - Disfunção primária

P_i - Fosfato inorgânico

pW - Picowatt

RIA - Radioimunoensaio

RPMI - Meio de cultura desenvolvido por Moore *et. al.* (Roswell Park Memorial Institute)

RRP - “Pool” de insulina prontamente liberado

SFB - Soro fetal bovino

TRIS - Tris-hidroximetilaminometano

UCPs - Proteínas desacopladoras mitocondriais

Lista de Ilustrações

	Página
Figura 1: Modelo esquemático do ITC. Vista frontal da câmara calorimétrica de referência, câmara de amostra e seringa injetora. As setas indicam as resistências elétricas.	16
Gráfico 1: Calibração elétrica do ITC (eixo da ordenada).	26
Gráfico 2: Calor de diluição do metanol 2,5 % (v/v) em água em função da sua razão molar. A: Resultado-padrão da Microcal, adições de 10 µL. B: Resultado obtido em nosso laboratório, adições de 5 µL.	28
Gráfico 3: Calibração química realizada através da neutralização do TRIS 4 mmol.L ⁻¹ (titulado) pelo HCl 40 mmol.L ⁻¹ (titulante), à 25°C.	29
Gráfico 4: Termogramas de liberação de calor por promastigotas de <i>L.(L.) amazonensis</i> incubadas com frutose em diferentes concentrações no Microcalorímetro de Titulação Isotérmica (ITC). Em A , termograma de liberação de calor por $2,5 \times 10^7$ promastigotas em 1,6 mL de PBS pH 7,4 contendo frutose 0,16 mmol.L ⁻¹ . Em B , termograma de liberação de calor por $2,5 \times 10^7$ promastigotas em 1,6 mL de PBS pH 7,4 contendo frutose 0,54 mmol.L ⁻¹ . As setas indicam a injeção de frutose para o interior da câmara de amostra e a área hachurada indica a região de estado estacionário selecionada para cálculo do fluxo de calor	30
Gráfico 5: Tempo máximo de metabolização da frutose por $2,5 \times 10^7$ promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> estimuladas com frutose nas concentrações de 0,16 mmol.L ⁻¹ e 0,54 mmol.L ⁻¹ .	31
Gráfico 6: Fluxo de calor normalizado obtido após a incubação de promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> em PBS, estimuladas com frutose nas concentrações finais de 0,0 mmol.L ⁻¹ , 0,16 mmol.L ⁻¹ , 0,54 mmol.L ⁻¹ e 2,5 mmol.L ⁻¹ . Foi utilizado o intervalo de 600 s para o cálculo do fluxo de calor.	33
Figura 2: Amostras de Ilhotas de Langerhans isoladas de ratos <i>Wistar</i> , antes (A) e após (B) o processo de purificação. As ilhotas estão identificadas por setas em (A), para diferenciá-las do tecido acinar de cor marrom. Ilhotas não coradas (C) após incubação por aproximadamente 18 a 20 h, a 37°C, em 5% de CO ₂ . Em (D) uma única ilhota duplamente corada, com laranja de acridina (células vivas, em verde) e iodeto de propídeo (células mortas, em vermelho), para verificar sua viabilidade morfológica imediatamente após o experimento de microcalorimetria no ITC.	36
Gráfico 7: Calor de diluição médio da glicose para concentração final de 2,8 mmol.L ⁻¹ ($54,1 \pm 2,1 \mu\text{cal}$, n=5). No interior da câmara calorimétrica de amostra contendo 1,66 mL de Krebs-Ringer, sem glicose, foram injetados 40 µL de uma solução de glicose (119 mmol.L ⁻¹).	38
Gráfico 8: Calor de diluição médio da glicose para concentração final de 16,3 mmol.L ⁻¹ ($1606,21 \pm 73,2 \mu\text{cal}$, n=4). No interior da câmara calorimétrica de amostra contendo 1,66 mL de Krebs-Ringer, sem glicose, foram injetados 40 µL de uma solução de glicose (692,75 mmol.L ⁻¹).	39

Gráfico 9:	Termogramas produzidos pela (A) estimulação de 1.000 ilhotas com 2,8 mmol.L ⁻¹ de glicose, (B) calor de diluição da glicose 2,8 mmol.L ⁻¹ e (C) termograma obtido após a subtração de B a partir de A, resultando no calor liberado pelas ilhotas sem o calor de diluição da glicose. O calor total está representado na região inferior à direita de cada gráfico.	41
Gráfico 10:	Termogramas produzidos pela (A) estimulação de 1.000 ilhotas com 16,3 mmol.L ⁻¹ de glicose, (B) calor de diluição da glicose 16,3 mmol.L ⁻¹ e (C) termograma obtido após a subtração de B a partir de A, resultando no calor liberado pelas ilhotas sem o calor de diluição da glicose. O calor total está representado na região inferior à direita de cada gráfico.	42
Gráfico 11:	Produção de calor por ilhotas incubadas na presença de glicose em diferentes concentrações. Cada barra representa uma média dos dados obtidos em 22 experimentos independentes ± erro padrão.	44
Gráfico 12:	Produção de lactato por ilhotas incubadas na presença de glicose em diferentes concentrações. Cada barra representa uma média de 22 experimentos independentes ± erro padrão.	47
Gráfico 13:	Produção de insulina por ilhotas incubadas na presença de glicose em diferentes concentrações. Cada barra representa uma média de 22 experimentos independentes ± erro padrão.	51
Gráfico 14:	Razões dos parâmetros Calor liberado, Insulina secretada e Produção de Lactato para a mesma preparação de Ilhotas de Langerhans submetida a diferentes concentrações de glicose (parâmetro 16,3 mmol.L ⁻¹ / parâmetro 2,8 mmol.L ⁻¹). Cada barra representa uma média de 22 experimentos ± erro padrão	52

1) INTRODUÇÃO

1.1) Microcalorimetria de Titulação Isotérmica

Para sustentar os processos vitais, as células requerem um suprimento de energia livre, o qual é obtido a partir do ambiente circundante. A mitocôndria constitui o principal sítio onde a maioria da energia útil derivada da oxidação de ácidos graxos, de carboidratos e de aminoácidos, é capturada na forma de um intermediário rico em energia, denominado ATP. Esse intermediário é importante nos processos celulares que requerem energia, tais como síntese de macromoléculas, contração muscular, excitação nervosa, manutenção da integridade celular, dentre outros. Durante todos os processos envolvendo a oxidação de combustíveis metabólicos, produção de ATP, hidrólise de ATP e síntese de macromoléculas, uma porcentagem de energia é perdida para o ambiente na forma de calor (JARRETT *et al.*, 1979).

A calorimetria consiste na medida do calor (potência, q , em W) em função do tempo (t) (calorimetria isotérmica) ou da temperatura (T) (calorimetria de varredura). A microcalorimetria é simplesmente a medida de calor na escala de micro-Watt (J/s), sem nenhuma alusão ao tamanho requerido para que a amostra possa ser avaliada (GAISFORD & BUCKTON, 2001).

Em 1999, SILVA FILHO e VOLPE, relataram que avanços na tecnologia dos sensores Peltier ou termopilhas têm permitido a aplicação de técnicas calorimétricas no estudo de sistemas biológicos complexos devido à detecção de pequenas quantidades de calor, utilizando amostras reduzidas, que podem ser definidas como soluções diluídas. Essa técnica recebeu a denominação de microcalorimetria biológica.

A microcalorimetria biológica é uma ferramenta valiosa para monitorar, em tempo real, uma grande variedade de processos biológicos. Por ser uma técnica não específica e não destrutiva, permite que a amostra ou sistema a ser analisado seja uma solução de compostos bioquímicos ou uma suspensão de células ou microrganismos. Além disso, por não necessitar que as soluções usadas em seus experimentos sejam opticamente transparentes, a microcalorimetria apresenta vantagens sobre os métodos espectrofotométricos.

Os microcalorímetros modernos são capazes de manter a linha de base de $\pm 0.1 \mu\text{W}$ com uma estabilidade de temperatura de $\pm 0.0001^\circ\text{C}$ (GAISFORD & BUCKTON, 2001). Por isso mesmo, a microcalorimetria é uma ferramenta de grande potencial para o estudo da produção e absorção de calor, na faixa de $\mu\text{J.s}^{-1}$ nos sistemas biológicos em geral (RETTORI & VOLPE, 2000). Como a calorimetria é muito sensível a mudanças induzidas por alterações na formulação ou no processamento da amostra e devido ao fato de se utilizar, usualmente, pequenas massas de amostras para a realização dos experimentos, essa técnica é muito apropriada, também, ao estudo de sistemas farmacêuticos (GAISFORD & BUCKTON, 2001).

Um dos principais objetivos da Biologia Molecular contemporânea é a compreensão das bases moleculares da especificidade e do reconhecimento entre proteínas e ligantes. Proteínas podem reconhecer especificamente e se ligar, reversivelmente, a moléculas-alvo de pequeno peso molecular, a outras macromoléculas tais como outras proteínas, ácidos nucleicos e a estruturas macromoleculares. A caracterização dessas interações envolve a investigação das inter-relações entre função, estrutura, cinética e energia de um sistema, sob condições físico-químicas definidas. Assim, a medida de parâmetros termodinâmicos é importante porque toda interação molecular reversível envolve a redistribuição de ligações não-covalentes, sendo o calor envolvido (entalpia) no reconhecimento entre uma proteína e seu ligante a quantidade termodinâmica mais acessível experimentalmente.

A microcalorimetria é uma técnica que vem evoluindo de forma significativa tanto na sensibilidade quanto no desenvolvimento de procedimentos analíticos. Esses, por sua vez, possibilitam extrair, com maior facilidade, informações termodinâmicas sobre as interações entre macromoléculas biológicas (DOYLE, 1997). Nesse sentido, a calorimetria de titulação isotérmica (ITC) é usada para medir a variação de calor (entalpia) resultante da interação de duas espécies moleculares quaisquer, tais como: enzima-ligante, proteína-proteína e proteína-ácido nucleico, dentre outras.

No ITC, normalmente a câmara de referência é preenchida com um material inerte, de capacidade calorífica similar à amostra, e qualquer calor produzido ou absorvido pela amostra é imediatamente compensado, de forma a manter o equilíbrio térmico entre as duas câmaras (O'BRIEN *et al.*, 2001).

Atualmente, a Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC) é a única técnica disponível que pode ser usada para medir, diretamente, a entalpia de interação de quase todos os processos biomoleculares. Dentro de certos limites, e dependendo do propósito, essa técnica pode ser usada, também, para obter a constante de equilíbrio (K_B) e a razão molar das espécies envolvidas na interação (n). A partir das equações $\Delta G^0 = -RT \ln K$ e $\Delta G^0 = \Delta H^0 - T \Delta S^0$, pode-se calcular, ainda, a energia livre e a entropia (ΔS^0) envolvida na interação proteína-ligante. Medições de ΔH em diferentes temperaturas fornecem o valor da variação da capacidade calorífica (ΔC_p) do sistema (O'BRIEN *et al.*, 2001). Uma característica importante do ITC está relacionada à possibilidade de acompanhar os resultados obtidos e realizar as alterações dos parâmetros experimentais ao longo dos ensaios.

A utilização do ITC para avaliar o metabolismo celular foi descrita, recentemente, por BRANDERBURG (2004) que propôs seu emprego para estudar a interação entre lipopolissacarídeos componentes da membrana externa de bactérias Gram-negativas e macrófagos humanos. Apesar da crescente aplicação da microcalorimetria à Biologia, poucos estudos têm sido feitos sobre microcalorimetria de ilhotas. Em um deles, GYLFE & HELLMAN (1975) utilizaram a microcalorimetria de fluxo para estudar a produção de calor em ilhotas de Langerhans isoladas de camundongos obesos hiperglicêmicos, na ausência e na presença de 20 mM de glicose. Em um outro estudo, HONG e colaboradores (1999) utilizaram a microcalorimetria de condução para avaliar a resposta de ilhotas de Langerhans humanas, incubadas com 2,8 e 28 mM de glicose, respectivamente.

Diante da escassez de estudos utilizando a microcalorimetria de titulação isotérmica para avaliar o metabolismo celular, da importância de se buscar novas técnicas para acessar o estado funcional de células de um modo geral, da experiência prévia de pesquisadores do laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas (MARES-GUIA *et al.*, 1990, NASCIMENTO, 1992 e SILVA-ALVES, 1998) em utilizar a microcalorimetria de condução para avaliação do metabolismo de promastigotas de *Leishmania (Leishmania.) amazonensis* e da facilidade de se obter o número de promastigotas necessário para a realização dos experimentos, optou-se por realizar uma calibração biológica do ITC utilizando promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*. Nesse sentido, o alvo deste estudo foi

desenvolver a aplicação do ITC para avaliar ilhotas de Langerhans de ratos estimuladas com diferentes concentrações de glicose.

1.2) Diabetes mellitus

O diabetes mellitus é a denominação que se dá a um grupo de doenças metabólicas crônicas, com múltiplos fatores etiológicos, caracterizadas por hiperglicemia e por distúrbios no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, que pode ser decorrente da deficiência na secreção de insulina, da resistência à ação desse hormônio, ou de ambas. (BARCELÓ & RAJPATHAK, 2001; The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2003). A hiperglicemia crônica está associada, a longo prazo, com dano, disfunção e falência de vários órgãos, especialmente os olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2006).

A Organização Mundial de Saúde estima que exista no mundo um número superior a 180 milhões de diabéticos, número este que deverá ser maior que o dobro até o ano 2030 (World Health Organization, 2006). A prevalência do diabetes mellitus na população brasileira é estimada em torno de 3,7% correspondendo, em números atuais, a mais de sete milhões de diabéticos (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2006). Levando-se em consideração essas estimativas, o Brasil, que no ano 2000 ocupava a 8ª posição na lista mundial dos países com maior número de diabéticos, passará a ocupar a 6ª posição em 2030, agravando os enormes custos humanos e econômicos provocados pelo diabetes (WILD *et al.*, 2004).

Esse aumento no número de diabéticos está associado a mudanças, relacionadas à vida moderna, no estilo de vida das pessoas, à diminuição da atividade física, à ingestão de dietas predominantemente hipercalóricas, à obesidade resultante dessas dietas e ao envelhecimento da população nos países em desenvolvimento (BARCELÓ & RAJPATHAK, 2001).

O diabetes mellitus é classificado, de acordo com a sua etiologia, em quatro categorias: diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, diabetes gestacional e outros tipos específicos de diabetes.

O diabetes tipo 1, responsável por 5 a 10% dos casos de pessoas diabéticas, é resultante da destruição auto-imune das células β do pâncreas. Embora a taxa de destruição seja muito variável, sendo rápida em alguns indivíduos e lenta em outros, o último estágio da doença é caracterizado por pouca ou nenhuma secreção de insulina e de peptídeo-C. A destruição auto-imune das células β é desencadeada por múltiplos fatores genéticos, estando relacionada, também, a fatores ambientais pouco definidos. Em 85-90% dos pacientes diabéticos tipo 1, pode-se titular auto-anticorpos contra células β , insulina e contra certas enzimas específicas. O diabetes idiopático é uma forma do diabetes tipo 1, com etiologia desconhecida, que se caracteriza pela falta de evidências imunológicas de auto-imunidade contra as células β . Indivíduos com essa forma de diabetes sofrem de cetoacidose e exibem graus variáveis de deficiência de insulina entre esses episódios (American Diabetes Association, 2005). O diabetes do tipo 1 é normalmente detectado na infância ou adolescência, mas pode ocorrer em qualquer idade. Os sintomas típicos do diabetes tipo 1 incluem: poliúria, polifagia, polidipsia, emagrecimento e fadiga. A maioria dos pacientes diabéticos do tipo 1 devem receber insulina exógena para sobreviver, a fim de impedir o desenvolvimento de hiperglicemia e cetoacidose (ZIMMET *et al.*, 2001).

O diabetes tipo 2 responde por 90-95% dos casos de diabetes, sendo caracterizado por uma resistência à ação da insulina e uma deficiência relativa de insulina. Embora sua etiologia seja desconhecida, a destruição auto-imune das células β não ocorre. A maioria dos pacientes com essa forma de diabetes é obesa e aqueles que não são obesos apresentam uma porcentagem aumentada de gordura corporal distribuída predominantemente na região abdominal. O diagnóstico do diabetes tipo 2 pode demorar muitos anos uma vez que a hiperglicemia a ele associada desenvolve-se gradualmente e que os primeiros estágios da doença não são suficientemente severos para que o paciente observe qualquer um dos sintomas clássicos do diabetes. Apesar disso, esses pacientes têm um risco aumentado de desenvolver complicações micro e macrovasculares. O risco de se desenvolver esse tipo de diabetes aumenta com a idade, obesidade e falta de atividade física, estando associado a uma forte e complexa predisposição genética que ainda não está completamente definida. Pessoas com diabetes do tipo 2 não dependem de insulina exógena, mas podem requerê-la para o controle dos níveis da glicose sangüínea, se isto não é alcançado com a dieta ou com o uso de agentes hipoglicemiantes orais

(ZIMMET *et al.*, 2001).

O diabetes gestacional é definido como qualquer grau de intolerância à glicose durante a gravidez. Outros tipos específicos de diabetes podem estar associados com defeitos monogenéticos na função das células β , diabetes que resulta de anormalidades genéticas na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias, diabetes induzido quimicamente por drogas, infecções, dentre outros fatores (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2003; American Diabetes Association, 2005).

O diabetes dos tipos 1 e 2 diferem em vários aspectos. São distintos: as idades de início, as prevalências, as etiologias, os sinais e sintomas clínicos apresentados e os tratamentos empregados. Contudo, há semelhança no fato de que ambos podem evoluir cronicamente com complicações microvasculares, macrovasculares e neurológicas graves (MASHARANI *et al.*, 2004).

1.3) O Pâncreas

O pâncreas é composto de duas porções funcionalmente diferentes: o pâncreas exócrino, principal glândula digestiva do corpo, e o pâncreas endócrino, que constitui a fonte de insulina, glucagon, somatostatina e polipeptídeo pancreático. Enquanto o principal papel das enzimas digestivas produzidas pelo pâncreas exócrino é o processamento de todo o alimento ingerido de tal forma que eles estejam disponíveis para absorção, os hormônios do pâncreas endócrino modulam cada aspecto da nutrição celular, a partir da taxa de absorção dos alimentos para o armazenamento ou metabolismo dos nutrientes.

É estimado que o pâncreas de adultos humanos tenha, em média, dois milhões de pequenas glândulas endócrinas - as ilhotas de Langerhans - que constituem aproximadamente 2% do peso do pâncreas. Nos roedores, cada ilhota é constituída por 2.000-4.000 células das quais 70-80% são células β , 5% são células δ e 15-20% são células α ou PP, dependendo se as células estão localizadas na porção esplênica (cauda) ou duodenal (cabeça) do pâncreas, respectivamente (KULKARNI, 2004).

As ilhotas de Langerhans ou ilhotas pancreáticas são consideradas como pequenos órgãos localizados no pâncreas, cruciais para a homeostase da glicose.

Cada ilhota consiste, basicamente, de quatro tipos de células endócrinas: células α , células β , células δ e as células PP. Estas últimas secretam o polipeptídeo pancreático, as células δ e α secretam, respectivamente, somatostatina e glucagon e as células β são responsáveis pela produção e pelo processamento da insulina.

As ilhotas são estruturas altamente vascularizadas que recebem um fluxo sanguíneo de cinco a dez vezes maior em relação ao pâncreas exócrino. Nos roedores, elas possuem uma organização interna na qual a região central é formada, principalmente, pelas células β e a sua periferia, pelas células α e δ . Assim, a insulina liberada pelas células β é transportada pelo sistema circulatório para o exterior das ilhotas passando, obrigatoriamente, pelas células α e δ . Tem sido postulado que o sentido desse fluxo sanguíneo exerce um papel importante não só no transporte da insulina, como, também, na sua função de modular a liberação de glucagon pelas células α localizadas na periferia das ilhotas (MASHARANI *et al.*, 2004).

CABRERA e colaboradores (2006), utilizando microscopia confocal e técnicas de imunofluorescência múltipla, observaram que, ao contrário do protótipo de ilhotas previamente descrito, as ilhotas humanas não demonstram subdivisões anatômicas, ou seja, as células β não estão agrupadas entre si e demonstram associação com as outras células endócrinas. Assim, a maioria das células β , α e δ está alinhada ao longo dos vasos sanguíneos sem nenhum tipo de arranjo característico. As ilhotas humanas são compostas por aproximadamente 60% de células β e 30% de células α . Entretanto, de que maneira a arquitetura das ilhotas humanas afeta as interações célula-célula, que levam à afinada regulação hormonal, ainda permanece para ser estabelecida.

1.4) Insulina

Apesar dos períodos de alimentação e jejum, a concentração de glicose no sangue varia dentro de uma faixa de 4 a 5,5 mmol.l⁻¹ em indivíduos normais. Esse firme controle é dado pelo balanço entre a absorção da glicose pelo intestino, o armazenamento de glicose pelo fígado e o transporte e metabolismo desse açúcar pelos tecidos periféricos.

A insulina, o mais potente hormônio anabólico conhecido, serve como regulador primário da concentração da glicose sangüínea, uma vez que estimula a entrada de glicose no tecido muscular e adiposo e inibe a produção de glicose hepática. A insulina estimula, também, o crescimento e a diferenciação celular e o armazenamento de substratos no tecido adiposo, fígado e músculos. Exercendo essas funções, ela aumenta a expressão ou atividade das enzimas que catalisam a síntese de lipídios, de glicogênio e de proteínas e, ao mesmo tempo, inibe a atividade ou expressão daquelas que catalisam a degradação desses compostos. Resistência ou deficiência na secreção de insulina resulta numa profunda falta de regulação desses processos, produzindo elevações dos níveis de glicose e de lipídios nos períodos de jejum e após as refeições (SALTIEL & KAHN, 2001).

A secreção de insulina estimulada pela glicose é um processo muito complexo que envolve vários eventos intracelulares, sendo a elevação da concentração da glicose plasmática o estímulo fisiológico mais importante para desencadear a exocitose da insulina.

O metabolismo da glicose gera sinais que desencadeiam o movimento dos grânulos de insulina, sendo o ATP um dos mais importantes fatores envolvidos na sua secreção. O aumento na taxa de ATP/ADP promove o fechamento dos canais de K^+ sensíveis a ATP (K_{ATP}) situados na membrana plasmática. Como consequência, há um acúmulo relativo de K^+ intracelular que resulta na despolarização da membrana. Essa despolarização induz a abertura dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, permitindo a entrada de Ca^{2+} para o interior das células β , participando no aumento da respiração celular e à subsequente exocitose dos grânulos de insulina (BOSCHERO *et al.*, 1990; HENQUIN *et al.*, 2000; KENNEDY *et al.*, 2002).

A hidrólise do fosfadiidil-inositol-4,5-bifosfato (IP_2) é também estimulada durante o processo de secreção de insulina induzida pela glicose, com a formação de inositol-trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG). O IP_3 , por sua vez, promove a extrusão de cálcio pelo retículo endoplasmático e o DAG ativa a proteína quinase C, que promove a abertura dos canais de cálcio sensíveis à voltagem. Entretanto, ainda não está claro qual é o mecanismo exato pelo qual o Ca^{2+} e as proteínas-quinases induzem o transporte dos grânulos de secreção para a membrana plasmática e sua subsequente exocitose.

Embora a glicose forneça o estímulo primário para a secreção da insulina, outros fatores também influenciam no processo de secreção de insulina por desencadear e/ou amplificar sinais nas células β , dentre os quais estão os fatores neuronais, hormonais e parácrinos, que conferem grande precisão ao processo (BORELLI & GAGLIARDINO, 2001; RHODES & WHITE, 2002; HENQUIN, *et al.*, 2003).

GILON & HENQUIN, em 1995, medindo, simultaneamente, as concentrações de Ca^{2+} intracelular e de insulina secretada por uma única ilhota de Langerhans de camundongo estimulada com glicose, verificaram que cada oscilação do Ca^{2+} intracelular é acompanhada por oscilações na secreção de insulina. A rápida elevação da concentração do Ca^{2+} intracelular produz uma estimulação bifásica da exocitose dos grânulos de insulina, caracterizada por um aumento rápido na capacitância das células β (RORSMAN, P., 1997). Essa resposta bifásica pode ser explicada pela liberação de dois “pools” distintos de insulina: o “pool” prontamente liberado (RRP) e o “pool” de reserva (RORSMAN *et al.*, 2000).

1.5) O transplante de ilhotas de Langerhans

O tratamento do diabetes tipo 1 pela auto-administração de insulina em múltiplas doses diárias não evita, por completo, as complicações crônicas do diabetes. Além disso, o tratamento intensivo com insulina para o controle metabólico aumenta o risco de hipoglicemia severa.

O objetivo do transplante de pâncreas ou de ilhotas de Langerhans é obter um excelente controle glicêmico com o menor risco possível para o paciente. O transplante de ilhotas é um procedimento consideravelmente menos agressivo que o transplante do pâncreas total, pois possibilita, se realizado prematuramente, um excelente controle das taxas de glicose, impedindo as complicações de longo prazo. Além disso, os riscos associados ao transplante de ilhotas são muito menores que aqueles associados ao transplante do órgão total (KENMOCHI *et al.*, 1998; LIU & HEROLD, 2000). Outra vantagem do transplante de ilhotas reside no fato de que as ilhotas pancreáticas, além de sintetizar sua própria insulina, são capazes de controlar a liberação desse hormônio nas situações em que o implante não é destruído pelo sistema imune dos transplantados. Tal ação permite às ilhotas

exercer suas funções e manter os níveis de glicose na faixa normal (RICORDI, 2003).

O principal avanço no transplante de ilhotas surgiu quando um grupo canadense (SHAPIRO *et al.*, 2000) introduziu o chamado Protocolo de Edmonton, um procedimento para o transplante de ilhotas aplicado a sete pacientes diabéticos, que resultou na independência de insulina em 100% por paciente por mais de um ano após o transplante. O sucesso desse protocolo é baseado no uso de terapia imunossupressora livre de glicocorticóides, eliminando o uso de drogas diabetogênicas (corticóides usados em esquemas imunossupressores), bem como no uso de um alto número de ilhotas transplantadas por paciente.

Atualmente, cerca de 60 pacientes tratados utilizando esse protocolo tornaram-se insulino-independentes, com uma taxa de independência superior a 70% em dois anos de acompanhamento. Desde então, após o relato original do Protocolo de Edmonton, já aconteceram aproximadamente 500 transplantes de ilhotas em todo o mundo, usando variações que promoveram progressos, incluindo o uso de cultura de ilhotas, transporte do pâncreas em duas camadas de compostos de perfluorcarbono oxigenados e o uso de bolsas de infusão, ao invés da injeção por meio de seringa dentro da veia porta (MERANI & SHAPIRO, 2006).

Entretanto, como o objetivo final do transplante de ilhotas é a eliminação de um tratamento imunossupressor crônico nos pacientes transplantados (RICORDI, 2003; CALAFIORE *et al.*, 2006a), o principal inconveniente do protocolo imunossupressor, advém das complicações decorrentes dele. Dessa forma, apesar do enorme progresso alcançado, tem sido demonstrado, em ensaios clínicos recentes, que ainda é necessário definir estratégias eficazes para impedir a rejeição das ilhotas, sem o uso da imunossupressão crônica.

A busca por suprimir o uso de imunossupressores, e dessa forma eliminar seus efeitos tóxicos tanto para o receptor quanto para as células transplantadas, levou ao desenvolvimento da tecnologia do microencapsulamento. A microcápsula consiste numa barreira física imunoprotetora para as células que, além de fornecer uma arquitetura tridimensional às ilhotas, permite diversificar a fonte celular a partir de tecidos não humanos (por exemplo, ilhotas de porco). Isto significa um recurso à limitação de órgãos de doadores cadavéricos. No entanto, os obstáculos mais importantes para o sucesso do microencapsulamento das ilhotas estão relacionados

ao emprego de materiais inadequados para as cápsulas, comprometendo a sua biocompatibilidade e a conseqüente difusão dos nutrientes pelo aparecimento de fibrose supracapsular (MARIA-ENGLER *et al.*, 2001, CALAFIORE, 2006a).

CALAFIORE e colaboradores (2006b) demonstraram, por meio de ensaios clínicos de alotransplante de ilhotas microencapsuladas em pacientes diabéticos (tipo I), não submetidos ao regime imunossupressor, que o procedimento é simples, não invasivo, indolor e desprovido de efeitos colaterais. Porém, ainda que o paciente não fique independente do uso da insulina exógena, foi observado um declínio na dosagem de insulina administrada, nos níveis de hemoglobina glicosilada, além do desaparecimento de episódios de hipoglicemia e uma melhoria na resposta ao teste de tolerância oral à glicose. Tudo isso indica uma função metabólica completa das ilhotas transplantadas e ajustes subseqüentes no número de ilhotas viáveis, podem melhorar esses resultados. Tanto o procedimento de micro-encapsulamento quanto o protocolo de Edmonton, permanecem como terapias com aplicações limitadas pelas preparações de ilhotas necessárias ao transplante, ou seja, somente as preparações que apresentarem um rendimento maior que 400.000 IEQs e com grau de pureza e viabilidade superior a 80% serão destinadas ao transplante.

Dessa forma, um dos fatores essenciais para o sucesso do transplante de ilhotas é a caracterização funcional das mesmas, prévia ao transplante, que permitirá quantificar, com facilidade e segurança, a proporção de ilhotas viáveis a serem utilizadas ou a proporção de ilhotas a serem transplantadas (TITUS *et al.*, 2000).

Nas últimas três décadas, centenas de indivíduos com diabetes tipo 1 têm recebido transplante alogênico de ilhotas de Langerhans, capazes de regular fisiologicamente a secreção de insulina. Nesse contexto, a determinação da qualidade das ilhotas obtidas a partir de pâncreas de doador cadáver é indispensável. Entretanto, ainda não é conhecido qual parâmetro fisiológico melhor se correlaciona com ilhotas completamente funcionais e capazes de reverter o diabetes após o transplante. Existe muita informação sobre a fisiologia das ilhotas de roedores, mas a biologia das ilhotas humanas permanece pouco compreendida (CABRERA *et al.*, 2006).

Os diversos procedimentos disponíveis para acessar a viabilidade celular das ilhotas têm algumas desvantagens. A avaliação histológica usando laranja de

acridina e iodeto de propídeo para diferenciar células vivas das células mortas é um método rápido, mas não completamente quantitativo. A determinação da capacidade das ilhotas secretarem insulina por meio da incubação estática ou dinâmica por ensaios de perfusão é considerada padrão ouro para acessar a viabilidade, porém demanda muito tempo para sua completa execução (LAKEY *et al.*, 2001; BERNEY *et al.*, 2001; ISHII *et al.*, 2004).

Embora seja possível determinar a viabilidade de ilhotas pela medida específica das suas funções celulares, isto é, secreção da insulina estimulada pela glicose, é impossível compará-la com a mesma função desempenhada pelas ilhotas dentro do pâncreas nativo. Conseqüentemente, a insulina liberada reflete a função de uma única via metabólica das ilhotas e as variações da secreção de insulina em resposta às alterações da glicose podem não representar, inteiramente, as mudanças na função ou na viabilidade das ilhotas. Por essas razões, é difícil determinar os reais efeitos do procedimento de isolamento e purificação de ilhotas na viabilidade das mesmas. Os métodos *in vitro* disponíveis incluem microscopia de fase (ANDERSSON & SANDLER, 1983), morfologia por microscopia eletrônica (RAJJOTE *et al.*, 1977), ensaios fluorimétricos da integridade da membrana (BANK, 1987; GRAY & MORRIS, 1987; LONDON *et al.*, 1989; MERCHANT *et al.*, 1993), testes colorimétricos da função mitocondrial (GÜTTE *et al.*, 1989; KÜHN *et al.*, 1989) e secreção de insulina estimulada pela glicose (LACY *et al.*, 1972; McKAY & KAROW, 1983).

Indubitavelmente, o melhor indicador da viabilidade é a capacidade das ilhotas transplantadas reverterem o diabetes (RICORDI *et al.*, 1990). Por essa razão, embora a viabilidade das ilhotas seja um fator crítico que determina o resultado após o transplante, atualmente, nenhum método está disponível para padronizar a avaliação da viabilidade das ilhotas. Entretanto, é crucial, no mínimo, confirmar, através da integridade da membrana, que as ilhotas não estão mortas antes do transplante, sendo os ensaios de perfusão a principal e mais conveniente via de alcançar isso atualmente (LONDON *et al.*, 1998).

O transplante de ilhotas de Langerhans, realizado para restaurar a homeostase metabólica de pacientes com diabetes do tipo 1 grave, requer a caracterização funcional das ilhotas. Atualmente, isso é feito por meio da incubação estática, pela secreção de insulina estimulada pela glicose (“glucose-stimulated insulin secretion” - GSIS) (LAKEY *et al.*, 2001; BERNEY *et al.*, 2001; WIEDERKEHR

& WOLLHEIM, 2006), que consiste em incubar, sucessivamente, um número conhecido de ilhotas em soluções contendo $2,8 \text{ mmol.L}^{-1}$, 20 mmol.L^{-1} e, novamente, $2,8 \text{ mmol.L}^{-1}$ de glicose, à 37°C , por períodos de 1 hora cada, em meio apropriado. Durante as incubações, as ilhotas deverão responder de modo fisiológico às diferentes concentrações de glicose, secretando mais insulina nas altas concentrações e menos nas menores concentrações desse carboidrato. Ao final de cada incubação, o sobrenadante dessas culturas é retirado, para dosagem de insulina, por ELISA ou RIA, e os resultados são expressos como taxa de secreção de insulina, em U/min.

Um índice de sensibilidade à glicose é calculado pela razão entre a taxa de secreção de insulina na presença de alta concentração de glicose e a taxa de secreção na presença de baixa concentração de glicose. A terceira incubação, em $2,8 \text{ mmol.L}^{-1}$ de glicose, é feita para se confirmar que, em baixa concentração de glicose, as ilhotas voltam a secretar menos insulina. Valores do índice de sensibilidade fornecem uma medida da capacidade secretória de uma dada preparação de ilhotas. Valores de índice superiores a 2 (dois) são considerados como indicadores de ilhotas funcionalmente boas (BERNEY *et al.*, 2001).

O ensaio completo requer de 5 a 8 horas, mas, usualmente, os resultados das dosagens de insulina só estarão disponíveis após 18 ou 24 horas devido ao tempo necessário para processar o RIA. Frequentemente, no entanto, o transplante de ilhotas é realizado antes mesmo dos resultados do teste funcional estarem disponíveis, acrescentando incertezas ao acompanhamento clínico imediato ao pós-transplante. Assim, nem o clínico, nem o cirurgião dispõem de dados concretos sobre a qualidade funcional das ilhotas nas primeiras horas após o procedimento de implante. Dessa forma, nas situações em que a ilhota é falsamente caracterizada como estando em bom estado metabólico e fisiológico, pode ocorrer insucesso do enxerto.

Após o transplante de ilhotas, pode-se observar, também, falha na secreção de insulina, conhecida como disfunção primária (*primary nonfunction*) (PNF), que, dentre vários fatores, poderia resultar de uma massa inadequada de ilhotas transplantadas provenientes de procedimentos técnicos que reduzam a viabilidade e a função das mesmas, tais como isquemia a quente ou a frio, eventos inflamatórios inespecíficos e destruição mediada pelo sistema imune (TITUS *et al.*, 2000). Em

2001, BERNEY e colaboradores propuseram, como principal causa para a perda prematura do enxerto, a contaminação com endotoxinas de vários reagentes necessários para o isolamento das ilhotas resultando na produção e liberação de citocinas pelas próprias ilhotas.

Uma melhor compreensão das causas da disfunção relatada será útil no sentido de planejar intervenções para citoproteção das ilhotas e de reduzir o número de ilhotas requeridas para obter, com êxito, a independência da insulina. A implantação de regimes imunossupressores tolerogênicos permitirá aplicação freqüente do transplante de ilhotas para reparar a função das células β no futuro (PILEGGI *et al.*, 2006).

A microcalorimetria de titulação isotérmica é a única técnica disponível que mede, diretamente, as entalpias de interação de quase todos os processos biomoleculares e permite realizar ajustes em tempo real durante a realização dos ensaios, constituindo uma grande vantagem em relação ao tempo requerido para uma análise completa (O'BRIEN *et al.*, 2001).

O alvo deste trabalho foi avaliar a utilidade do ITC na análise do metabolismo celular de promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e de ilhotas de Langerhans de ratos Wistar.

2) OBJETIVOS

2.1) OBJETIVO GERAL

O objetivo principal desta pesquisa foi desenvolver a aplicação do ITC para avaliar o metabolismo celular de: 1) promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* incubadas com frutose; 2) ilhotas pancreáticas de ratos *Wistar*, após a estimulação com glicose, buscando identificar os possíveis fatores que contribuem para a produção de calor.

2.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1) Produção de calor por ilhotas pancreáticas de ratos submetidas a diferentes concentrações de glicose:

2.2.2) Isolar e purificar ilhotas de Langerhans de ratos *Wistar*;

2.2.3) Padronizar a técnica microcalorimétrica para avaliação funcional das ilhotas pancreáticas;

2.2.4) Medir a produção de calor de ilhotas incubadas com 2,8 mmol.L⁻¹ e 16,3 mmol.L⁻¹ de glicose e dosar a insulina e o lactato no sobrenadante das ilhotas submetidas ao GSIS no ITC;

2.2.5) Comparar a produção de calor total com a quantidade de insulina secretada.

3) MATERIAIS E MÉTODOS

3.1) Microcalorimetria de Titulação Isotérmica

O microcalorímetro de titulação isotérmica (VP-ITC MicroCalorimeter-MicroCal™) ou ITC mede diretamente o calor liberado ou absorvido em amostras líquidas como resultado da injeção de determinadas quantidades de reagentes.

O ITC apresenta um par de câmaras idênticas (amostra e referência), feitas de uma liga metálica inerte, denominada Hastelloy®, que estão localizadas no interior de um compartimento adiabático composto por duas camadas: interna e externa. As câmaras devem estar totalmente preenchidas com líquido durante os experimentos, o que requer aproximadamente 1,7 mL de solução por câmara. Deve-se ressaltar que a câmara de referência é preenchida com água ou tampão e não participa da titulação. Uma seringa, acoplada a uma agulha de aproximadamente 10 cm de comprimento cuja terminação assemelha-se a uma pequena pá, é utilizada para injetar e promover a mistura do conteúdo na câmara de amostra FIG.1

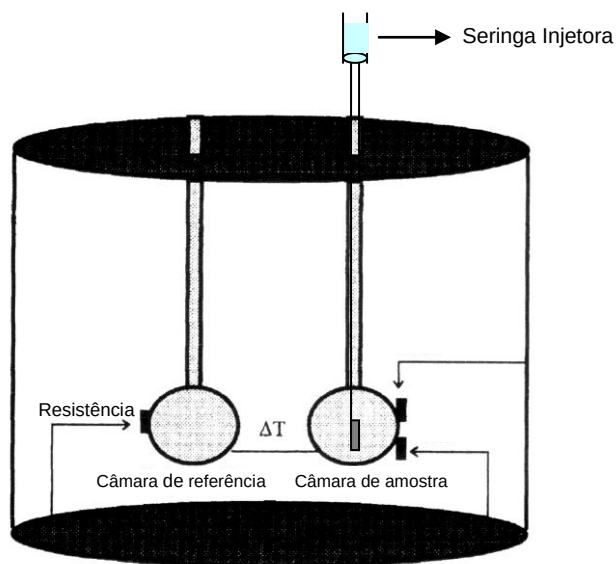


FIGURA 1 - Modelo esquemático do ITC. Vista frontal da câmara calorimétrica de referência, câmara de amostra e seringa injetora. As setas indicam as resistências elétricas.

No ITC, tanto a câmara de amostra quanto a de referência são mantidas à temperatura constante e um mecanismo de retroalimentação é usado para

assegurar que qualquer variação de temperatura que ocorra na câmara de amostra será compensada de forma a manter o equilíbrio térmico entre as duas câmaras (O'BRIEN *et al.*, 2001). As temperaturas medidas pelo sistema são convertidas e expressas em termos de energia diferencial ($DP = P_R - P_A$) entre as câmaras de amostra (A) e de referência (R). Como DP é calibrado em unidades de energia em função do tempo ($\mu\text{cal}/\text{seg}$), a integral do pico formado, com base no tempo, fornece a medida da energia térmica ΔH envolvida na reação. A sensibilidade do ITC é de $0,1 \mu\text{cal}$ e o seu limite de operação situa-se entre $0,1$ e $100 \mu\text{cal}/\text{s}$.

O ITC é controlado através de um programa específico (VP Viewer, versão 5.0 SR2) que permite ao usuário selecionar e acompanhar, ao longo do experimento, os parâmetros da corrida, tais como: número de injeções, temperatura das câmaras, valor da linha de base, velocidade de homogeneização do conteúdo da câmara de amostra, ajuste do equilíbrio térmico, volume de injeção da amostra e o grau de mistura das soluções na câmara de amostra sem intervenção alguma do usuário.

A calibração do sinal é obtida pela dissipação de uma quantidade conhecida de energia (pulso) através de uma resistência elétrica localizada na parede das câmaras, por um determinado intervalo de tempo. Os pulsos solicitados para a calibração, também denominados como pulsos teóricos, causam desvios na energia diferencial a partir da linha de base em ambas as direções (positivo e negativo). O intervalo de duração do pulso deve ser suficientemente longo para permitir que o sinal gerado (DP) retorne à linha de base original, antes que ocorra o próximo pulso. Após o término de cada pulso, o programa do VPViewer analisa a região do pulso e determina o desvio da linha de base, assim como a energia contida no pulso. Esses valores serão comparados com seus respectivos valores teóricos e têm seus erros percentuais calculados. Para que a calibração seja considerada adequada, os erros devem ser menores que 1%.

3.2) Microcalorimetria de Titulação Isotérmica (ITC) de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Os experimentos no ITC foram iniciados com promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*. A cepa utilizada foi PH8 (IFLA/BR/67PH8), gentilmente cedida

pela professora Maria Norma Melo, do Laboratório de Biologia de *Leishmania* do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG.

As promastigotas foram cultivadas a $24 \pm 1^\circ\text{C}$, em meio quimicamente definido (MD-29) com carboidrato e suplementado com de 8% v/v de SFB (MELO, 1982). Os repiques foram feitos semanalmente, após o exame da cultura ao microscópio de fase, para avaliação do crescimento e da motilidade das células. As promastigotas utilizadas nos experimentos tinham, no mínimo, duas e, no máximo, vinte passagens em meio de cultivo.

Antes dos experimentos no microcalorímetro, as promastigotas foram mantidas em meio quimicamente definido sem carboidratos por um período de cinco dias (NASCIMENTO, 1992). No 5º dia, as promastigotas foram examinadas ao microscópio para avaliação quanto ao crescimento e à motilidade e, posteriormente, foram transferidas para tubos cônicos e centrifugados a 1500 g, à 4°C por 10 minutos, para eliminação do meio de cultivo. Em seguida, o sedimento foi lavado, nas mesmas condições, três vezes em tampão fosfato (PBS), pH 7,4. As formas promastigotas foram ressuspensas em PBS, reexaminadas ao microscópio de fase, contadas em câmara de Neubauer e acertadas para a concentração de $2,5 \times 10^7$ ou 1×10^8 promastigotas/mL de PBS pH 7,4. As amostras contendo as promastigotas a serem utilizadas no ITC foram mantidas em banho à 4°C , por até 15 minutos, antes de serem utilizadas nos experimentos.

A câmara de amostra do ITC foi preenchida com 1,6 mL de PBS contendo $2,5 \times 10^7$ ou 1×10^8 promastigotas. A seringa de injeção foi completamente preenchida com solução de frutose, nas concentrações de 27,5 ou 202,5 mmol.L⁻¹, em PBS. As concentrações da solução de frutose na câmara calorimétrica foram ajustadas por meio do controle do volume injetado em cada ensaio.

Os experimentos no ITC foram realizados a 25°C e sob agitação constante (270 rpm) da suspensão de células contida na câmara de amostra do ITC. Ao término dos ensaios, as promastigotas foram avaliadas quanto à viabilidade, motilidade e morfologia através de microscopia de fase.

3.3) Microcalorimetria de Titulação Isotérmica (ITC) de ilhotas murinas

3.3.1) Obtenção e isolamento das ilhotas

Ratos *Wistar* machos, pesando entre 220-280 g, fornecidos pelo CEBIO/ICB/UFGM, foram usados para obtenção de ilhotas de Langerhans. As ilhotas murinas foram isoladas e purificadas, baseando-se no protocolo utilizado pelo Diabetes Research Institute (DRI) - University of Miami School of Medicine - USA (RICORDI *et al.*, 1988), com algumas modificações.

Inicialmente, os animais foram anestesiados por meio da administração intramuscular de cloridrato de quetamina associado à xilazina na proporção 10:7,5 (v/v), na concentração de 0,2 mL/100 g de peso corporal. Em seguida, fez-se a raspagem dos pêlos da região abdominal do animal e sua assepsia utilizando-se uma solução de etanol 70%.

Após testar os reflexos dos animais para assegurar que não respondiam a estímulos que poderiam provocar dor, foi feita uma incisão abaixo do esterno, de modo a expor todo o sistema digestório. Localizado o ducto biliar, foi aplicada uma pinça tipo mosquito na sua porção distal, que corresponde ao seu ponto de entrada no intestino delgado. Em seguida, com o auxílio de uma tesoura para microcirurgia, foi realizada uma incisão no primeiro terço do ducto (região próxima ao fígado) e nela foi introduzida uma cânula (PE50). Cuidadosamente, a cânula foi mantida na posição correspondente a 2-3 mm antes do ponto onde o ducto pancreático emerge do pâncreas a fim de permitir uma adequada distensão da cabeça do pâncreas. Depois da canulação, o pâncreas foi completamente distendido, por meio da injeção de aproximadamente 10 mL de uma solução de 0,7 mg.mL⁻¹ de collagenase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) tipo V em Hank's gelada suplementada, com 1 mg.mL⁻¹ de albumina e 2,8 mmol. L⁻¹ (Sigma-Aldrich) de D-glicose (Sigma-Aldrich), usando a técnica de infusão pulsátil.

Após a laparactomia, o pâncreas foi excisado e foi transferido para uma placa de Petri contendo a mesma solução usada para a sua distensão. Após a retirada do excesso de tecido adiposo, de vasos sanguíneos visíveis e de linfonodos, o pâncreas foi cortado em fragmentos de 1-2 mm, que foram armazenados em tubo de fundo cônico de 50 mL, o qual foi incubado em banho-maria a 37°C para digestão estacionária, durante 25 minutos. Terminado o tempo de incubação, o tubo contendo

a preparação foi agitado manualmente, de forma vigorosa, por inversão, durante 40 segundos. O conteúdo foi imediatamente transferido para um béquer de 100 mL de capacidade ao qual acrescentaram-se 15 mL de Hank's gelado, contendo 1 mg.mL^{-1} de albumina e $2,8 \text{ mmol. L}^{-1}$ de D-glicose, para interromper a digestão. Fazendo uso de uma seringa de vidro de 50 mL (sem agulha), o material contido no béquer foi aspirado e ejetado por três vezes consecutivas a fim de promover a liberação das ilhotas do tecido exócrino. Após esse processo, o volume foi elevado para 80 mL, pela adição de Hank's gelado, e mantido em repouso para sua decantação espontânea. Transcorridos três minutos, de 50 a 60 mL do sobrenadante foram cuidadosamente aspirados com a seringa de 50 mL e descartados em um novo béquer. Ao restante do material foi adicionada solução de Hank's gelada até completar 80 mL. A suspensão resultante foi mantida em repouso e esse procedimento foi repetido por mais duas vezes. Finalmente, o conteúdo do béquer de 100 mL foi filtrado em uma tela de aço inox, com poros de 0,45 cm, para novo béquer de 100 mL. Uma alíquota de 50 μL foi retirada do material filtrado e corada com ditizona para a observação das ilhotas ao microscópio de fase quanto ao tamanho, integridade e número. O material resultante da filtração foi transferido para um tubo de fundo cônico com 50 mL de capacidade e lavado, por centrifugação, a 162,4 g (centrífuga refrigerada Sorvall® RT 6000B) com uma solução de Hank's gelada, à 4°C, por 5 minutos.

3.3.2) Purificação das ilhotas em gradiente de Ficoll

Um gradiente descontínuo de densidade foi preparado, em um tubo de fundo cônico (50 mL de capacidade), pela adição sucessiva de 15 mL de Euroficoll (Ficoll 400 grau biologia molecular, Calbiochem, Darmstadt, Germany) (densidade 1,110) e 10 mL de EuroFicoll (densidades 1,096 e 1,069). O sedimento resultante foi ressuspenso em 10 mL de EuroFicoll (densidade 1,037), o qual foi adicionado, cuidadosamente, sobre o gradiente recém preparado. Esse tubo, contendo o gradiente completo, foi submetido à centrifugação a 649,6 g, a 4°C, por 15 minutos.

Após a centrifugação, as ilhotas estavam situadas entre os gradientes 1,069 e 1,096 e entre 1,096 e 1,110. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, essas interfaces foram aspiradas e transferidas a um tubo de fundo cônico, contendo 20 mL da solução de Hank's gelada, para serem lavadas por centrifugação a 469,3 g, a 4°C,

por cinco minutos. O sobrenadante foi descartado, o sedimento foi ressuspensão em 20 ml de meio RPMI 1640 gelado, contendo 2.0 g. L⁻¹ de L-glutamina e D-glicose, sem bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich), acrescido de 10% SFB (Cultilab, Campinas, Brasil) e lavado por centrifugação a 274,5 g, a 4°C, por 5 minutos. Finalmente, o sedimento contendo as ilhotas foi ressuspensão em 5 mL de RPMI, acrescido de 10% de SFB, e uma alíquota de 50 µL foi retirada para contagem ao microscópio.

Com o objetivo de restaurar as células do estresse físico e químico sofrido durante todo o processo de isolamento e purificação, uma suspensão contendo um número conhecido de ilhotas (não mais que 2.000 por 5 mL de meio) foi preparada em RPMI, contendo 10% de SFB e distribuída em placas de cultura de 60 mm de diâmetro. Posteriormente, as placas foram incubadas por aproximadamente 18 horas, a 37°C, na presença de 5% de CO₂, antes das análises no microcalorímetro.

3.3.3) Viabilidade das ilhotas

Amostras da suspensão de ilhotas foram retiradas antes e após os ensaios no ITC para testar sua viabilidade por meio da dupla coloração simultânea com 290 µmol.L⁻¹ de laranja de acridina e 150 µmol.L⁻¹ de iodeto de propídeo (Sigma-Aldrich). O laranja de acridina é uma base fraca capaz de penetrar nas células vivas e se ligar ao ácido nucléico, causando uma fluorescência verde; já o iodeto de propídeo, um corante de exclusão que não penetra nas células vivas, mas pode se ligar a ácidos nucléicos de células mortas, produz uma forte fluorescência vermelho brilhante (BANK, 1988). O material foi então observado sob o microscópio de fluorescência Olympus (IX70-S870/BH2 RFL-T3 fluorescence microscope, Olympus Optical Co, Japan).

Com o auxílio de uma pipeta automática de 100 µL, a suspensão de ilhotas foi homogeneizada e dela foi retirada uma alíquota de 50 µL, a qual foi diluída em 100 µL de ditizona (*diphenylthiocarbazone*, Sigma-Aldrich). A preparação resultante foi totalmente distribuída em uma lâmina de vidro para a contagem do número de ilhotas ao microscópio de fase (aumento de 10x). O cálculo do número de ilhotas foi feito usando uma regra de três simples.

3.3.4) Preparo da suspensão de ilhotas a ser avaliada no ITC

Após a incubação por aproximadamente 18 horas, as células cultivadas foram avaliadas quanto à sua morfologia e viabilidade. As ilhotas foram então contadas e um volume específico contendo 1.000 ilhotas foi transferido para um tubo cônico de 15 mL e centrifugadas a 162,4 g por 1 minuto à temperatura ambiente, para retirada do meio de cultura.

Em seguida, o sedimento de ilhotas foi lavado uma vez por centrifugação a 162,4 g por 1 minuto, à temperatura ambiente, com uma solução de Krebs-Ringer sem glicose e com 1 mg.mL⁻¹ de albumina. Desprezado o sobrenadante, o sedimento resultante foi ressuspenso em 1,66 mL de Krebs-Ringer sem glicose e mantido à temperatura de aproximadamente 32°C, antes de ser introduzido na câmara do ITC.

3.4) Protocolo experimental para avaliação das ilhotas no ITC

3.4.1) Ensaios na presença de glicose 2,8 mmol.L⁻¹

A câmara calorimétrica de amostra foi cuidadosamente preenchida com 1.000 ilhotas de ratos ressuspensas em 1,66 mL de solução de Krebs-Ringer livre de glicose. A seringa injetora foi preenchida com uma solução de Krebs-Ringer contendo 119 mmol.L⁻¹ de glicose. Em seguida, a câmara de amostra foi fechada através do acoplamento do mecanismo injetor à câmara e o instrumento foi mantido em repouso até alcançar o equilíbrio térmico a 37°C e a estabilidade da linha de base. Atingidos esses parâmetros, o ITC iniciou automaticamente a corrida de tal forma que 40 µL da solução presente na seringa injetora foram introduzidos na câmara de amostra de modo que a concentração final de glicose na célula calorimétrica fosse 2,8 mmol.L⁻¹. O calor envolvido nessa reação foi monitorado durante 50 minutos, sob agitação constante de 270 rpm. Ao final do ensaio, o conteúdo da câmara de amostra foi totalmente removido com uma seringa e centrifugado por 1 minuto, a 162,4 g à temperatura ambiente. O sobrenadante foi congelado e mantido a -30°C para dosagem da insulina e do lactato secretados. O sedimento resultante foi ressuspenso em 1,66 mL da solução de Krebs-Ringer sem

glicose para ser usado no ensaio microcalorimétrico com alta concentração de glicose.

3.4.2) Ensaios na presença de glicose 16.3 mmol.L⁻¹

Antes de iniciar o experimento com ilhotas no ITC na presença de glicose 16.3 mmol.L⁻¹, a seringa injetora foi lavada com água Milli Q (Millipore, Billerica, USA) e preenchida com uma solução de Krebs-Ringer contendo glicose na concentração de 692,75 mmol.L⁻¹. A câmara de amostra foi cuidadosamente preenchida com o sedimento de ilhotas obtido no item anterior **(3.4.1)** e fechada pelo acoplamento do mecanismo injetor à câmara. Após alcançar o equilíbrio térmico a 37°C e a estabilidade da linha de base, o ITC iniciou automaticamente a corrida. Quarenta micro litros da solução contendo 692,75 mmol.L⁻¹ de glicose foram introduzidos na câmara de amostra de forma que a concentração final de glicose na célula calorimétrica fosse 16,3 mmol.L⁻¹. O calor envolvido nessa reação foi acompanhado por 50 minutos, sob agitação constante de 270 rpm. Após a corrida, o conteúdo da câmara de amostra foi totalmente removido, centrifugado a 162,4 g por 1 minuto à temperatura ambiente e o sobrenadante foi congelado a -30°C para dosagem da insulina e do lactato secretados.

Os termogramas produzidos pelas ilhotas incubadas na presença das duas concentrações diferentes de glicose foram armazenados para análise posterior.

3.5) Determinação de insulina e lactato

O conteúdo de insulina presente no sobrenadante da suspensão de ilhotas, obtido após cada ensaio no ITC, foi mantido congelado até que fosse realizada a sua quantificação por radioimunoensaio (Rat Insulin RIA Kit RI-13K - Linco Research, USA). Esse sobrenadante foi usado, também, para determinar o conteúdo de lactato, utilizando-se o glicosímetro *2300 STAT PLUS Glucose & L-Lactate Analyzer* (YSI Incorporated, Yellow Springs, Ohio). Todas as determinações foram realizadas em duplicata.

3.6) Base de cálculos para interpretação dos resultados de microcalorimetria

A interpretação dos dados experimentais resultantes dos ensaios de microcalorimetria, na forma de termogramas de quantidade de fluxo de calor por tempo (calor/s), foi feita por meio de cálculos numéricos, que permitiram analisar os eventos térmicos ocorridos durante o período de registro dos experimentos.

Foi utilizado o programa Microcal™ Origin™ (versão 5.0 SR2) que permitiu realizar a correção da linha de base e calcular a integral da área sob a curva dos termogramas. Uma outra forma de analisar os dados consistiu em localizar, nos termogramas, as regiões de estado estacionário e calcular a integral da área sob a curva num intervalo de tempo definido. Após a obtenção dessa integral, foi calculado o fluxo de calor por unidade de tempo por célula.

Para a microcalorimetria de *Leishmania sp*, os resultados foram expressos através do fluxo de calor (HF) no estado estacionário do termograma, em microcalorias (μcal) por segundo, por número de células ($\mu\text{cal/s.n}^\circ$ de células).

Nos experimentos com ilhotas, os resultados foram expressos em quantidade de calor total liberado durante a incubação das mesmas com glicose nas concentrações de 2,8 e 16,3 mmol.L^{-1} .

3.7) Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico R (R Development Core Team, <http://www.R-project.org>, 2006), usando modelos lineares de efeitos mistos (PINHEIRO & BATES, 2002) com a função *lme* do pacote *nlme* (PINHEIRO *et al.*, 2006). O modelo foi simplificado pelo processo “*backwards*” e o modelo mínimo adequado foi obtido pela retirada de todos os termos não significativos ($P < 0.05$) do modelo completo apresentado abaixo (CRAWLEY, 2002). Os gráficos foram gerados com o programa GraphPad Prism versão 3.00 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA).

Modelos estatísticos:

(1) $\text{Calor} = \text{Insulina} + \text{Condição} + \text{Lactato} + \text{Bloco} + \text{Insulina} : \text{Condição} + \text{Insulina} : \text{Lactato} + \text{Condição} : \text{Lactato} + \text{Insulina} : \text{Condição} : \text{Lactato} + \text{Insulina} : \text{Condição}$

(2) $\text{Lactato} = \text{Condição} + \text{Insulina} + \text{Bloco} + \text{Condição} : \text{Insulina} + \text{Condição}$

(3) $\text{Insulina} = \text{Condição} + \text{Lactato} + \text{Bloco} + \text{Condição}$

onde: *Insulina* é a concentração de insulina produzida por ilhota.

Lactato é a concentração de lactato produzido por ilhota.

Condição é a concentração de glicose (2.8 or 16.3 mmol.L⁻¹) usada nos ensaios.

Bloco é cada conjunto de 04 animais usados nos experimentos.

Nos modelos apresentados acima, o sinal (+) indica a adição de um termo ao modelo, enquanto o sinal (:) indica uma interação estatística entre os termos.

4) RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1) Calibração Elétrica

Para garantia da qualidade dos resultados obtidos no ITC, foi realizada, primeiramente, uma calibração elétrica do equipamento, em conformidade com as recomendações do fabricante descritas no manual de operações (VP-ITC Microcalorimeter User's Manual).

Pulsos térmicos variando entre 1 e 10 $\mu\text{cal/s}$ foram aplicados, permitindo que o sinal gerado (DP) retornasse à linha de base original e estabelecesse um desvio na linha de base (GRAF. 1).

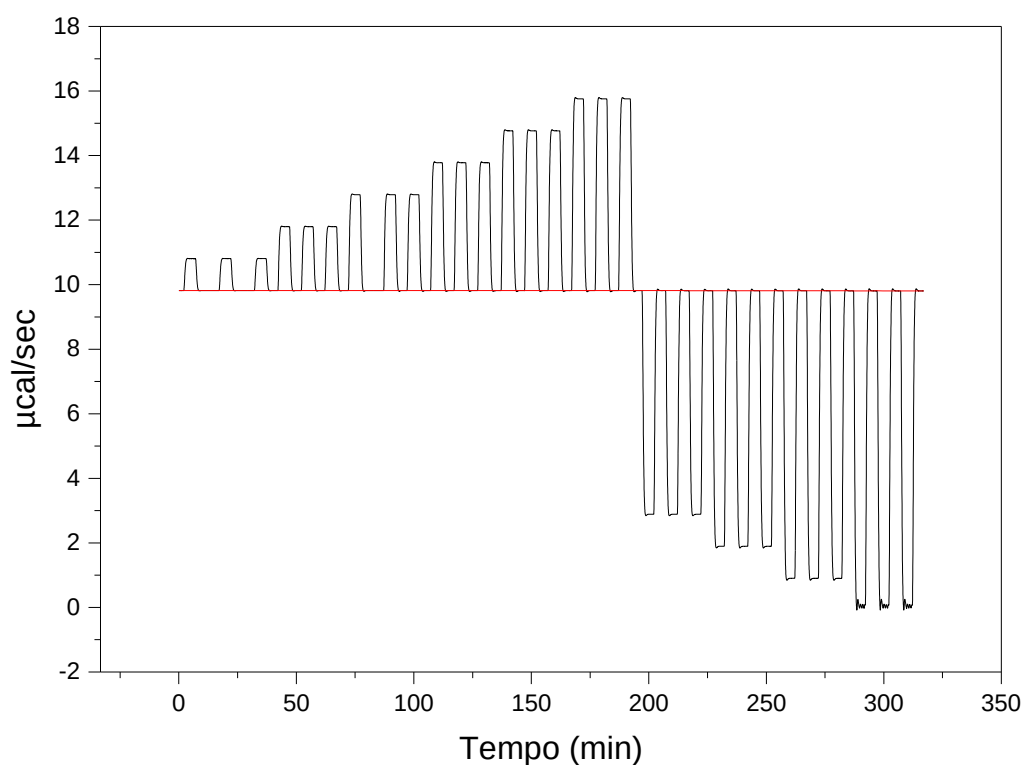


GRÁFICO 1 - Calibração elétrica do ITC (eixo da ordenada).

Após o término de cada pulso, o VPViewer analisou a região do pulso e calculou a amplitude da linha de base, assim como a energia liberada pelo pulso. A potência e a energia solicitadas foram apresentadas como erro percentual de

ambos. Erros percentuais inferiores a 1% são esperados tanto no desvio da linha de base, quanto na energia liberada.

A título de exemplificação, o pulso de 1,00 μcal (menor potência), com duração de 300,11 s e 300,11 μcal de energia, retornou valores de 0,99 $\mu\text{cal/s}$ para o desvio da linha de base e de 298,62 μcal para a energia, resultando em erros percentuais de 0,19% para a linha de base e de 0,5% para a energia liberada. Os demais valores de erro calculados para os pulsos restantes foram todos menores que 1%.

Com esses resultados, foi atestada a confiabilidade e a reprodutibilidade do sistema em termos de resposta aos sinais elétricos e térmicos gerados.

4.2) Calor de diluição do Metanol

O experimento de mensuração do calor de diluição do metanol em água foi realizado no intuito de verificar a funcionalidade e a reprodutibilidade de todos os sistemas do ITC através de um procedimento controlado, padronizado pelo fabricante. Assim, uma solução de metanol P.A. a 2,5 % (v/v) foi injetada em volumes parciais de 5 μL sobre água na câmara de amostra. O GRAF. 2 mostra o resultado dessas injeções, em termos de calor gerado em função da razão molar do metanol.

Segundo recomendação do fabricante, esse tipo de experimento não deve ser usado para calibração do eixo Y devido a diferenças na concentração do metanol assim como à própria volatilidade do mesmo. Os parâmetros mais importantes a serem observados são: a linearidade da amplitude e a área de cada pico correspondente.

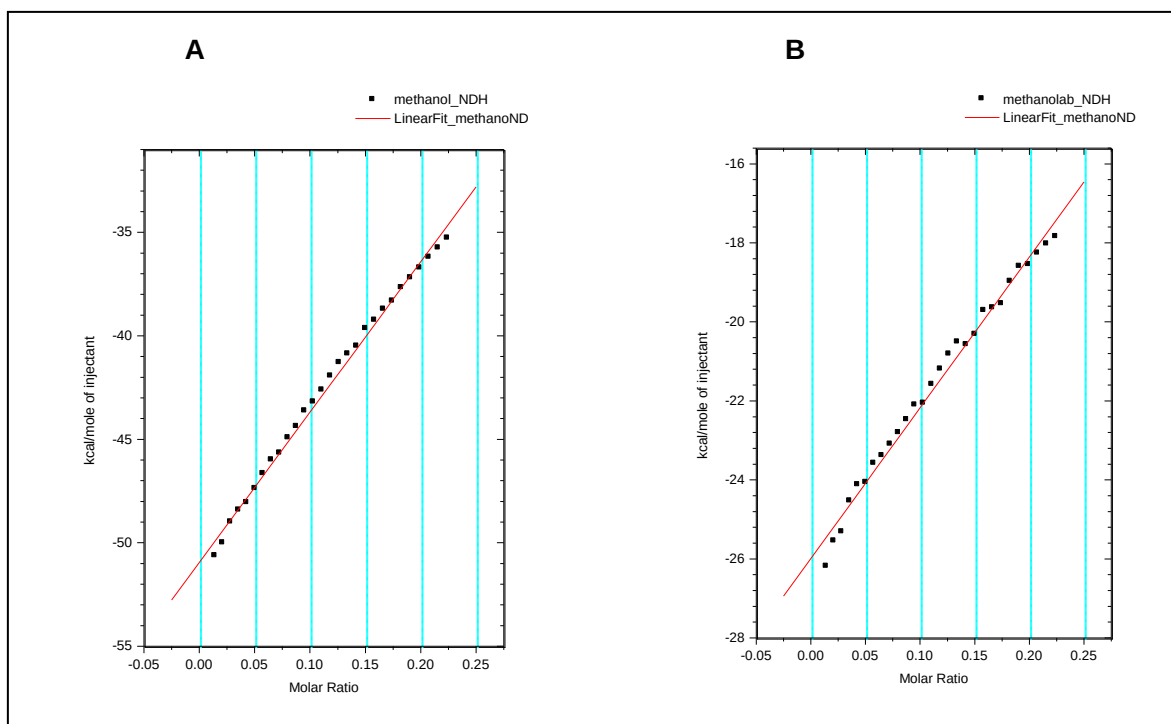


GRÁFICO 2 - Calor de diluição do metanol 2,5 % (v/v) em água em função da sua razão molar. **A:** Resultado-padrão da Microcal, adições de 10µL. **B:** Resultado obtido em nosso laboratório, adições de 5µL.

Observa-se que, no primeiro gráfico, segundo indicações do fabricante, foram injetados 10 µL por vez, enquanto no segundo foram injetados 5 µL. Multiplicando-se o resultado desse último por 2 ($\sim 26 \text{ kcal.mol}^{-1}$), obtém-se praticamente o mesmo resultado do primeiro ($\sim 52 \text{ kcal.mol}^{-1}$). Esse resultado indica conformidade com os dados de referência fornecidos pela Microcal Inc.

4.3) Calibração Química

Baseada no calor de neutralização de TRIS base com HCl (Sigma-Aldrich), de $-11.300 \text{ calorias.mol}^{-1}$ de H^+ (WADSÖ, 1968), foi feita a calibração química do ITC. Os valores obtidos estão apresentados no GRAF. 3.

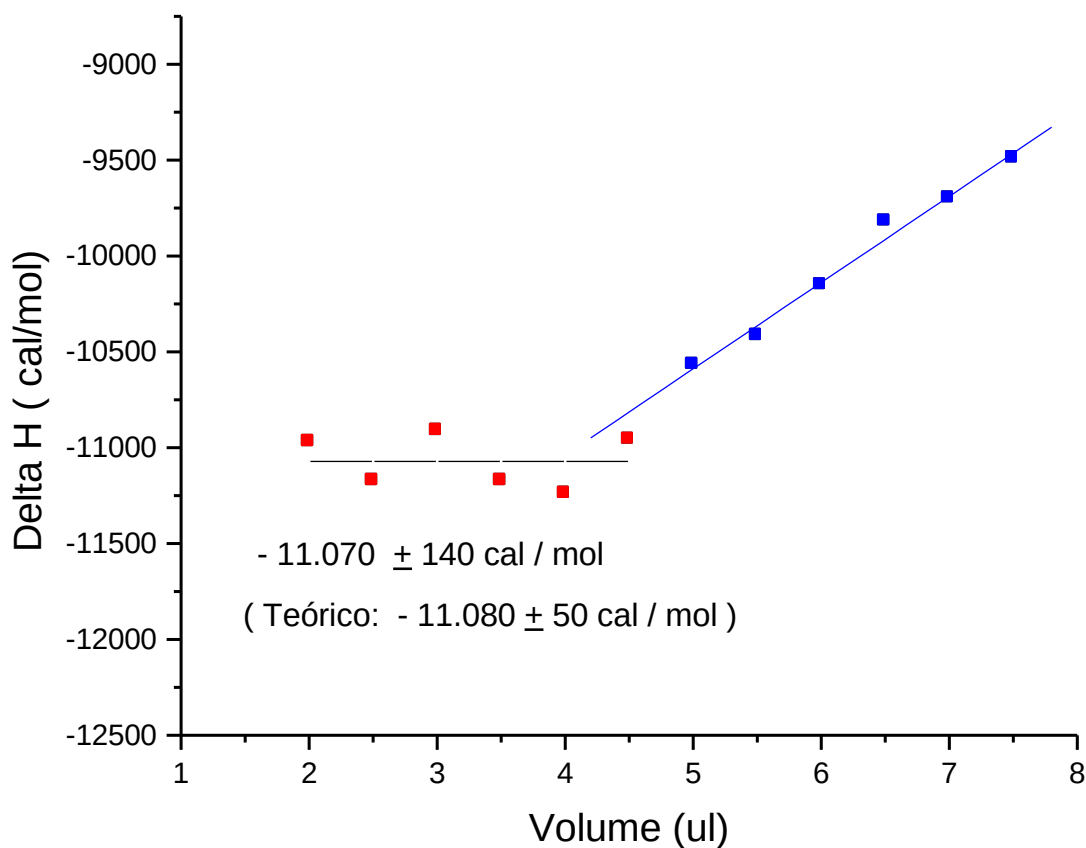


GRÁFICO 3 - Calibração química realizada através da neutralização do TRIS 4 mmol.L⁻¹ (titulado) pelo HCl 40 mmol.L⁻¹ (titulante), à 25°C.

Como pode ser visto no GRAF. 3, nas condições experimentais utilizadas há uma dependência significativa entre o ΔH medido e o calor gerado pela injeção do ligante nos volumes entre 5 e 8 μ L da solução titulante, mas o valor do ΔH é estável em adições entre 2 e 4,5 μ L do titulante. A diferença entre o ΔH medido e o valor tabelado foi menor que 1% (WADSÖ, 1968).

4.4) Calibração biológica

Foi avaliada a produção de calor por promastigotas de *Leishmania* na presença de frutose. Os GRAF. 4A e B representam termogramas típicos obtidos por promastigotas cultivadas previamente por 5 dias em meio quimicamente definido, sem carboidratos e que foram incubadas com frutose, cuja concentração final no interior da câmara microcalorimétrica foi de 0,16 mmol.L⁻¹ e 0,54 mmol.L⁻¹, respectivamente.

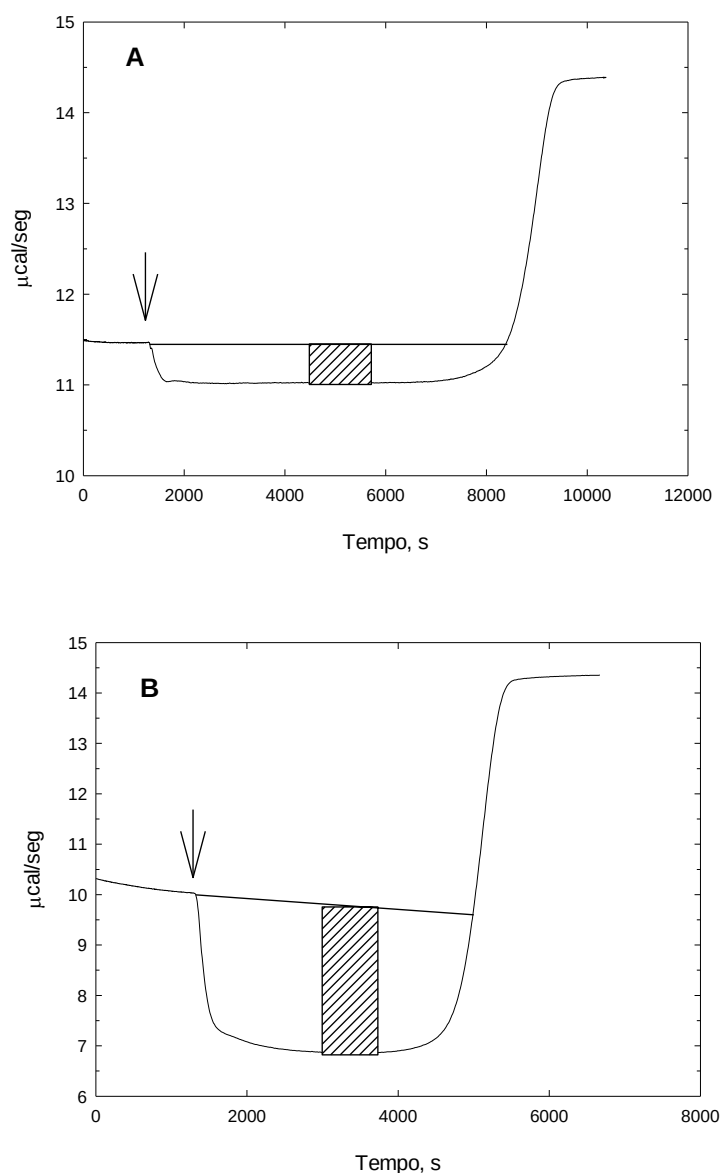


GRÁFICO 4 - Termogramas de liberação de calor por promastigotas de *L.(L.) amazonensis* incubadas com frutose em diferentes concentrações no Microcalorímetro de Titulação Isotérmica (ITC). Em **A**, termograma de liberação de calor por $2,5 \times 10^7$ promastigotas em 1,6 mL de PBS pH 7,4 contendo frutose $0,16 \text{ mmol.L}^{-1}$. Em **B**, termograma de liberação de calor por $2,5 \times 10^7$ promastigotas em 1,6 mL de PBS pH 7,4 contendo frutose $0,54 \text{ mmol.L}^{-1}$. As setas indicam a injeção de frutose para o interior da câmara de amostra e a área hachurada indica a região de estado estacionário selecionada para cálculo do fluxo de calor.

Os perfis dos termogramas de liberação de calor dos experimentos de microcalorimetria com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* mostraram-se muito semelhantes (GRAF. 4A e B). Nesses termogramas, pode-se observar o aparecimento de três fases distintas. A primeira fase corresponde ao tempo selecionado para o equilíbrio da linha de base anterior à injeção da solução de

frutose à câmara calorimétrica; a segunda fase inicia-se com a queda da linha de base imediatamente após a injeção da solução de frutose no interior da câmara de amostra, sendo caracterizada pelo surgimento de um “estado estacionário” no qual está ocorrendo liberação constante de calor decorrente do metabolismo da frutose. Finalmente, caracterizando a terceira fase, a linha de base eleva-se rapidamente, podendo-se observar um novo platô de registro constante.

É interessante observar que à medida que a concentração da frutose aumentou, por exemplo, de 0,16 mmol.L⁻¹ para 0,54 mmol.L⁻¹, o tempo requerido para a mudança do estado estacionário de 2ª fase para o de 3ª fase diminuiu significativamente, passando de 6.000 seg (com 0,16 mmol.L⁻¹ de frutose) para aproximadamente 2.500 seg (com 0,54 mmol.L⁻¹ de frutose) (GRAF. 5).

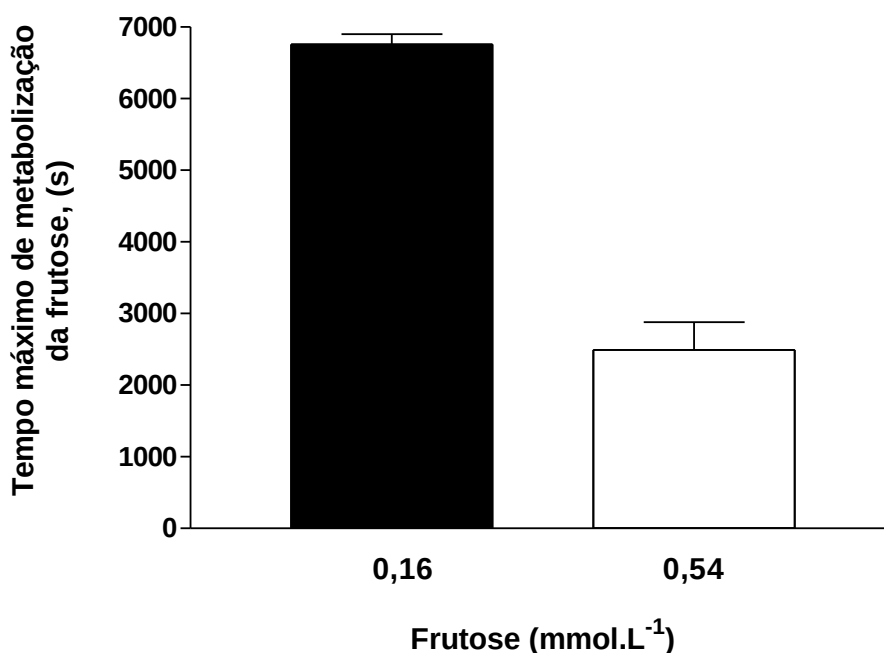


GRÁFICO 5 - Tempo máximo de metabolização da frutose por $2,5 \times 10^7$ promastigotas de *L. (L.) amazonensis* estimuladas com frutose nas concentrações de 0,16 mmol.L⁻¹ e 0,54 mmol.L⁻¹.

DARLING e colaboradores (1989), estudando o efeito da concentração de oxigênio no consumo de glicose por promastigotas de *L. major*, demonstraram que quando esses parasitos foram submetidos à hipóxia (0,2% de O₂), houve um

decréscimo de 50% no consumo do carboidrato quando comparado com aqueles parasitos mantidos em condições aeróbicas. Em condições de anaerobiose completa (100% de N₂), o consumo da glicose foi praticamente inibido. Esses dados indicam que concentrações extremamente baixas de oxigênio apresentam profunda influência sobre as taxas de consumo de glicose por *Leishmania*.

NASCIMENTO (1992), avaliando a utilização de carboidratos por promastigotas de *L. (L.) amazonensis* por meio de microcalorimetria de condução, verificou que, embora de forma menos marcante que a glicose, a frutose também exerce um efeito inibidor em concentrações de 5 mmol.L⁻¹. Entretanto, deve-se ressaltar que no interior das câmaras do calorímetro de condução, o suprimento de oxigênio para as reações é garantido pelo excesso do mesmo presente na fase gasosa. Nela, o oxigênio é passado à suspensão de células (fase líquida) por meio das agitações.

É importante ressaltar que, após o experimento de microcalorimetria, foi feita a dosagem de carboidratos do sobrenadante das amostras de *Leishmania* pelo método ácido sulfúrico/fenol (CHAPLIN, 1986). Para todas as amostras, a concentração de carboidratos dosada foi próxima à quantidade injetada na câmara de amostra. Dessa forma, os resultados obtidos permitiram descartar a hipótese de que a mudança no perfil de liberação constante (2ª para a 3ª fase) estaria ocorrendo devido ao esgotamento de frutose do meio pelo metabolismo celular.

Após análises de vários ensaios, o perfil experimental dos termogramas pareceu indicar que o aparecimento da 3ª fase ocorre devido à diminuição e/ou esgotamento do oxigênio dissolvido no meio. Essa privação de oxigênio provocaria alterações metabólicas na *Leishmania*, tais como redução no metabolismo aeróbico, sofrimento e morte celular que estariam relacionados a uma menor quantidade de calor liberado, ocasionando mudanças no perfil de liberação de calor registrado no termograma.

Diante desses fatos, pode-se sugerir que provavelmente está ocorrendo um consumo mais rápido de carboidratos e, conseqüentemente, do oxigênio do meio líquido, à medida que a concentração da frutose é elevada, confirmando também, a teoria proposta de que a mudança do platô de liberação de calor da 2ª fase para o platô da 3ª fase representa o esgotamento de oxigênio no sistema de incubação. Essa privação de oxigênio levará, por sua vez, a uma redução brusca do metabolismo do carboidrato. Desta forma, no metabolismo de frutose por *Leishmania*

parece existir um ajuste fino entre o consumo do carboidrato e a concentração do mesmo no meio de incubação.

Os termogramas resultantes da incubação das promastigotas de *Leishmania* na presença de PBS, na ausência de qualquer fonte exógena de substrato e em várias concentrações de frutose permitiram o cálculo do fluxo de calor (GRAF. 6).

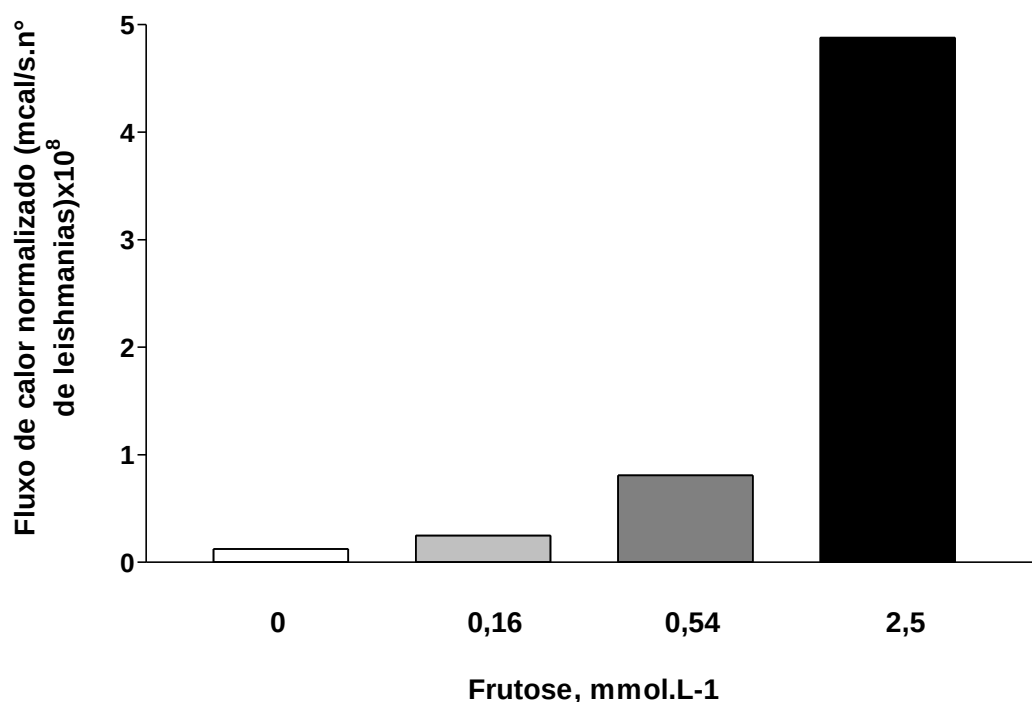


GRÁFICO 6 - Fluxo de calor normalizado obtido após a incubação de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* em PBS, estimuladas com frutose nas concentrações finais de 0,0 mmol.L⁻¹, 0,16 mmol.L⁻¹, 0,54 mmol.L⁻¹ e 2,5 mmol.L⁻¹. Foi utilizado o intervalo de 600 s para o cálculo do fluxo de calor.

Observa-se que as promastigotas incubadas em tampão fosfato (PBS) na ausência de frutose liberam calor. Entretanto, o fluxo de calor liberado nessa condição chega a ser aproximadamente 97% menor que aquele liberado pelas promastigotas incubadas com frutose 2,5 mmol.L⁻¹.

Comparando-se o fluxo de calor obtido por promastigotas incubadas nas diversas concentrações de frutose, pode-se observar que o mesmo variou em função da concentração do carboidrato, ou seja, esses parasitos estimulados com concentrações crescentes de frutose apresentaram valores maiores de fluxo de calor.

NASCIMENTO (1992) e SILVA-ALVES (1998) demonstraram, por meio da calorimetria de condução, que promastigotas de *Leishmania* liberam calor quando incubadas apenas com PBS, na ausência de qualquer fonte exógena de carboidrato. Tais resultados sugerem que essas células possuem reservas endógenas de energia que são consumidas quando os parasitos são suspensos em meio não nutritivo.

SIMON *et al*, (1983) observaram que promastigotas de *L. tropica* possuem grandes reservas internas de aminoácidos livres e KEEGAN & BLUM (1990) demonstraram que promastigotas de *L. major*, incubadas em condições aeróbicas, consomem parte da reserva endógena de alanina. Portanto, a produção de calor por promastigotas, na ausência de carboidrato, parece ser resultante do metabolismo dessas reservas endógenas de energia com consumo concomitante de oxigênio.

Pela microcalorimetria de titulação isotérmica, o fluxo de calor metabólico liberado por promastigota de *Leishmania* incubada com frutose na concentração de 2,5 mmol.L⁻¹ foi 204 pW, tendo sido previamente avaliado pela microcalorimetria de condução como sendo 105 pW (NASCIMENTO, 1992), nas mesmas condições experimentais. Sugere-se que a maior sensibilidade do ITC e a própria variação biológica das amostras possam explicar a diferença encontrada entre os valores de fluxo de calor utilizando os dois tipos de microcalorímetros. Esse resultado permitiu validar o uso do ITC para avaliação do metabolismo celular de outros tipos celulares. Visando aplicar esta técnica (ITC) na avaliação da viabilidade das ilhotas de Langerhans para transplantes, utilizamos o ITC para avaliar os efeitos da glicose sobre ilhotas de Langerhans de ratos.

4.5) Isolamento e purificação de ilhotas de Langerhans

O sucesso no isolamento de ilhotas de Langerhans está associado a uma série de fatores, tais como: variações encontradas entre os lotes de enzimas utilizadas, o aparecimento de pancreatite hemorrágica na cauda do pâncreas após a injeção da collagenase, a completa distensão do órgão induzida pela collagenase, a manutenção da integridade da cápsula pancreática durante a pancreatectomia, as condições de incubação (temperatura, tempo, estresse mecânico, concentração da enzima) durante a digestão enzimática do tecido acinar, além de outros fatores que

permitem a obtenção de ilhotas completamente livres do tecido exócrino, porém mantendo a integridade de sua estrutura.

Como as ilhotas de Langerhans nem sempre são fáceis de serem distinguidas do tecido exócrino e dos linfonodos, especialmente quando o grau de pureza da preparação é baixo, utiliza-se rotineiramente o corante ditizona, que cora as ilhotas de vermelho intenso, indicando a presença de insulina armazenada nos grânulos secretórios das células β (LATIF *et al.*, 1988).

Nos experimentos realizados neste trabalho, após a digestão do pâncreas, as ilhotas livres foram visualizadas em vermelho no meio de restos do tecido acinar digerido, que apresentam uma tonalidade marrom (FIG. 2A). Conforme pode ser visto na FIG. 2B, o processo de purificação eliminou com sucesso esse tecido acinar e forneceu ilhotas com alto grau de pureza, o que pôde ser visualizado após a coloração com a ditizona. A FIG. 2C mostra ilhotas não coradas e mantidas em cultivo por aproximadamente 18h, a 37°C, em 5% de CO₂, apresentando estrutura íntegra, com bordas bastante definidas. Já a FIG. 2D apresenta uma única ilhota duplamente corada com laranja de acridina, que cora as células vivas em verde brilhante, e iodeto de propídeo, o qual se incorpora às células mortas corando-as de vermelho, para verificar sua viabilidade morfológica imediatamente após o experimento de microcalorimetria no ITC.

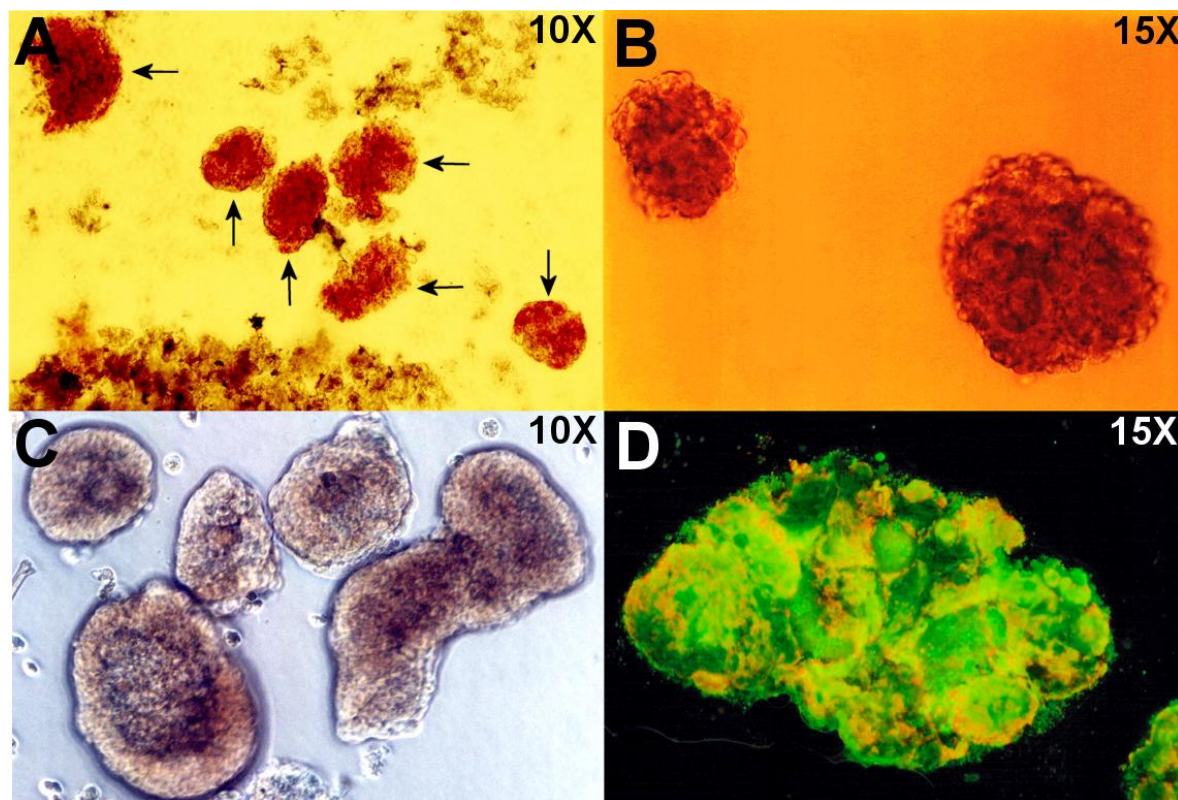


FIGURA 2 - Amostras de Ilhotas de Langerhans isoladas de ratos *Wistar*, antes (A) e após (B) o processo de purificação. As ilhotas estão identificadas por setas em (A), para diferenciá-las do tecido acinar de cor marrom. Ilhotas não coradas (C) após incubação por aproximadamente 18 a 20 h, a 37°C, em 5% de CO₂. Em (D) uma única ilhota duplamente corada, com laranja de acridina (células vivas, em verde) e iodeto de propídeo (células mortas, em vermelho), para verificar sua viabilidade morfológica imediatamente após o experimento de microcalorimetria no ITC.

A produção média de ilhotas obtidas após o isolamento varia dependendo da técnica empregada. SHAPIRO e colaboradores realizaram, em 1996, um estudo comparativo, utilizando duas técnicas distintas, para avaliar o rendimento médio obtido durante o processo de isolamento de ilhotas de Langerhans de ratos. A primeira baseada na técnica padrão descrita em 1967, por LACY & KOSTIAONVISKY, envolve a ruptura do parênquima acinar pela injeção da solução de Hank's no interior do ducto pancreático, corte da glândula em pequenos fragmentos e sua subsequente incubação, sob agitação, à 37°C com a collagenase. O número de ilhotas obtidas utilizando-se essa técnica foi de $487,5 \pm 69$ ilhotas por pâncreas. A segunda técnica foi desenvolvida pelo grupo chefiado pelo Dr. Shapiro a partir das seguintes modificações no método de digestão estacionária: infusão da solução de collagenase por pulsos, armazenamento do pâncreas no gelo por 30

minutos antes da sua incubação a 37°C, dissociação das ilhotas do tecido acinar realizadas no vórtex e a purificação das ilhotas, realizada duas vezes, em gradiente de Ficoll. Por essa técnica foram encontrados valores de 719 ± 114 ilhotas por pâncreas.

Comparando esses valores com o rendimento médio obtido em nossos isolamentos, que variou entre 500 e 600 ilhotas por pâncreas, certificamos que nossos resultados estão de acordo com aqueles descritos na literatura (DELABY *et al.*, 1989; SHAPIRO *et al.*, 1996). Essas preparações purificadas de ilhotas foram cultivadas por 18 a 20 h e exibiram estrutura intacta, com bordas bem definidas antes dos experimentos de microcalorimetria no ITC.

4.6) Calor de diluição da Glicose

4.6.1) Glicose 2,8 mmol.L⁻¹

O GRAF. 7 apresenta os termogramas de cinco ensaios independentes relativos ao calor de diluição da glicose. Nesses experimentos, foram injetados 40 µL de uma solução Krebs-Ringer contendo 119 mmol.L⁻¹ de glicose sobre 1,66 mL de Krebs-Ringer sem glicose.

De acordo com O GRAF. 7 pode-se observar que, após a injeção da glicose na câmara calorimétrica de amostra, observou-se o aparecimento de um pico com amplitude de aproximadamente 1 µcal, que retornou à linha de base inicial após, aproximadamente, dois minutos. A concentração final da glicose foi de 2,8 mmol.L⁻¹ e o valor médio de calor liberado, integrando-se a área do pico, abaixo da linha de base, foi de $54,1 \pm 2,1$ µcal, correspondendo à diluição da glicose para essa concentração.

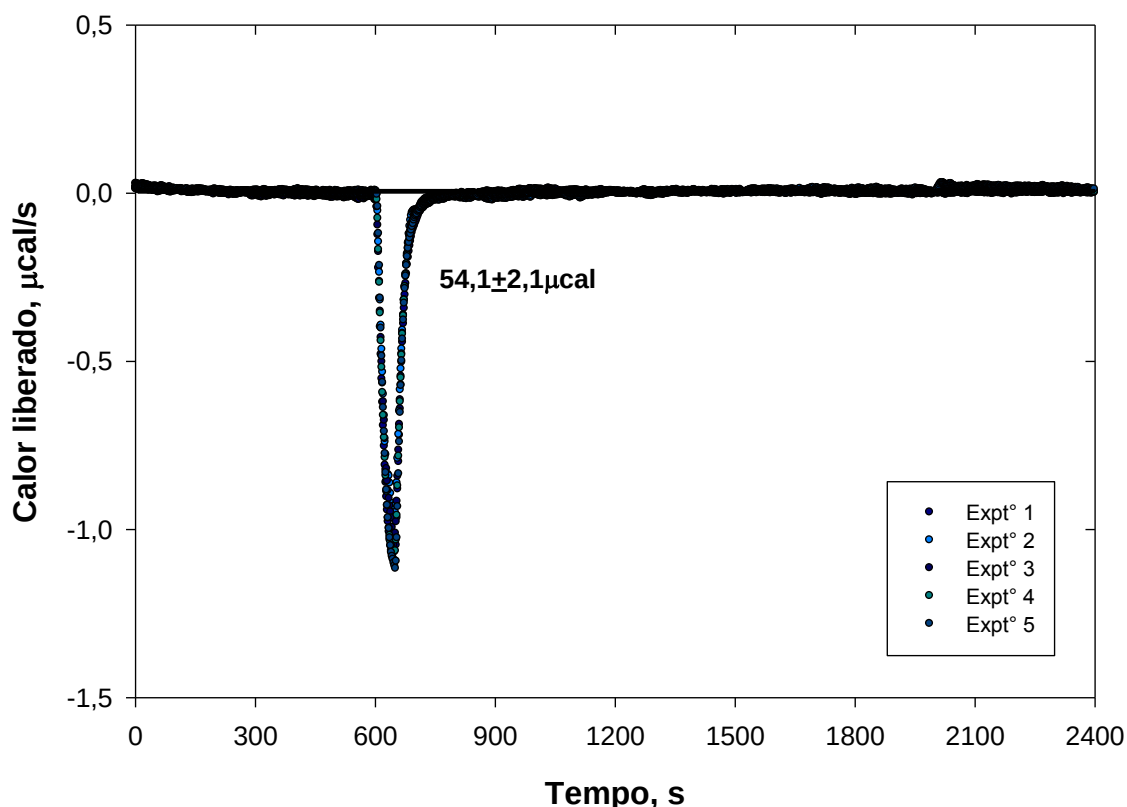


GRÁFICO 7 - Calor de diluição médio da glicose para concentração final de $2,8 \text{ mmol.L}^{-1}$ ($54,1 \pm 2,1 \mu\text{cal}$, $n=5$). No interior da câmara calorimétrica de amostra contendo $1,66 \text{ mL}$ de Krebs-Ringer, sem glicose, foram injetados $40 \mu\text{L}$ de uma solução de glicose (119 mmol.L^{-1}).

4.6.2) Glicose $16,3 \text{ mmol.L}^{-1}$

O GRAF. 8 apresenta os termogramas de quatro ensaios independentes visando a obter os valores do calor de diluição da glicose para concentração final de $16,3 \text{ mmol.L}^{-1}$. Esses experimentos foram realizados utilizando-se o mesmo protocolo experimental empregado nos ensaios relativos ao calor de diluição da glicose para a concentração final de $2,8 \text{ mmol.L}^{-1}$. A única diferença foi o valor da concentração da solução estoque de glicose injetada na câmara calorimétrica de amostra, que, nesse ensaio, foi de $692,75 \text{ mmol.L}^{-1}$.

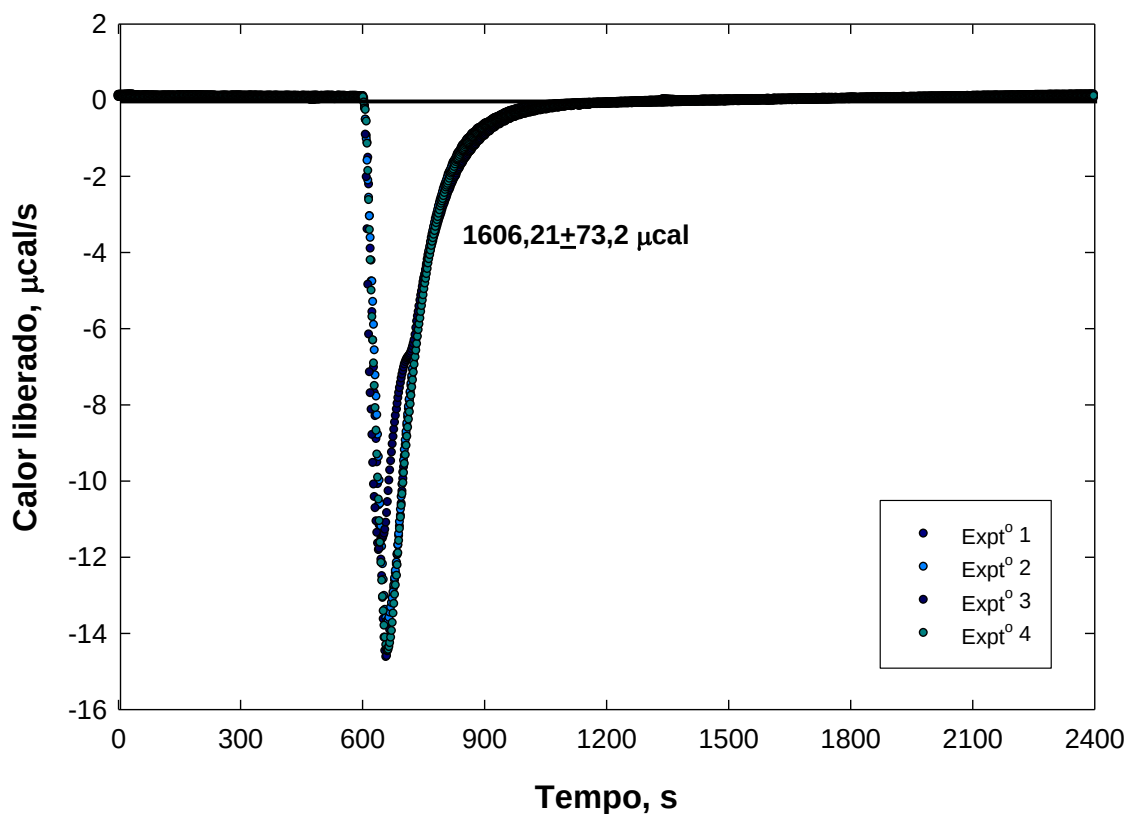


GRÁFICO 8 - Calor de diluição médio da glicose para concentração final de $16,3 \text{ mmol.L}^{-1}$ ($1606,21 \pm 73,2 \text{ µcal}$, $n=4$). No interior da câmara calorimétrica de amostra contendo $1,66 \text{ mL}$ de Krebs-Ringer, sem glicose, foram injetados 40 µL de uma solução de glicose ($692,75 \text{ mmol.L}^{-1}$).

Após a injeção da glicose na câmara calorimétrica de amostra, observou-se o surgimento de um pico de grande amplitude (aproximadamente 15 µcal), o qual retornou ao valor da linha de base após dez minutos. O valor médio de calor produzido, a partir da diluição da glicose nessa concentração, foi obtido por meio do cálculo da integral da área do pico formado e correspondeu a de $1.606,21 \pm 7,2 \text{ µcal}$ (GRAF. 8).

4.7) Termogramas obtidos nos ensaios com ilhotas estimuladas com glicose

Um termograma típico de 1.000 ilhotas pancreáticas murinas estimuladas com $2,8 \text{ mmol.L}^{-1}$ é demonstrado no GRAF 9A. Dois picos exotérmicos podem ser visualizados distintamente no gráfico, sendo o primeiro correspondente ao calor liberado pela diluição da glicose. O segundo pico, de amplitude maior que o primeiro,

corresponde ao calor liberado pelas ilhotas após a estimulação com glicose na concentração final de $2,8 \text{ mmol.L}^{-1}$. O calor total liberado nesse termograma, obtido pela integração da área sob a linha de base, foi de $2.265,4 \text{ } \mu\text{cal}$.

O GRAF. 9B demonstra uma corrida no ITC na ausência de ilhotas, denominada de branco, onde somente o pico, correspondente à diluição da glicose para a concentração final de $2,8 \text{ mmol.L}^{-1}$, pode ser observado, com valor de calor liberado tendo sido de $54,1 \text{ } \mu\text{cal}$.

De modo a obter somente o calor liberado pelas ilhotas, os dados do GRAF. 9B foram subtraídos, ponto a ponto, do GRAF. 9A, gerando o gráfico da GRAF. 9C, cuja área integrada correspondeu a $2.211,3 \text{ } \mu\text{cal}$ de calor liberado.

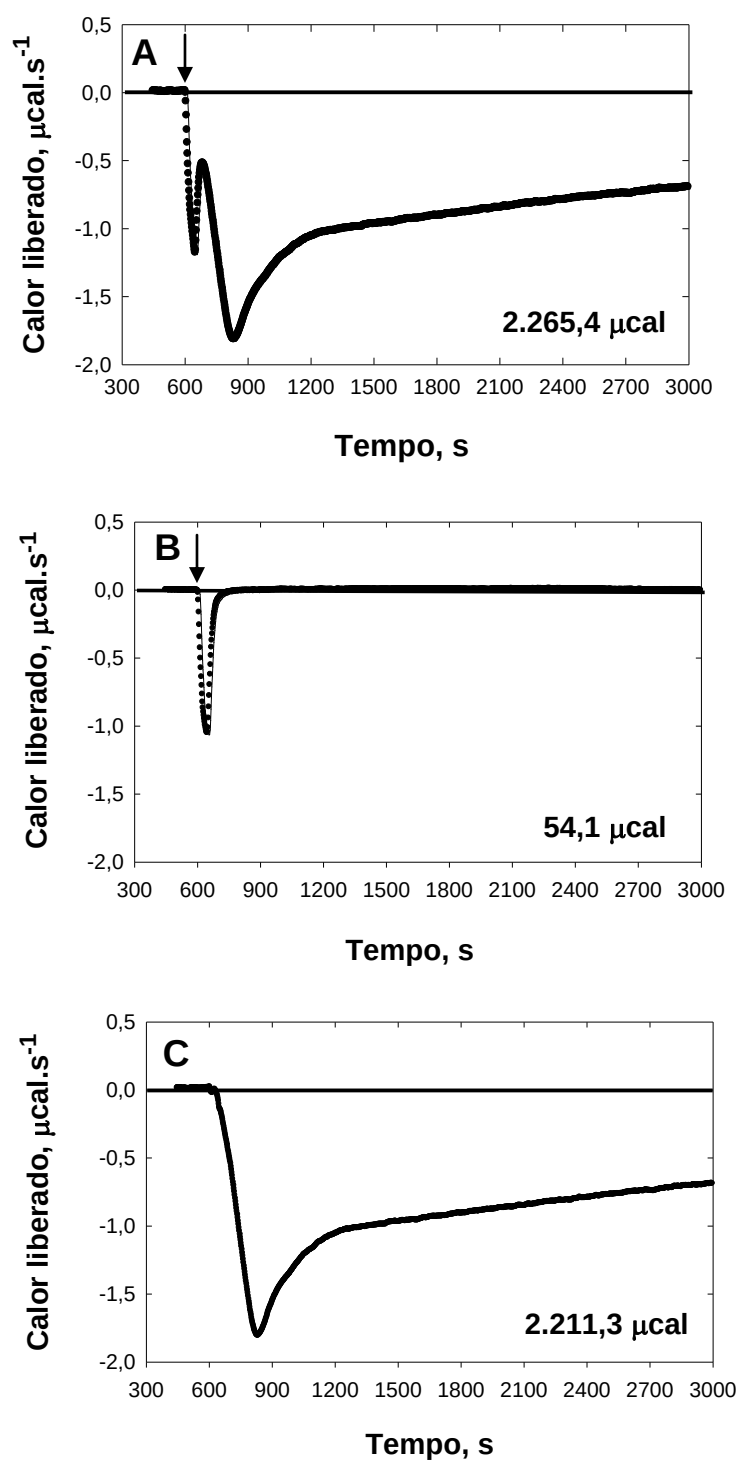


GRÁFICO 9 - Termogramas produzidos pela **(A)** estimulação de 1.000 ilhotas com $2,8 \text{ mmol.L}^{-1}$ de glicose, **(B)** calor de diluição da glicose $2,8 \text{ mmol.L}^{-1}$ e **(C)** termograma obtido após a subtração de B a partir de A, resultando no calor liberado pelas ilhotas sem o calor de diluição da glicose. O calor total está representado na região inferior à direita de cada gráfico.

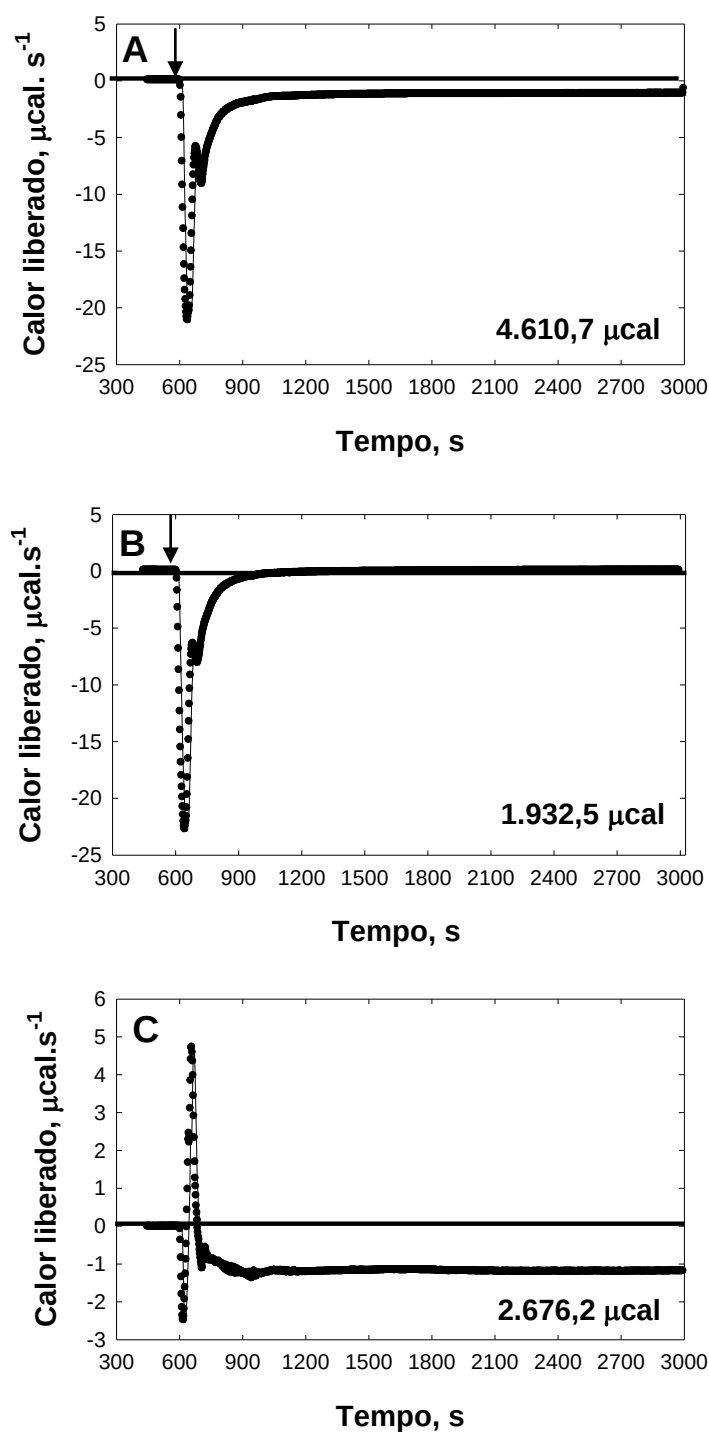


GRÁFICO 10 - Termogramas produzidos pela (A) estimulação de 1.000 ilhotas com $16,3 \text{ mmol.L}^{-1}$ de glicose, (B) calor de diluição da glicose $16,3 \text{ mmol.L}^{-1}$ e (C) termograma obtido após a subtração de B a partir de A, resultando no calor liberado pelas ilhotas sem o calor de diluição da glicose. O calor total está representado na região inferior à direita de cada gráfico.

Após essa determinação no ITC, as ilhotas foram retiradas do calorímetro, lavadas e recolocadas na câmara de amostra com uma solução de Krebs-Ringer sem glicose. Após a estabilização da linha de base, injetou-se uma solução de glicose para concentração final de $16,3 \text{ mmol.L}^{-1}$ e o calor total liberado, incluindo o calor de diluição da glicose, foram registrados. De maneira análoga ao experimento com $2,8 \text{ mmol.L}^{-1}$ de glicose, o calor de diluição da glicose na concentração de $16,3 \text{ mmol.L}^{-1}$ foi também subtraído dos dados experimentais (GRAF. 10).

Imediatamente após o experimento completo no ITC, as ilhotas foram removidas da câmara de amostra do calorímetro e avaliadas quanto a sua viabilidade morfológica, conforme já descrito e ilustrado na FIG. 2D. As ilhotas apresentaram uma cor predominantemente verde, indicando que ainda estavam viáveis após todo o procedimento experimental.

4.8) Calor metabólico das ilhotas de Langerhans estimuladas com glicose nas concentrações de 2,8 e $16,3 \text{ mmol.L}^{-1}$

Foram realizados vinte e dois experimentos completos, cada um com 1.000 ilhotas. As médias $\pm$ erros padrões dos calores liberados por ilhotas foram de $2,19 \pm 0,17 \text{ } \mu\text{cal}$ após a injeção de glicose na concentração de $2,8 \text{ mmol.L}^{-1}$ e de $3,56 \pm 0,29 \text{ } \mu\text{cal}$ após a injeção de glicose para a concentração final de $16,3 \text{ mmol.L}^{-1}$ (GRAF. 11).

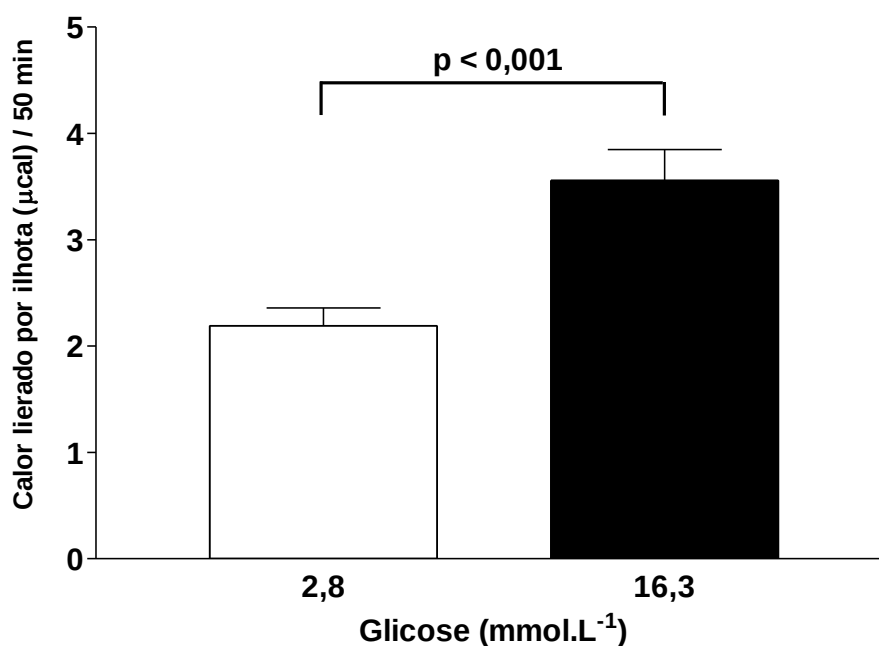


GRÁFICO 11 - Produção de calor por ilhotas incubadas na presença de glicose em diferentes concentrações. Cada barra representa uma média dos dados obtidos em 22 experimentos independentes $\pm$ erro padrão.

De acordo com o GRAF. 11, a produção de calor por ilhotas pancreáticas de ratos, isoladas e previamente mantidas em cultivo, foi fortemente influenciada pela concentração (condição) usada para estimulá-las ($p < 0,001$) e, com base na análise estatística dos modelos lineares de efeitos mistos, nenhuma das outras variáveis testadas influenciou na produção de calor.

Do ponto de vista bioquímico, a produção de calor nos seres vivos pode ser analisada como resultante do processo de síntese ou da hidrólise do ATP. A eficiência termodinâmica da síntese de ATP é em torno de 65%, ou seja, aproximadamente 35% da energia liberada durante a oxidação dos substratos energéticos ocorrem na forma de calor. Entretanto, a molécula de ATP é reservatório intermediário de energia, o qual deve ser novamente mobilizado, por meio da hidrólise do ATP, para que ocorra o trabalho biológico. A eficiência dessa etapa é menor ainda, de cerca de 40%. Assim, a eficiência termodinâmica do nosso organismo é de aproximadamente 25-30%.

Para a síntese de ATP, a energia proveniente do ciclo de Krebs é transferida, como poder redutor, às moléculas de NADH e FADH₂. Essas moléculas, por sua vez, são oxidadas na cadeia respiratória resultando em transferência da energia extraída dos substratos energéticos para os diferentes componentes da cadeia

respiratória. Estes utilizam a energia dos elétrons para bombear prótons para fora da matriz mitocondrial, criando um poderoso potencial eletroquímico que armazena temporariamente a energia na forma de um potencial eletroquímico de prótons através da membrana mitocondrial interna. Como a membrana mitocondrial interna é relativamente impermeável aos prótons, as moléculas de ATP são geradas à medida que os prótons retornam à matriz mitocondrial, através da enzima ATP-sintase (F_0F_1). A cada dois ou três prótons que passam por essa enzima, observa-se a síntese de uma molécula de ATP a partir de ADP e P_i . Dessa forma, pode-se dizer que a oxidação dos substratos energéticos encontra-se acoplada à síntese de ATP. Porém, existe um “vazamento” intrínseco de prótons para a matriz mitocondrial, cujo retorno é acompanhado da liberação de calor ao invés da síntese de ATP. Admite-se que esse “vazamento” de prótons seja da ordem de 30 a 40%.

A hidrólise do ATP, por sua vez, está associada ao trabalho biológico e sempre que a célula o realiza ocorre hidrólise do ATP e perda de energia na forma de calor.

Nesse sentido, fica claro que os mecanismos celulares e moleculares responsáveis pela produção de calor durante a síntese de ATP são distintos dos mecanismos envolvidos na hidrólise de ATP. Enquanto o primeiro tem relação com o funcionamento da mitocôndria, o segundo está associado ao trabalho celular, sendo influenciado diretamente pelo “*turnover*” de uma série de ciclos iônicos, de substratos e metabólicos, ou seja, de reações que levam ao gasto de ATP.

Pode-se dizer, então, que quase todo calor biológico é um subproduto da transformação de energia em suas diversas formas, sendo decorrente, em última análise, dos processos que envolvem a síntese e hidrólise do ATP, ou seja, quanto mais acelerado for o “*turnover*” de ATP, maior será a produção de calor (BIANCO, 2000).

Procurando-se, então, a origem do desacoplamento mitocondrial descrito anteriormente, foram identificadas algumas proteínas que facilitam a passagem de prótons do espaço inter-membrana para a matriz mitocondrial, denominadas de proteínas desacopladoras mitocondriais (UCPs) (BIANCO, 2000). As UCPs são classificadas nos subtipos UCP-1, UCP-2, UCP-3, os quais diferem tanto em relação a sua distribuição nos tecidos como, também, no que diz respeito a sua função (ROLO & PALMEIRA, 2006).

A UCP-1 expressa na gordura marrom acelera muitas vezes o retorno de prótons para a matriz mitocondrial, fazendo com que a maior parte da energia proveniente do ciclo de Krebs e, por conseguinte, da oxidação dos substratos energéticos, seja perdida na forma de calor (BIANCO, 2000). Tem sido demonstrado, claramente, que uma expressão aumentada de UCP-2 nas células β pancreáticas tem um impacto negativo na GSIS tanto *in vitro* quanto *in vivo*, já que elas diminuem a quantidade de ATP gerado a partir do metabolismo da glicose (ZHANG *et al.*, 2001; LOWELL & SHULMAN, 2005).

As células metabolicamente ativas liberam calor, sendo esse um sinal complexo, resultado do balanço energético de todas as reações bioquímicas ocorridas dentro delas após terem sido estimuladas com, por exemplo, glicose. Como a microcalorimetria não é uma técnica específica, torna-se importante acoplar outras análises, em paralelo, para uma melhor compreensão dos eventos metabólicos desencadeados nas células avaliadas pela microcalorimetria.

4.9) Produção de Lactato pelas ilhotas estimuladas com glicose nas concentrações finais de 2,8 e 16,3 mmol.L⁻¹

A concentração de lactato em nossos experimentos foi determinada após o final de cada corrida no ITC. A equação 2 (*Lactato = Condição + Insulina + Bloco + Condição : Insulina + Condição*) foi usada para verificar quais variáveis poderiam apresentar uma correlação positiva ou negativa na produção de lactato. Constatou-se que a produção de lactato foi afetada unicamente pela concentração de glicose usada para estimular as ilhotas, como pode ser observado no GRAF. 12.

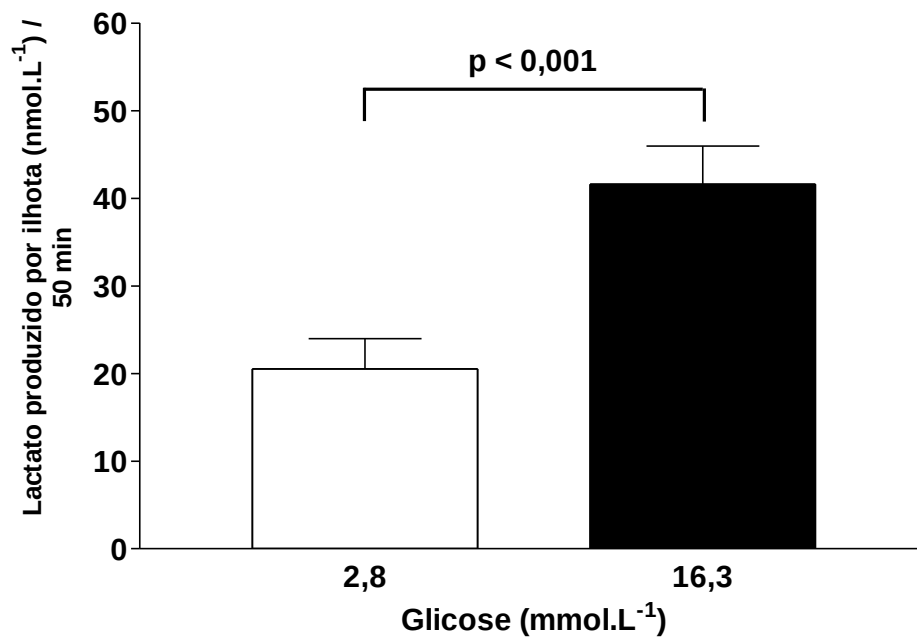


GRÁFICO 12 - Produção de lactato por ilhotas incubadas na presença de glicose em diferentes concentrações. Cada barra representa uma média de 22 experimentos independentes $\pm$ erro padrão.

Em 1970, ASHCROFT e colaboradores, estudando o metabolismo de glicose em ilhotas pancreáticas de camundongos machos albinos, verificaram que as curvas de utilização e oxidação da glicose em função da concentração de glicose no meio extracelular apresentam um padrão sigmoidal, ou seja, até 1mg/mL de glicose, a taxa de oxidação da glicose não sofreu um aumento significativo, porém, concentrações de glicose entre 1 e 1,8 mg/mL levaram a um aumento notável na taxa de oxidação da glicose. Ainda nesse trabalho, foi observado que a taxa de produção de lactato (μ mol de equivalentes de glicose/h por grama de peso seco de ilhota) foi constante durante 3h de incubação e que o aumento da concentração da glicose no meio extracelular, de 0,6 mg/mL para 2,5 ou 3,0 mg/mL, resultou no aumento da produção de lactato de $0,09 \pm 0,018$ para $0,29 \pm 0,026$ nmol de lactato/h por 10 ilhotas, respectivamente. As observações realizadas neste estudo indicaram que a taxa de produção de lactato foi de, aproximadamente, 50% da taxa de oxidação da glicose.

SENNER e colaboradores (1976), estudando o metabolismo de glicose em ilhotas pancreáticas de ratos, verificaram que a maior parte da glicose utilizada é responsável pela produção de lactato, que ocorreu a uma taxa constante durante um período de 90 minutos de incubação. Pelo fato da medida de produção de lactato

não depender da disponibilidade de substrato marcado, ela foi usada como um índice da taxa de glicólise promovida nas ilhotas por diferentes açúcares (SENNER *et al.*, 1976).

O balanço entre a glicólise aeróbica e a anaeróbica reflete a proporção de oxidação mitocondrial e a redução do piruvato pela lactato desidrogenase citoplasmática, respectivamente. Em 1998, TAMARIT-RODRIGUEZ e colaboradores estudaram esse balanço medindo a produção de lactato, a oxidação da glicose e toda a utilização da glicose em ilhotas de ratos e de camundongos obesos estimulados com diferentes concentrações de glicose. A produção de lactato já alcançou o máximo, mesmo a baixas concentrações de glicose, e taxas máximas de produção de lactato foram obtidas com aproximadamente 0,3 mmol/L de glicose. Entretanto, esses resultados contrastam claramente com aqueles obtidos nos estudos prévios, que reportam valores muito mais altos. Tais divergências podem, pelo menos em alguma extensão, ser atribuídas a diferenças nos métodos empregados para determinação do lactato, além de que eles não contaram com a relativa falta de especificidade da lactato desidrogenase, que parece superestimar a conversão de lactato em glicose nas ilhotas. Um outro fator que aponta para essa variação nos valores dos níveis de lactato pode ser atribuído, no mínimo em parte, a diferenças nos tamanhos das ilhotas, uma vez que vários desses estudos têm expressado seus valores por ilhota.

A observação de que a produção de lactato foi maior que a utilização da glicose a baixas concentrações desse carboidrato aponta para a possibilidade das ilhotas utilizarem outros substratos metabólicos tais como ácidos graxos e glutamina, além da glicose adicionada, para a produção de lactato.

Pelo fato de que as ilhotas retiradas do ITC ao final do experimento estar, em sua extensa maioria, morfológicamente viáveis quando coradas com laranja de acridina (células vivas em verde) e iodeto de propídeo (células mortas em vermelho) e mantendo sua estrutura íntegra, pode-se inferir que a produção de lactato, descrita anteriormente por ASHCROFT e colaboradores (1970) e SENNER e colaboradores (1976), funciona como um indicador do metabolismo nas ilhotas submetidas ao GSIS no ITC.

4.10) Secreção de insulina e sua relação com o calor metabólico

Do ponto de vista fisiológico, quando os níveis de glicose no sangue estão elevados, a glicose é rapidamente equilibrada através das células β , via transportador de glicose GLUT-2, e é retida no interior da célula após sua fosforilação pela glicoquinase. O metabolismo subsequente da glicose pela glicólise e pelas mitocôndrias promove mudanças nas concentrações intracelulares de ATP que resultam no fechamento dos canais de K_{ATP} . Isso produz uma despolarização na membrana que abre os canais de Ca^{2+} , iniciando a atividade elétrica nas células β e o influxo de cálcio. O aumento subsequente nas $[Ca^{2+}]_i$ desencadeia a secreção de insulina (WIEDERKEHR & WOLLHEIM, 2006; ASHCROFT, 2006).

A melhor e mais reconhecida via para acessar a função de ilhotas de Langerhans *in vitro* é a sua capacidade de secretar insulina em resposta à estimulação pela glicose. Essa resposta fisiológica a variações de glicose indica que as ilhotas isoladas têm mantido a sua capacidade de metabolizar a glicose, além de sintetizar e secretar proteínas (HOLMES *et al.*, 1995), ambas, pré-requisitos para a função normal das ilhotas após o transplante.

Assim, conforme podemos observar no GRAF. 13, a insulina presente nos sobrenadantes nas suspensões de ilhotas que foram submetidas ao GSIS no ITC foi quantificada utilizando-se a técnica de radioimunoensaio para dosagem de insulina.

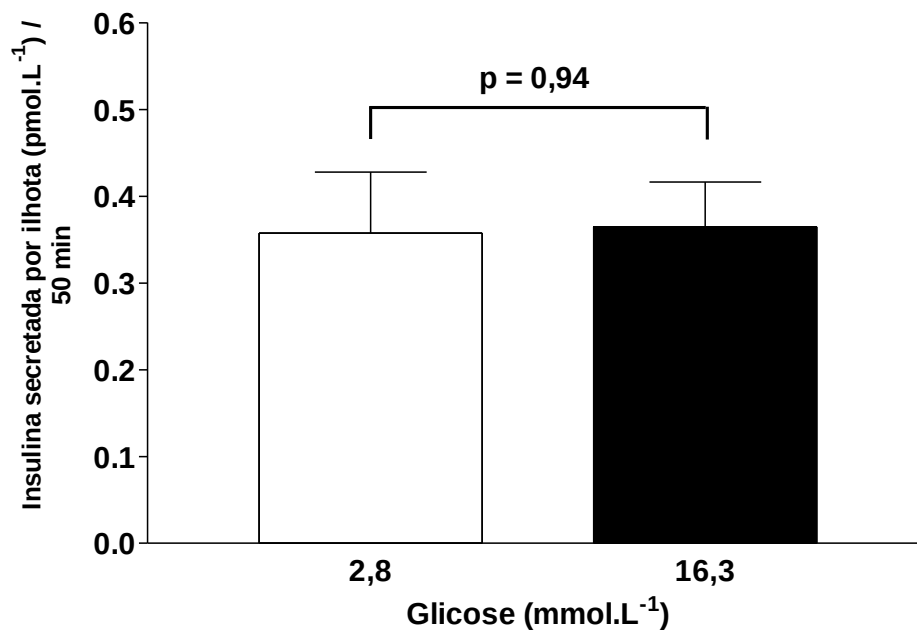


GRÁFICO 13 - Produção de insulina por ilhotas incubadas na presença de glicose em diferentes concentrações. Cada barra representa uma média de 22 experimentos independentes $\pm$ erro padrão.

Como mostrado no GRAF. 13, os valores médios de Insulina secretada por ilhota são estatisticamente iguais nas duas concentrações de glicose testadas. Esses valores são médias globais nas condições testadas de todas as amostras biológicas testadas em baixa e alta concentração de glicose e mostram a natural variabilidade de respostas biológicas. No entanto, ao se fazer a análise estatística de uma forma global, perde-se uma importantíssima informação: o que se pretende avaliar no teste de funcionalidade das ilhotas é o relativo valor dos parâmetros testados (calor liberado, insulina secretada e lactato) nas condições de baixa (2,8 mmol.L⁻¹) e alta (16,3 mmol.L⁻¹) concentração de glicose para a mesma preparação de ilhotas de Langerhans. Portanto, faz-se necessário avaliar as razões médias desses parâmetros em alta e baixa concentração de glicose, como mostrado no GRAF. 14:

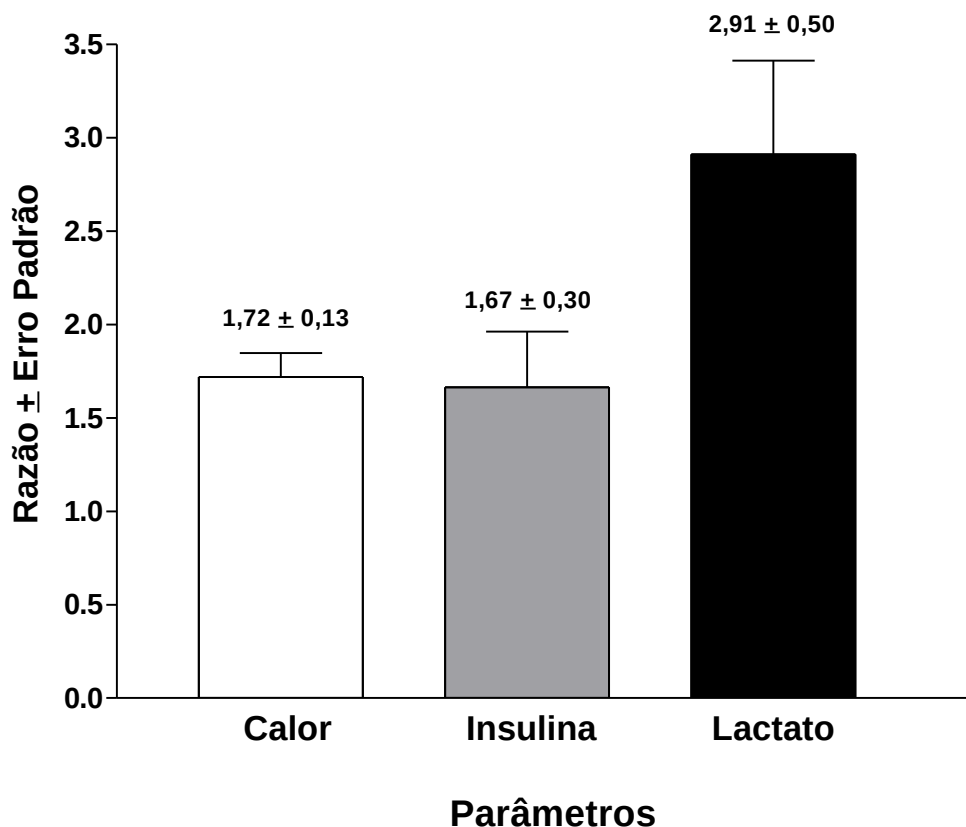


GRÁFICO 14 - Razões dos parâmetros Calor liberado, Insulina secretada e de Lactato produzido para a mesma preparação de Ilhotas de Langerhans submetida à glicose em diferentes concentrações (parâmetro 16,3 mmol.L⁻¹ / parâmetro 2,8 mmol.L⁻¹). Cada barra representa uma média de 22 experimentos ± erro padrão.

Pode-se observar no GRAF. 14 que os três parâmetros mostram razões significativamente maiores que a unidade, particularmente para a insulina (razão = 1,67 ± 0,30), a despeito das médias globais dos valores para alta e baixa concentração de glicose serem semelhantes para esse parâmetro (GRAF. 12). Também chama a atenção o valor da razão para calor liberado (1,72 ± 0,13) ser semelhante ao valor da razão para insulina liberada; isto pode ser uma coincidência apenas, mas levanta a possibilidade do índice (ou razão) do calor liberado substituir o índice (ou razão) de insulina secretada na avaliação da viabilidade das ilhotas de Langerhans. O índice (ou razão) de lactato mostrou um valor um pouco maior (2,91 ± 0,50), que pode sugerir uma menor utilização da glicose por vias oxidativas aeróbicas e uma maior utilização da via glicolítica quando as ilhotas são submetidas à alta concentração de glicose. Os valores observados dos índices são compatíveis com valores descritos na literatura.

4.11) Avaliação da viabilidade de ilhotas de Langerhans

O transplante de ilhotas de Langerhans para o tratamento do *diabetes mellitus* tipo 1 é um procedimento fisiologicamente vantajoso e minimamente invasor, que permite um controle mais fisiológico do metabolismo de glicose que a terapia de administração de insulina exógena, ajudando a impedir o desenvolvimento das complicações secundárias do diabetes (RYAN *et al.*, 2001; INVERARDI *et al.*, 2003; RICCORDI, 2003). Porém, apesar da relativa facilidade em se quantificar o verdadeiro número de ilhotas a ser transplantado, ainda é difícil avaliar a viabilidade das ilhotas isoladas e assegurar que as ilhotas viáveis corresponderão ao êxito no transplante (TITUS *et al.*, 2000).

Vários métodos têm surgido para acessar a viabilidade e a função de preparações de ilhotas humanas. A prática atual inclui a quantificação das ilhotas (abrangendo medidas da pureza da preparação e do número de ilhotas) e a avaliação da viabilidade das ilhotas, através de ensaios de coloração para verificar a integridade da membrana. Adicionalmente, a GSIS por ilhotas purificadas pode ser realizada usando ensaios de incubação estática ou estudos de perfusão. O índice de estimulação é calculado como uma razão entre a quantidade de insulina secretada durante a incubação das ilhotas em meio contendo 20 mmol.L⁻¹ e a insulina secretada em meio contendo glicose na concentração de 2,8 mmol.L⁻¹. Os ensaios de perfusão para avaliar a secreção de insulina estimulada pela glicose são considerados como padrão, sendo utilizados em todo o mundo para avaliar a viabilidade das ilhotas. Índices de estimulação variando de 2 a 4 são considerados ideais para o transplante (MERANI & SHAPIRO, 2006). Esses valores indicam que ilhotas isoladas preservaram sua capacidade de realizar o metabolismo da glicose, a síntese e a secreção de proteínas (HOLMES *et al.*, 1995), processos cruciais que devem estar intactos nas ilhotas a serem usadas no transplante.

Métodos indiretos, utilizados rotineiramente para quantificar os níveis de insulina secretada pelas células β , tais como ELISA (ensaio enzimático de imuno-adsorção) e RIA (radioimunoensaio), usualmente requerem longos períodos de tempo para seu processamento completo (ISHII *et al.*, 2004). No entanto, o principal problema de usar tais métodos é o achado de que preparações de ilhotas que falharam em reverter o diabetes foram indistinguíveis daquelas que resultaram numa excelente função, considerando-se os seus índices de estimulação. Têm sido

relatadas falhas ocorrendo nos períodos logo após o transplante. O desapontamento decorrente dessa observação poderia estar relacionado ao uso de preparações que apresentaram uma qualidade sub-ótima (TITUS *et al.*, 2000). Testes de corantes que se incorporam ao DNA revelam somente se as células perderam sua seletividade na membrana. Já a coloração com ditizona fornece unicamente uma estimativa do conteúdo de insulina nas preparações das ilhotas.

O teste que antecede ao transplante, e que afere com maior fidelidade o estado funcional das ilhotas, consiste na reversão do diabetes em camundongos imunodeficientes que receberam o transplante de ilhotas previamente isoladas. Entretanto, vários dias são requeridos para avaliar o resultado, tornando-o um procedimento impraticável como critério para acessar a qualidade de uma dada preparação de ilhotas (SHAPIRO *et al.*, 2003; AULT, 2003; ICHII *et al.*, 2005).

Dados da literatura demonstram que a Microcalorimetria de Titulação Isotérmica é uma técnica altamente acurada para caracterização das interações de ligação de macromoléculas biológicas, permitindo medir afinidades em uma grande variedade de interações bioquímicas. Aliado a isso, uma das grandes vantagens dessa metodologia é o fato de permitir o estudo de interações entre macromoléculas na sua forma “*nativa*” (DOYLE, 1997; PIERCE *et al.*, 1999; TALHOUT & ENGBERTS, 2001).

Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que o ensaio microcalorimétrico é um método excelente para avaliar a viabilidade de ilhotas isoladas de ratos. A avaliação completa requer aproximadamente 5 horas, constituindo uma redução substancial no tempo requerido para obter os resultados, quando comparado ao RIA ou ELISA. Foi também demonstrado que o ITC é proveitoso para os estudos do metabolismo de ilhotas, uma vez que observamos uma forte correlação entre a produção de calor e a concentração de glicose usada para estimular as células. A estimulação com glicose está correlacionada, também, com a produção de lactato pelas ilhotas, sugerindo que o aumento na produção de calor, em resposta ao aumento da concentração de glicose, pode ser devido a um aumento do fluxo glicolítico.

Em contraste com outros métodos, o ITC evitou resultados falso-negativos, uma vez que as ilhotas estavam metabolicamente ativas e aparentemente sem danos nas vias de sinalização da glicose e/ou nos mecanismos de secreção de insulina. A estimulação das ilhotas com glicose na concentração de 16,3 mmol.L⁻¹

aumentou tanto a liberação de calor e a produção de lactato, quanto a secreção de insulina, desde que se avaliem as razões (ou índices) dos parâmetros da mesma preparação. Pode-se verificar que a utilização do Microcalorímetro de Titulação Isotérmica mostrou ser um método aplicável na rotina de avaliação da viabilidade das ilhotas de Langerhans. O valor da razão para calor liberado ($1,72 \pm 0,13$) foi semelhante ao valor da razão para insulina liberada ($1,67 \pm 0,30$), o que deu forte apoio à hipótese inicial deste trabalho: a possibilidade do índice (ou razão) do calor liberado poder substituir o índice (ou razão) de insulina secretada na avaliação da viabilidade das ilhotas de Langerhans. Fica como uma importante perspectiva deste trabalho testar essa hipótese em transplantes de ilhotas de Langerhans em humanos.

5- CONCLUSÕES

5.1) A utilização da Microcalorimetria de Titulação Isotérmica para estudar o metabolismo de células demonstrou ser viável e eficiente nos experimentos preliminares realizados com promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*.

5.2) O fluxo de calor liberado por promastigota de *Leishmania (L.) amazonensis* aumentou à medida que essas células foram incubadas em concentrações crescentes de frutose.

5.3) O processo utilizado para obtenção de ilhotas de Langerhans demonstrou ser adequado para os experimentos de microcalorimetria.

5.4) Nos ensaios microcalorimétricos com ilhotas de Langerhans ficou evidente o aumento significativo do calor metabólico produzido pelas ilhotas da mesma preparação submetidas às concentrações 2,8 e 16,3 mmol.L⁻¹ de glicose.

5.5) Por meio desses estudos foi possível demonstrar a aplicação do uso do Microcalorímetro de Titulação Isotérmica para avaliação do metabolismo celular de ilhotas pancreáticas e de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*.

6- PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste trabalho abrem novas perspectivas para realizar o GSIS no ITC sob diferentes condições, como a seguir:

- Utilizando-se inibidores metabólicos da secreção de insulina, tais como a aldoheptose D-manoeptulose, inibidor competitivo da fosforilação da glicose pela hexoquinase e glicoquinase e a iodoacetamida, que inibe a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, para avaliar a produção de calor e a secreção de insulina nessas ilhotas.

- Utilizando-se altas concentrações de K^+ .

- Na presença de proteínas desacopladoras.

- Adicionando, ao meio de incubação, agentes que aumentam a secreção de insulina, tais como cafeína e IBMX (3-isobutil-1-metilxantina).

- Utilizando-se outras drogas que promovam a secreção de insulina como, por exemplo, tolbutamida.

- Utilizando-se drogas que inibam, por exemplo, os canais de cálcio do tipo L e comparar os perfis dos termogramas gerados nessa condição com aqueles resultantes na ausência do inibidor a fim de se compreender melhor a relação entre calor liberado x secreção de insulina.

- Utilizando-se culturas de ilhotas ricas em células β .

- Implementar o GSIS no ITC nas ilhotas humanas isoladas, na Unidade de Ilhotas Pancreáticas Humanas do Departamento de Bioquímica no Instituto de Química da USP, e destinadas ao transplante em pacientes diabéticos e comparar os resultados adquiridos na microcalorimetria com os índices de glicose alcançados nos pacientes transplantados.

- Utilizando-se ilhotas pancreáticas encapsuladas em material biocompatível a ser realizado em colaboração com a Professora Doutora Mari Cleide Sogayar do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP).

- Avaliar a possibilidade de se requerer um pedido patente recomendando o uso do ITC para avaliar o metabolismo celular.

Brazilian Journal of Medical and Biological Research (2005) 38: 1593-1601
ISSN 0100-879X

Thermodynamic evaluation and modeling of proton and water exchange associated with benzamidine and berenil binding to β -trypsin

M.T. Pereira^{1,2},
J.M. Silva-Alves²,
A. Martins-José³,
J.C.D. Lopes³
and M.M. Santoro²

¹Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear,
²Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas,
³NEQUIM, Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas,
Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

Abstract

Correspondence

M.M. Santoro
Departamento de Bioquímica e
Imunologia, UFMG
Av. Antonio Carlos, 6627
31270-901 Belo Horizonte, MG
Brasil
E-mail: santoro@icb.ufmg.br

Received September 22, 2004
Accepted July 28, 2005

Serine-proteases are involved in vital processes in virtually all species. They are important targets for researchers studying the relationships between protein structure and activity, for the rational design of new pharmaceuticals. Trypsin was used as a model to assess a possible differential contribution of hydration water to the binding of two synthetic inhibitors. Thermodynamic parameters for the association of bovine β -trypsin (homogeneous material, observed $23,294.4 \pm 0.2$ Da, theoretical $23,292.5$ Da) with the inhibitors benzamidine and berenil at pH 8.0, 25°C and with 25 mM CaCl_2 , were determined using isothermal titration calorimetry and the osmotic stress method. The association constant for berenil was about 12 times higher compared to the one for benzamidine (binding constants are $K = 596,599 \pm 25,057$ and $49,513 \pm 2,732 \text{ M}^{-1}$, respectively; the number of binding sites is the same for both ligands, $N = 0.99 \pm 0.05$). Apparently the driving force responsible for this large difference of affinity is not due to hydrophobic interactions because the variation in heat capacity (ΔC_p), a characteristic signature of these interactions, was similar in both systems tested (-464.7 ± 23.9 and $-477.1 \pm 86.8 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ for berenil and benzamidine, respectively). The results also indicated that the enzyme has a net gain of about 21 water molecules regardless of the inhibitor tested. It was shown that the difference in affinity could be due to a larger number of interactions between berenil and the enzyme based on computational modeling. The data support the view that pharmaceuticals derived from benzamidine that enable hydrogen bond formation outside the catalytic binding pocket of β -trypsin may result in more effective inhibitors.

Key words

- Benzamidine
- Berenil
- Calorimetry
- Protein modeling
- Trypsin
- Osmotic stress

Introduction

The objectives of the study of the interactions of proteins with ligands are to increase our understanding of their function, their importance in physiological processes, the

causes of their deregulation and, especially, their participation in the control of pathological processes. A logical by-product of these studies is the development of more effective pharmaceuticals and their use in technological applications. Valuable infor-

mation about the relationship between protein structure and activity has been obtained in X-ray crystallography studies on many proteins and with modern bioinformatic techniques (1). Complex molecular organizations can now be studied at the atomic level. The notion that proteins craft well-defined binding sites that are custom-tailored to their ligand remains central to analyses of biological recognition and drug discovery (2). Nevertheless, the contact between a protein and its coupling with any other co-solute cannot be explained based on random steric interactions. Different forms of electrostatic forces necessarily act in intermolecular or interatomic interactions (3), reflecting on the catalytic efficacy of an enzyme or the specificity of any protein.

β -Trypsin was chosen for the present study due to its importance as a protease model for the serine-protease class. Proteins of this class play an important role in physiological and pathological processes (4). Furthermore, trypsin is reasonably stable and relatively easy to obtain and purify. It was considered to be an exclusively digestive enzyme expressed in the pancreas (5), where it is produced as the zymogen trypsinogen. Four trypsinogen isoforms are known so far: trypsinogen 1 or cationic trypsinogen, trypsinogen 2 or anionic trypsinogen, trypsinogen 3 or mesotrypsinogen (6), and trypsinogen 4, identified in brain cells (7). Several diseases are associated with deregulation of the cationic form, especially pancreatitis (8). Recent studies have shown that trypsin is widely expressed at low levels in various non-pancreatic epithelial tissues, vascular endothelial cells, leukocytes, and neurons, and is overexpressed in some kinds of cancer cells and tissues (9,10).

Cationic pancreatic trypsinogen originates the β -trypsin isoform after a hydrolysis that liberates the first six residues of the peptide chain. Additional cleavages produce the isoforms ψ , α , γ , δ , and others with decreasing amidase activity (11). This au-

tolytic process can regulate the activity of the enzyme which is also exerted through natural inhibitors such as bovine pancreatic trypsin inhibitor and several others described in the literature. After zymogen cleavage, the active β -trypsin form acquires higher plasticity, maintaining the spatial distribution of the several segments practically intact (12). Differential scanning calorimetry characterization at acid pH plus the pH titration of native and unfolded forms allowed the estimation of the stability of this enzyme at acid and neutral pH (13).

Data obtained by computational techniques, spectroscopy or established laboratory methods have provided more information on the interactions between solutes and solvent. The involvement of water molecules, helping to define conformational states of the protein through hydrogen bonds, is very important because intra- and intermolecular interactions can modulate the elasticity and plasticity of proteins, which are fundamental for their action (14-16). The involvement of hydration water molecules, by inclusion or exclusion, has been considered to be a driving force in the interactions involving low charge complementarities (17). Binding of water to hemoglobin, for example, is the determinant step in the mechanism of allosteric regulation (18). An analytical method known as osmotic stress has been developed based on this inclusion/exclusion process for situations of low macromolecular concentrations (19-21), being extensively applied to analyze the hydration water evolved in the interaction of macromolecules (19,22).

Isothermal titration microcalorimetry and the osmotic stress method with thermodynamic parameters were used in the present study to see how benzamidine and berenil (Figure 1), two structurally distinct but chemically similar low-molecular weight synthetic inhibitors, interact with bovine cationic β -trypsin. Benzamidine is known to be a competitive inhibitor of trypsin. It is also considered to be a model compound for the basic

amino acids that represent the primary specificity of this enzyme (23). The results obtained for berenil are compared to those for benzamidine. The involvement of water molecules and protons associated with the binding of these inhibitors is also described.

Material and Methods

Purification of β -trypsin

A commercial bovine trypsin (Sigma®, St. Louis, MO, USA) was submitted to chromatography (730 ml on a 50-cm high column, 4 cm in inner diameter) with SE-Sephadex-C50 and eluted with 50 mM sodium formate. The pH was adjusted to 3.50 with formic acid. The enzyme was eluted with a linear increasing NaCl gradient (0.1 to 0.3 M), containing 25 mM CaCl_2 and 1 mM benzamidine. The active fractions containing β -trypsin were identified (24) and combined. The pool was lyophilized, resuspended in 1 mM HCl, dialyzed for 4 h against the same solution, and for another 2 h in milliQ water at 4°C in both cases. All low-molecular weight components were thus eliminated from the pooled effluent. The pooled effluent was lyophilized once more and 2.5- to 3.0-mg aliquots of the enzyme were stored at -10°C until use. When necessary, the fraction was dissolved in the desired buffer in an ice bath immediately before each experiment, in volumes reaching final concentrations of about 1.0 to 3.0 mg/ml. Concentrations were determined by absorbance measurements at 280 nm with the molar extinction coefficient of $37,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (25). Titration of active sites were performed with p-nitrophenyl-p-guanidinobenzoate-HCl (26). One sample was then submitted to mass spectrometry to confirm β -trypsin homogeneity.

Microcalorimetry

Titration of enzyme-inhibitor interactions

was carried out with an isothermal titration calorimeter (VP-ITC, MicroCal LLC, Northampton, MA, USA) (usable cell volume of 1.42 ml), using Pipes, HEPES, tricine and Tris buffers (50 mM, with 25 mM CaCl_2 , pH 8.0). Benzamidine or berenil concentrations were determined during the experiment by the injection and data acquisition procedure according to the equipment manual. Briefly: $[\text{L}] > 30[\text{Enz}]$; an initial injection of 1 μl was discarded, and 20 to 30 injections of 3-5 μl resulted in the complete saturation of the enzyme binding site. The data were analyzed by fitting a single-site binding isotherm (27). After a single experiment at controlled temperature, the following parameters were determined: the reaction equilibrium constant and consequently the variation of Gibbs energy (ΔG_{bind}), the stoichiometric relationship between the reagent species, or the number of binding sites concerning the association between proteins and ligands, and the enthalpy variation of the association (ΔH_{bind}). The entropy variation of the association (ΔS_{bind}) was then calculated.

Osmotic stress

Osmotic stress experiments were carried out with β -trypsin and the inhibitors benzamidine and berenil (50 mM Tris, with 25 mM CaCl_2 , pH 8.0, at 25°C). Two sets of isothermal titration calorimetry experiments were performed for each inhibitor with concentrations of glucose or glycine ranging

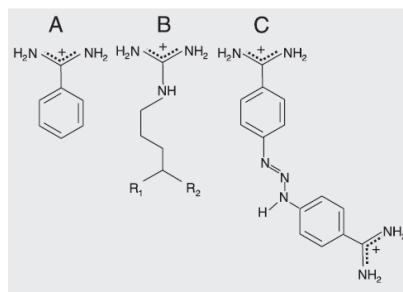


Figure 1. Structures of benzamidine (A), side chain of arginine (B) and berenil (C).

from 0.25 to 1.00 osm, here used as compatible osmolites.

Docking and minimization

The complexes between β -trypsin and the ligands berenil, p-aminobenzamidine and benzamidine were formed by replacing the benzamidine contained in the crystallographic structure deposited in the Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>) PDB ID 1CE5), using the superimposal procedure of the INSIGHTII program (MSI). The ligand charges were calculated by the MNDO method from the MOPAC package (28). The complexes thus constructed were studied with the AutoDock program, version 3.0 (29), using a method based on the Genetic Algorithm to search for the best position for the ligands at the active site of β -trypsin. One hundred genetic algorithm runs were used, with a population of 50 individuals, a gene mutation rate of 0.02 and crossover rates of 0.8. The affinity grid was centered at Ser¹⁹⁵ with dimensions of 48 x 48 x 48 Å and a grid spacing of 0.5 Å, including the catalytic site and its surroundings (16). The most stable conformation according to the docking energy was transferred to the SYBYL program (30) in which optimization of the geometry of the complexes and of the isolated ligands and trypsin was performed. The 4.0 value was used for the distance-dependent dielectric constant, with a cutoff of 14.0 Å.

Results and Discussion

The participation of water molecules not as a solvent but as an adjuvant in protein action has deserved special attention in the last few years (31). The degree of hydration seems to define states of higher or lower structural flexibility for the protein (17). It was proposed that about 300 water molecules are associated with trypsin (32). A recent study from our laboratory (33) dem-

onstrated, on the basis of the variation of the Stokes radius, the occurrence of an intermediate state between native and denatured forms, a molten globule. It was estimated that 770 associated water molecules occur if the variation in the volume of the protein is due only to included/excluded water molecules.

Titration of the enzyme with the ligands benzamidine and berenil were performed on purified β -trypsin. A typical isotherm of these titrations is shown in Figure 2. ΔG , ΔH , ΔS and the stoichiometric relationships for the experiments in Tris buffer are shown in Table 1. These results refer to 0.0 osm (without any addition of co-solute or osmolite). The results for ΔG in the titration with benzamidine confirm literature data regarding this parameter (23,25,34). It is noteworthy that the value of the association constant for berenil was 12 times higher than the constant for benzamidine.

Some energetic contribution (absorbed or released heat) specific for the ionization/association process may contribute to the effects of the enzyme-ligand association itself. Such a contribution, or dependence of the observed result, can be a consequence of association/dissociation processes of ionizable groups in the enzyme, exchanged with the buffer. The variation in the protonation state of the residues involved in the association process can be obtained from the number of protons exchanged between the enzyme and the buffer by the linked Wyman equation (19,35): $\Delta H_{\text{obs}} = \Delta H_{\text{bind}} + nH^+ \times \Delta H_{\text{dis}}$, where ΔH_{obs} is the value measured in the experiment, ΔH_{bind} is the enthalpy value of the enzyme-inhibitor association itself, nH^+ corresponds to the number of protons exchanged, and ΔH_{dis} corresponds to the values of the variation in the enthalpy of the ionization of the buffers. ΔH_{bind} and nH^+ can be calculated from the intercept and the slope of the curve in the graphic representation of ΔH_{obs} versus ΔH_{dis} . The titrations were performed in four different buffers covering a

wide range of enthalpy of the proton dissociation (ΔH_{dis}) interval: Pipes ($\Delta H_{\text{dis}} = 11.45$ kJ/mol); HEPES ($\Delta H_{\text{dis}} = 21.01$ kJ/mol); tricine ($\Delta H_{\text{dis}} = 31.96$ kJ/mol), and Tris ($\Delta H_{\text{dis}} = 47.53$ kJ/mol) (36). For the experiments (graph not shown) with benzamidine, we found that $\Delta H_{\text{bind}} = -16.78 \pm 0.80$ and $nH^+ = 0.037 \pm 0.026$ kJ/mol, and for the experiments with berenil $\Delta H_{\text{bind}} = -18.20 \pm 3.78$ and $nH^+ = 0.007 \pm 0.12$ kJ/mol. These results indicate that there is no association or dissociation of acidic groups during binding of the two ligands.

The results shown in Table 1 (lines corresponding to 0.00 osm) indicate that there is a favorable enthalpic and entropic contribution to the formation of the β -trypsin-inhibitor complex. The enthalpic contribution can be analyzed on the basis of the equation $\delta\Delta H = \Delta C_p \times \delta T$ which, after integration, becomes: $\Delta H = \Delta C_p \times T + \text{one constant}$, for ΔC_p constant in the temperature interval studied. The calculated values for the change in the heat capacity for the β -trypsin-inhibitor associations in Tris buffer are (graph not shown): $\Delta C_p = -477.1 \pm 86.8$ J K⁻¹ mol⁻¹ for benzamidine, and $\Delta C_p = -464.7 \pm 23.9$ J K⁻¹ mol⁻¹ for berenil. It should be observed that the value of ΔS obtained in the absence of the osmolyte (Table 1) is about 10 to 20 times lower than these ΔC_p values.

As a consequence of the relationships of ΔH , ΔS and T with ΔG , and of ΔH with T , $\delta\Delta H/\delta T = \Delta C_p$ and $\delta(T\Delta S)/\delta T = \Delta C_p + \Delta S$. When ΔS becomes negligible with respect to ΔC_p the dependence of ΔH and $T\Delta S$ becomes a constant factor equal to ΔC_p , and ΔG becomes relatively independent of T . This is shown both by the benzamidine and berenil associations with β -trypsin, as can be observed in Figure 3. The temperatures at which the ΔH and ΔS parameters become zero, T_H and T_S respectively, were calculated from the graphs: $T_H = -3.6^\circ\text{C}$ and $T_S = 62.3^\circ\text{C}$ for benzamidine, and $T_H = -11.9^\circ\text{C}$ and $T_S = 58.4^\circ\text{C}$ for berenil.

The well-known effect of water mol-

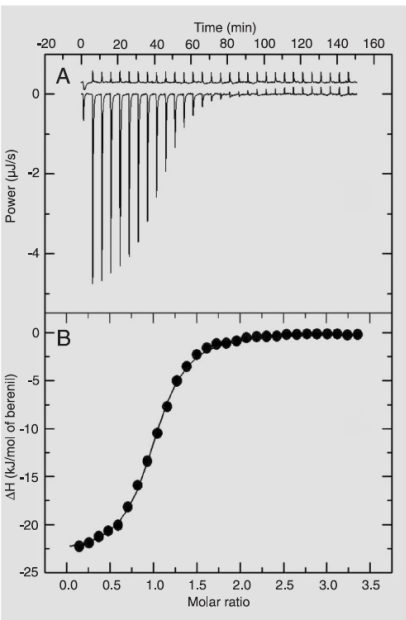


Figure 2. Isothermal titration calorimetry of β -trypsin with berenil. The data in this figure were obtained in 50 mM Tris buffer, with 25 mM CaCl_2 , at pH 8.0, 25°C . A, The lower trace shows the raw data for the titration and the upper trace shows the heat of dilution of the berenil. B, Net isotherm of the titration obtained by subtracting the gross value of heat at each titration point by the linear regression of the dilution heat data of berenil.

Table 1. Energetic parameters of binding of the inhibitors benzamidine and berenil to β -trypsin.

	Osmolality (osm)	N	ΔG (kJ/mol)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J mol ⁻¹ K ⁻¹)
Benzamidine as ligand					
Glycine as osmolyte	0.00	0.957	-26.79	-15.17	38.99
	0.25	1.033	-26.84	-12.53	48.02
	0.50	1.028	-26.13	-7.08	63.93
	1.00	0.954	-25.70	-6.48	64.50
Glucose as osmolyte	0.00	0.957	-26.79	-15.17	38.99
	0.38	1.126	-26.74	-15.15	38.89
	0.75	0.986	-26.17	-11.44	49.43
Berenil as ligand					
Glycine as osmolyte	0.00	0.990	-32.95	-17.16	52.98
	0.38	0.993	-32.81	-12.33	68.72
	0.75	0.994	-32.17	-12.31	66.64
	1.00	0.909	-32.18	-10.03	74.36
Glucose as osmolyte	0.00	0.990	-32.95	-17.16	52.98
	0.25	0.961	-32.17	-18.33	46.44
	0.50	0.945	-31.96	-14.10	59.93
	1.00	0.991	-32.23	-10.50	72.92

Although the osmolytes glycine and glucose have opposite effects on the dielectric constant of water, they have similar effects on the thermodynamic parameters of the binding process of the competitive inhibitors to β -trypsin. N = number of sites in the enzyme; ΔG = variation of Gibbs energy; ΔH = enthalpy variation; ΔS = entropy variation.

ecules on the structure (15,16) and function of proteins, influencing the macromolecular dynamics, allows additional insight into the energetic aspects involved in the enzyme-inhibitor interaction. This was done using the osmotic stress method (19-21). With the Gibbs-Duhem equation it can be demonstrated that, for a protein at infinite dilution (21) $d\Delta G = -\Delta N_{ew}d\mu_w$. In this equation ΔN_{ew} is the variation in the number of water molecules in the final macromolecular state minus the number in the initial state, ew is the deficit or excess of water molecules, and μ_w is the chemical potential of the water or another equivalent parameter. The equation can be written as $d\ln K/d\ln a_w = \Delta N_{ew} = N_w^{EI} - (N_w^E + N_w^I)$. In this equation N_w^{EI} is the number of water molecules associated with the complex formed and N_w^E and N_w^I are the number of water molecules associated with the enzyme and with the inhibitor in the bath, respectively. The results obtained from the osmotic stress analyses are shown in Table

1. The utilization of glucose and glycine as osmolites follows the strategy of Colombo and Bonilla-Rodriguez (37), in order to exclude a possible interference due to a change in the dielectric constant of the solution, since the two osmolites have opposite effects on this property. The data for each inhibitor as a function of the chemical potential of water were plotted and resulted in the same slopes within the experimental error. Consequently they resulted in an equal number of water molecules, regardless of the osmolite and the inhibitor tested. Because of this similarity and for a better statistical alignment of the results the values for the equilibrium constants were normalized and plotted; only one regression was calculated, as shown in Figure 4. From the slope of this curve the number of water molecules taken up from the bulk water during binding was estimated at 21.1 ± 3.4 . Surfaces topologically distant from the catalytic site (16) are considered to be active participants in this inclusion. According to Parsegian et al. (20), "this result is characteristic of reactions with changes in the number of waters that are sequestered in sterically inaccessible pockets or cavities". Enzymes are known to be more stable when substrates and competitive inhibitors are present, and a tightening of the enzyme is linked to the formation of the corresponding adducts. In fact, the result observed, inclusion, involves the participation of distant surfaces in the process of inhibitor binding to the catalytic pocket *per se* since the exclusion of at least five water molecules would be expected to occur. According to computational modeling (38), the volume occupied by the side chain of arginine corresponds to the volume of six water molecules, while the corresponding volume for the lysine side chain is equivalent to five water molecules; in the latter case one water molecule stays in the catalytic pocket to compensate for a smaller side chain (16).

Theoretical studies of the binding of these two inhibitors to the enzyme were carried

Figure 3. Dependence of ΔG and ΔH on $T\Delta S$. Symbols: Circles for the β -trypsin-benzamidine systems and triangles for the β -trypsin-berenil systems. The filled symbols indicate ΔH values and the open symbols indicate ΔG values. ΔG = variation of Gibbs energy; ΔH = enthalpy variation; $T\Delta S$ = temperature times entropy variation.

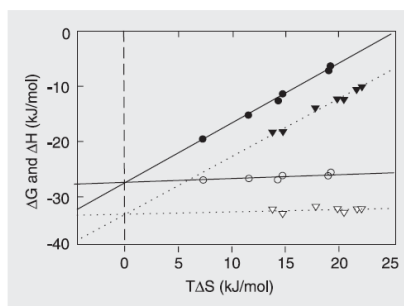
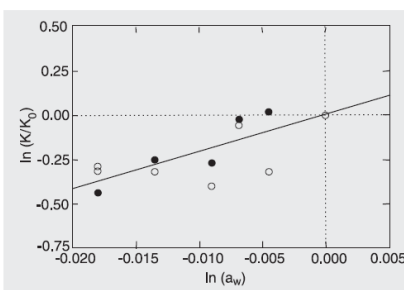


Figure 4. Dependence of $\ln(K/K_0)$ on the formation of the complex of β -trypsin with the inhibitors benzamidine and berenil as a function of the water activity ($\ln a_w$). Data referring to each inhibitor-osmolite set were normalized. The value of the slope is 21 ± 3.4 water molecules and the correlation coefficient is $r^2 = 0.881$. Filled circles indicate data for benzamidine, and open circles indicate data for berenil.



out hoping to use modeling data to explain the difference in the affinities of benzamidine and berenil for β -trypsin. Furthermore, p-aminobenzamidine was included in the analysis because some experimental data are available in the literature (25,34), and because its structure is related to those of the two ligands under study. Using the AutoDock and the SYBYL programs, the complexes formed between β -trypsin (R) and the mentioned inhibitors (L) were optimized (RL); the energies of the enzyme and the ligands isolated in the pharmacophoric conformation were evaluated (Ri and Li, respectively) as also were the energies after optimization of the geometries (Rf and Lf, respectively). These results are shown in Table 2, which also shows the values for energies of perturbation (Ep), interaction (Ei), and binding (Eb), calculated according to the following equations: $Ep = EpR + EpL = (Rf - Ri) + (Lf - Li)$; $Ei = RL - Ri - Li$ and $Eb = Ei + Ep$.

The calculated energies (Ep, Ei and Eb) for benzamidine and p-aminobenzamidine are reasonably coincident, which is the result of the structural similarity of the two compounds. Among the calculated binding energies, only berenil had a negative value. This is due to the kind of perturbations caused by the other two ligands at the binding site of trypsin (EpR), according to the force field applied. The calculated energies reflect only the intermolecular interaction between the ligand and enzyme, after optimization with the SYBYL package. It is also worth noting that berenil exhibits the highest interaction energy. The fact that the benzamidine interaction energy was slightly more favorable than that of p-aminobenzamidine can be explained on the dispersion of the positive charge of the amidine group of the latter. This occurs because the amino group, an excellent electron donor, decreases the positive charge of the amidine group, thus reducing the interaction of this group with the carboxylate of Asp¹⁷⁷ present at the bottom of the pocket of the S1 site.

However, calorimetric determinations contradict this result since the measured affinity of p-aminobenzamidine is about 4 times higher than that of benzamidine (25,34). This discrepancy may be due to the methodology used in the calculations that does not take into account the effect of differential solvation of the complexes or of the isolated ligands and receptor. The variation in the heat capacity, ΔC_p , for both inhibitors suggests that the contribution of the hydrophobic effect should be negative for both compounds (39). ΔC_p for benzamidine binding is $-469.4 \pm 51.4 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ (this work) and $-519 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ for p-aminobenzamidine (25). The solvation and desolvation effects of the ligands, receptor and the complexes, i.e., the changes in free energies to transfer the ligands from the bulky solution to the binding site, are exergonic. The fact that the positive charge of the amidine is more dispersed in the p-aminobenzamidine group should decrease the interaction force between this inhibitor and the water molecules. Consequently, the energetic cost related to the release of the water molecules around the ligand molecule, necessary to the binding, will be smaller for p-aminobenzamidine compared to benzamidine. Thus, p-aminobenzamidine is expected to present a more favorable binding constant than benzamidine, although the specific interaction inside the binding site is weakened by charge dispersion.

Table 2. Theoretical energetic components involved in the binding of β -trypsin to inhibitors (kJ/mol).

	RL	Ri	Rf	Li	Lf	Ei	Eb	EpR	EpL
Benz	-2380.0	-2348.7	-2494.1	15.5	13.2	-46.9	59.0	103.3	2.3
pAmB	-2379.7	-2348.4	-2494.2	14.5	12.7	-45.8	60.0	103.9	1.8
Berenil	-2435.9	-2366.1	-2503.1	36.9	28.6	-106.7	-3.7	94.9	8.2

Benz = benzamidine and pAmB = p-aminobenzamidine. RL = complex enzyme-inhibitor after optimization of the structure; Ri and Li = the enzyme and the inhibitor isolated in the pharmacophoric conformation, respectively; Rf (for the enzyme) and Lf (for the ligands) = the energies after optimization of the geometries; Ep, Ei, and Eb = the energies of perturbation, interaction and binding, respectively.

The effects of charge dispersion on free energy of binding are two-fold and opposite: at the same time they weaken the interaction between the amidine group and the aspartic residue at the bottom of the pocket, that hinders the binding interaction, but they also weaken the interaction between the amidine group and solvent molecules, which favors the binding interaction. The free energy of binding from isothermal titration calorimetry studies indicates that the second effect should be more pronounced. However, these effects need to be investigated by computing solvent accessible surface areas and calculating free solvation energy in order to gain

some insight into the solvation and desolvation effects.

The participation of hydrogen bonds is another important factor in the stabilization of inhibitor-enzyme complexes. The present study evaluates the possibilities of this type of interaction among the molecules analyzed. In the simulations we observed that p-aminobenzamidine can form an additional hydrogen bond with the OH group of the Ser¹⁷⁷ residue. Figure 5 shows the arrangement of berenil in the pocket of the catalytic S1 site of β -trypsin after optimization and minimization of energies with the SYBYL program. Berenil shows several interactions with trypsin, some in the interior of the pocket with residues Asp¹⁷¹ and Ser¹⁹⁵, and also with the Ser¹⁷⁷, His⁴⁰ and Ser⁷⁸ residues located outside the catalytic site. Berenil shows a much more negative interaction energy than the two benzamidines and, despite presenting several contact points with the receptor, it shows a less positive perturbation energy. These results explain quantitatively the calorimetric data obtained and, most importantly, they show that benzamidine and berenil are promising molecules as starting points for the synthesis of chemical derivatives that can act as improved ligands or inhibitors for trypsin and other related serine proteases. Additionally, many physiologically important serine proteases are in fact "trypsin-like" enzymes and the information developed here can have direct applications.

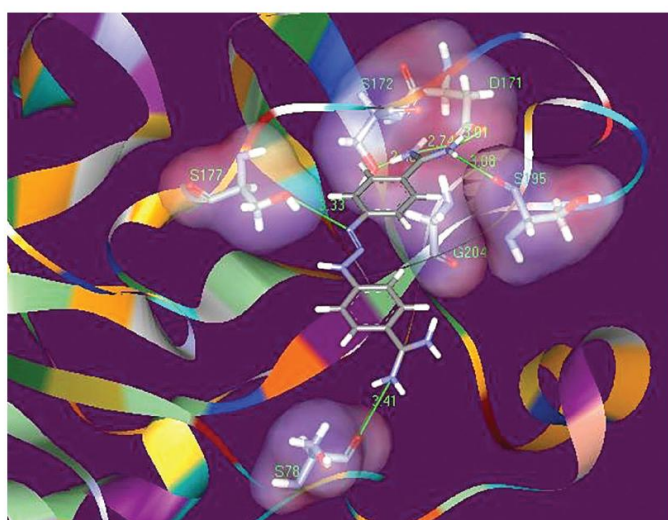


Figure 5. Interactions of berenil with residues located at or near the S1 catalytic site of β -trypsin. Only hydrogen bonds are shown. Berenil forms hydrogen bonds with Asp¹⁷¹, Ser¹⁹⁵, Gly²⁰⁴, Ser¹⁷⁷, and Ser⁷⁸ residues. The residues Asp¹⁷¹, Ser¹⁹⁵ and Gly²⁰⁴ are located at the bottom of S1 pocket. The Ser¹⁷⁷ residue is located at the entrance and the Ser⁷⁸ residue is located outside the catalytic site.

Acknowledgments

We thank one anonymous referee for useful suggestions and comments.

References

1. Czapinska H & Ottewski J (1999). Structural and energetic determinants of the S₁-site specificity in serine proteases. *European Journal of Biochemistry*, 260: 571-595.
2. Mu T, Lester HA & Dougherty DA (2003). Different binding orientations for the same agonist at homologous receptors: a lock and key or a simple wedge? *Journal of the American Chemical Association*, 125: 6850-6851.
3. Naray-Szabo G & Nagy P (1986). Electrostatic lock-and-key model for the study of biological isosterism: role of structural water in the binding of basic pancreatic trypsin inhibitor to beta-trypsin. *Enzyme*,

- 36: 44-53.
4. Netzel-Arnett S, Hooper JD, Szabo R et al. (2003). Membrane anchored serine-proteases: a rapidly expanding group of cell surface proteolytic enzymes with potential roles in cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 22: 237-258.
 5. Rothman S, Liebow C & Isenman L (2002). Conservation of digestive enzymes. *Physiological Reviews*, 82: 1-18.
 6. Rinderknecht H, Renner IG, Abramson SB et al. (1984). Mesotrypsin: a new inhibitor-resistant protease from a zymogen in human pancreatic tissue and fluid. *Gastroenterology*, 86: 681-692.
 7. Wiegand U, Corbach S, Minn A et al. (1993). Cloning of the cDNA encoding human brain trypsinogen and characterization of its product. *Gene*, 136: 167-175.
 8. Kukor Z, Tóth M & Tóth-Sahin M (2003). Human anionic trypsinogen: Properties of autocatalytic activation and degradation and implications in pancreatic diseases. *European Journal of Biochemistry*, 270: 2047-2058.
 9. Koshikawa N, Hasegawa S, Nagashima Y et al. (1998). Expression of trypsin by epithelial cells of various tissues, leukocytes, and neurons in human and mouse. *American Journal of Pathology*, 153: 937-944.
 10. Stenman UH (2002). Tumor-associated trypsin inhibitor. *Clinical Chemistry*, 48: 1206-1209.
 11. Foucault G, Seydoux F & Yon J (1974). Comparative kinetic properties of α , β and ψ forms of trypsin. *European Journal of Biochemistry*, 295: 295-302.
 12. Kossiakoff AA, Chambers JL, Kay LM et al. (1977). Structure of bovine trypsinogen at 1.9 Å resolution. *Biochemistry*, 16: 654-664.
 13. Bittar ER, Caldeira FR, Santos AM et al. (2003). Characterization of β -trypsin at acid pH by differential scanning calorimetry. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36: 1621-1627.
 14. Santoro MM, Liu Y, Khan SMA et al. (1992). Increased thermal stability of proteins in the presence of natural occurring osmolytes. *Biochemistry*, 31: 278-283.
 15. Fischer S & Verma CS (1999). Binding of buried structural water increases the flexibility of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 96: 9613-9615.
 16. Helland R, Otlewski J, Sundheim O et al. (1999). The crystal structure of the complexes between bovine β -trypsin and ten P₁ variants of BPTI. *Journal of Molecular Biology*, 287: 923-942.
 17. Camacho CJ, Kimura KR, DeLisi C et al. (2000). Kinetics of desolvation-mediated protein-protein binding. *Biophysical Journal*, 78: 1094-1105.
 18. Salvay AG, Grigera JR & Colombo MF (2003). The role of hydration on the mechanism of allosteric regulation: *in situ* measurements of the oxygen-linked kinetics of water binding to hemoglobin. *Biophysical Journal*, 84: 564-570.
 19. Colombo MF, Rau DC & Parsegian VA (1992). Protein solvation in allosteric regulation: a water effect on hemoglobin. *Science*, 256: 655-659.
 20. Parsegian VA, Rand RP & Rau DC (2000). Osmotic stress, crowding, preferential hydration, and binding: A comparison of perspectives. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 97: 3987-3992.
 21. LiCata VJ & Allewell NM (1998). Measuring hydration changes of proteins in solution: applications of osmotic stress and structure-based calculations. *Methods in Enzymology*, 295: 42-62.
 22. Rand RP (2004). Probing the role of water in protein conformation and function. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B. Biological Sciences*, 359: 1277-1284.
 23. Mares-Guia M & Shaw E (1965). Studies on the active center of trypsin. The binding of amidines and guanidines as models of the substrate side chain. *Journal of Biological Chemistry*, 240: 1579-1585.
 24. Erlanger BF, Kokowsky N & Cohen W (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 95: 271-278.
 25. Talhout R & Engberts JBFN (2001). Thermodynamic analysis of binding of p-substituted benzamides to trypsin. *European Journal of Biochemistry*, 268: 1554-1560.
 26. Chase Jr T & Shaw E (1967). p-Nitrophenyl-p-guanidinobenzoate-HCl: a new active site titrant for trypsin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 29: 508-514.
 27. Wiseman T, Williston S, Brandt JF et al. (1989). Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new calorimeter. *Analytical Biochemistry*, 179: 131-135.
 28. Stewart JJ (1990). MOPAC: A semi empirical molecular orbital program. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 4: 1-105.
 29. Goodsell DS, Morris GM & Olson AJ (1996). Automated docking of flexible ligands: applications of AutoDock. *Journal of Molecular Recognition*, 9: 1-5.
 30. Sybyl 6.5 (1999). Tripos Associates, St. Louis, MO, USA.
 31. Papoian GA, Ulander J, Eastwood MP et al. (2004). From the cover: water in protein structure prediction. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 101: 3352-3357.
 32. Suurkuusk J (1974). Specific heat measurements on lysozyme, chymotrypsinogen, and ovalbumin in aqueous solution and in solid state. *Acta Chemica Scandinavica B*, 28: 409-417.
 33. Martins NF, Ferreira E, Torres KC et al. (2003). The denaturation of alpha, beta and psi bovine trypsin at pH 3.0: evidence of intermediates. *Protein and Peptide Letters*, 10: 73-81.
 34. Oliveira MGA, Rogana E, Rosa JC et al. (1993). Tyrosine 151 is part of the substrate activation binding site of bovine trypsin. *Journal of Biological Chemistry*, 268: 26893-26903.
 35. Wyman Jr J (1964). Linked functions and reciprocal effects in hemoglobin: a second look. *Advances in Protein Chemistry*, 19: 223-286.
 36. Fukada H & Takahashi K (1998). Enthalpy and heat capacity changes for the proton dissociation of various buffer components in 0.1 M potassium chloride. *Proteins*, 33: 159-166.
 37. Colombo MF & Bonilla-Rodríguez GO (1996). The water effect on allosteric regulation of hemoglobin probed in water/glucose and water/glycine solutions. *Journal of Biological Chemistry*, 271: 4895-4899.
 38. Gerstein M, Tsai J & Levitt M (1995). The volume of atoms on the protein surface: Calculated from simulation, using Voronoi polyhedra. *Journal of Molecular Biology*, 249: 955-966.
 39. Spolar RS, Ha JH & Record Jr MT (1989). Role of the hydrophobic effect in stability of site-specific protein-DNA complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 86: 8382-8385.



Contents lists available at ScienceDirect

Thermochimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/tca

Glucose-induced heat production, insulin secretion and lactate production in isolated *Wistar* rat pancreatic islets

J.M. Silva-Alves^{a,*}, T.R. Mares-Guia^{b,e,1}, J.S. Oliveira^a, C.C.S.S. Costa-Silva^a, P.C.R. Bretz^a, S.S. Araújo^a, E. Ferreira^a, C.C. Coimbra^c, M.C. Sogayar^{b,e}, R. ReisJunior^d, M.L. Mares-Guia^{a,2}, M.M. Santoro^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, 31270-901 Belo Horizonte, Brazil

^b Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 748, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil

^c Departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

^d Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Montes Claros, Campus Prof. Darcy Ribeiro, 39401-089 Montes Claros, MG, Brazil

^e NUCEL, Núcleo de Terapia Celular e Molecular, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 748, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 October 2006

Received in revised form 1 April 2008

Accepted 9 April 2008

Available online 26 April 2008

Keywords:

Pancreatic islets
Calorimetry
Glucose oxidation
Insulin secretion
Lactate production
Islet transplantation

ABSTRACT

Transplantation of pancreatic islets is efficient in improving the metabolic control and quality of life and in preventing severe hypoglycemia in patients with brittle type 1 diabetes mellitus. More accurate methods to assess islet viability would be extremely useful in designing target interventions for islet cytoprotection and in reducing the number of islets required to achieve insulin independence. Here we report on an application of calorimetry to evaluate the metabolic response of pancreatic islets to glucose stimulation. A significant increase in metabolic heat was produced by islet samples when consecutively subjected to 2.8 and 16.3 mmol L⁻¹ glucose. Under these glucose concentrations, 1000 islets released average heat values of 9.16 ± 0.71 mJ and 14.90 ± 1.21 mJ over 50 min, respectively. Additionally, the glucose stimulation indexes were 1.67 ± 0.30 for insulin, 1.72 ± 0.13 for heat and 2.91 ± 0.50 for lactate, raising the important possibility of substituting the secreted insulin index/ratio by the index/ratio of the heat released in the evaluation of Langerhans islets viability for transplantation. Altogether, our results demonstrate the applicability of calorimetry to assess the quality of isolated pancreatic islets and to study vital islet functions.

© 2008 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Pancreatic islet transplantation has proven to be efficient in improving the metabolic control and quality of life and in preventing severe hypoglycemia in patients with brittle type 1 diabetes mellitus [1]. This procedure provides a safe and minimally invasive [2–4] alternative for β -cell replacement, which can be indicated earlier in the course of type 1 diabetes mellitus to allow a more physiological control of glucose metabolism than exogenous insulin therapy, helping to prevent the development of secondary complications of diabetes [5,6]. New clinical islet transplant programs are being established worldwide and the annual number of transplants continues to increase. However, it is still difficult to evaluate the viability of isolated islets and to ensure

that viable islets will correspond to a successful transplantation [7].

Improved methods for islet assessment are being developed to predict islet potency. Better understanding of the causes of islet dysfunction is crucial to design new target interventions for islet cytoprotection and to reduce the number of islets required to achieve insulin independence [2–5,8]. Several methods of assessing viability and function of human islet preparations have recently been reported. Current practice includes islet quantification (including a measurement of purity and number of islets) and islet viability assessment (by membrane integrity staining assays and other methods). Additionally, glucose-stimulated insulin secretion by purified islets can be assessed by static incubation assays or perfusion studies. The glucose stimulation index is calculated as the ratio between the amount of insulin secreted during rat islet incubation in medium containing 16.3 mmol L⁻¹ glucose and the basal level of insulin secretion in medium containing 2.8 mmol L⁻¹ glucose. Glucose-stimulated insulin secretion is the standard assay used worldwide to evaluate islet viability. Stimulation indexes of islets that are considered ideal for transplantation typically range from approximately 2 to 4 [9]. These values indicate that the iso-

* Corresponding authors. Tel.: +55 31 3409 2627; fax: +55 31 3441 5963.

E-mail addresses: janetesalves@hotmail.com (J.M. Silva-Alves), santoro@icb.ufmg.br (M.M. Santoro).

¹ These authors contributed equally to this work.

² In memoriam.

lated islets preserved their ability to perform glucose metabolism, protein synthesis and secretion [10], crucial processes that must be intact in islets that will be used for transplantation. Indirect methods routinely used to quantify the insulin secreted by the islets β -cells, such as ELISA (immunoenzymatic absorption assay) and RIA (radioimmunoassay), usually require long periods of time for complete processing [11]. However, the main problem of using these methods is the finding that islet preparations that failed to reverse diabetes were indistinguishable from those that resulted in excellent function, considering their glucose stimulation indexes. There have been reports of failures occurring in the very early post-transplant period. This disappointing observation could be related to the use of islet preparations displaying a sub-optimal quality, since insulin release assays reflect the function of only a part of the metabolic pathways within the islets, rendering this parameter not very useful when global changes in islet function or viability need to be detected.

Other methods include DNA-binding dye exclusion, which can only reveal cells that have lost membrane selectivity. Dithizone staining only provides an estimate of β -cell content in islet preparations. A more predictive pre-transplant test is the reversal of diabetes in immunodeficient mice; however, several days are required to assess the outcome, rendering it a non-practical pre-transplant quality control criterion [12–14].

The aim of the present work is to use calorimetry to evaluate the amount of heat produced by isolated *Wistar* rat pancreatic islets upon glucose stimulation and to identify factors that contribute to heat production. This approach may lead to a new technique to assess islet metabolism that has the potential to be more accurate, rapid and efficient than the currently available methods.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Bovine serum albumin (BSA), collagenase (type V), dithizone (diphenylthiocarbazone), RPMI 1640 (with L-glutamine, 2.0 g L⁻¹ D-glucose, without sodium bicarbonate) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Rat insulin determination kits were purchased from Linco (Linco Research, MO, USA). Molecular Biology grade Ficoll 400 was purchased from Calbiochem (San Diego, CA, USA). Acridine orange and propidium iodide were purchased from Sigma-Aldrich.

2.2. Islet isolation and purification

The islets were isolated from male *Wistar* rats with 220–280 g body weight, anesthetized with ketamine chloridrate associated with xylazine hydrochloride (10:7.5, v/v) in the concentration of 0.2 mL/100 g body weight. After performing an abdominal midline incision, mosquito clamps were applied to the distal bile duct at its entry points into the duodenum, and before the bifurcation of right and left hepatic ducts. The pancreatic duct was incised with microsurgery scissors and cannulated before the bifurcation with PE50 tubing attached to a 26-gauge needle and syringe [15,16]. The tubing was kept in place, with extra care being taken to position the tip 2–3 mm before the point where the pancreatic duct emerges from the pancreas to allow adequate distention of the pancreatic head.

After ductal cannulation, pancreata were completely distended with 10 mL of cold Hanks supplemented with 1 mg mL⁻¹ albumin, 2.8 mmol L⁻¹ D-glucose, 0.7 mg mL⁻¹ type V collagenase, using a pulsed infusion technique. After complete distention, pancreata were excised and placed in glass Petri dishes containing cold Hanks (without glucose), rapidly dissected to extract visible vessels and

lymph nodes, minced into 1–2 mm fragments with curved scissors, and stored in Falcon 50 mL tissue culture tubes. These tubes were incubated in a 37 °C water bath for stationary digestion during 25 min. The tubes were then manually and vigorously shaken to dissociate the islets from adherent acinar elements. Digestion was interrupted by the addition of 15 mL of cold Hanks followed by centrifugation at 162.4 $\times$ g (Sorvall® RT 6000B refrigerated centrifuge, 14.5 cm radius rotor), for 5 min. Three serial rinse cycles were performed prior to resuspension in 10 mL of Euro-Ficoll (1.037 density). Purification was carried out in a discontinuous density gradient (1.037, 1.069, 1.096 and 1.110) at 649.6 $\times$ g and 4 °C for 15 min. The islets were located between the 1.069 and 1.096 layers, and between the 1.096 and 1.110 layers. The 1.037 layer and the top portion of the 1.069 layer were slowly aspirated and discarded with an automatic pipette. The third layer (1.096), with overlying and underlying islets, was aspirated and placed into 50 mL tubes containing cold Hanks supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and washed at 469.3 $\times$ g and 4 °C for 5 min. During washing, the pellets were resuspended and a sample was taken and checked for islets with dithizone staining. The supernatants were discarded and the pellets were resuspended in 20 mL of RPMI containing 10% FCS and washed by centrifugation at 274.5 $\times$ g and 4 °C for 5 min. Finally, the islet-containing pellet was suspended in RPMI with 10% FCS and transferred to tissue culture-treated 60 mm Petri dishes. The islets were incubated overnight at 37 °C in 5% CO₂ before the calorimetric assays.

2.3. Islet viability

Islet samples were assessed for morphological viability immediately before and after the calorimetric assays with a simultaneous Live-Dead double staining method consisting of: 290 μ mol L⁻¹ of acridine orange (Sigma), a weak base capable of penetrating living cells and binding to nucleic acids, causing a green fluorescence, and 150 μ mol L⁻¹ of propidium iodide, an exclusion dye that cannot penetrate viable cells, but binds to the nucleic acids of dead cells, producing a bright red fluorescence [17], which was observed and registered under an Olympus IX70-S870/BH2 RFL-T3 fluorescence microscope (Olympus Optical Co., Japan).

2.4. Islet sample preparation

After the overnight incubation, cultured islets were checked for morphological viability and counted before a volume containing 1000 islets was transferred to a 15 mL conical tube and centrifuged at 162.4 $\times$ g during 1 min at room temperature. The supernatant was discarded and the pellet was washed once in a glucose-free Krebs–Ringer solution containing 1 mg mL⁻¹ of BSA by centrifugation at 162.4 $\times$ g during 1 min at room temperature. The supernatant was discarded and the resulting pellet resuspended in 1.66 mL of glucose-free Krebs–Ringer solution, before being introduced into the calorimeter sample cell.

2.5. Isothermal calorimetry

The calorimetric experiments with islets treated with glucose were performed at 37 °C in a VP-ITC system (Microcal Inc., Northampton, MA, USA), with a 1.7 mL reaction vessel.

The calorimetric sample cell was gently filled with 1000 rat islets suspended in 1.66 mL of glucose-free Krebs–Ringer solution. The reference cell was filled with ultrapure Milli-Q water (Millipore, Billerica, USA). The titration syringe was filled with Krebs–Ringer solution containing 119 mmol L⁻¹ of glucose. The sample cell was then closed and the islets were kept in suspension by stirring at 270 rpm until a stable baseline was observed. When these condi-

tions were reached, a single 40 μL injection of the 119 mmol L^{-1} glucose solution was made, resulting in a final glucose concentration of 2.8 mmol L^{-1} in the sample cell. The heat evolved in the reaction was monitored during 50 min with constant stirring at 270 rpm. After the assay, the contents of the sample cell were gently removed with a syringe and centrifuged during 1 min at $162.4 \times g$ at room temperature. The supernatant was frozen and kept at -30°C for measurement of insulin content. The pellet was resuspended in 1.66 mL of glucose-free Krebs–Ringer solution to be used in the next assay, with a higher glucose concentration. The injector syringe was washed with ultrapure water and filled with Krebs–Ringer solution containing 692.75 mmol L^{-1} glucose. The sample cell was filled with the resuspended pellet containing the same islets from the previous run. After reaching thermal equilibrium, 40 μL of the 692.75 mmol L^{-1} glucose solution was injected resulting in a final glucose concentration of 16.3 mmol L^{-1} in the sample cell. The heat evolved in the reaction was monitored during 50 min with constant stirring at 270 rpm. After the run, the contents of the sample cell were removed, centrifuged during 1 min at $162.4 \times g$ at room temperature and the supernatant was frozen at -30°C for measurements of insulin and lactate contents.

2.6. Determination of insulin and lactate content

The insulin content of the frozen supernatants obtained after each calorimetric run was determined by radioimmunoassay. These supernatants were also used for determination of the lactate content with a 2300 STAT PLUS Glucose & L-Lactate Analyzer (YSI Incorporated, Yellow Springs, Ohio). All determinations were performed in duplicate.

2.7. Statistical analysis

All statistical analyses were performed in the R Statistical System software [18], using linear mixed effects models [19] with the *lme* function from the *nlme* package [20]. The model was simplified by the backwards process, and the minimal adequate model was obtained by withdrawing all the non-significant terms ($p < 0.05$) from the full model presented below [21]. The graphs were generated with the software GraphPad Prism version 3.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA).

Statistical models:

$$\begin{aligned} \text{heat} = & \text{insulin} + \text{condition} + \text{lactate} + \text{block} + \text{insulin} : \text{condition} \\ & + \text{insulin} : \text{lactate} + \text{condition} : \text{lactate} \\ & + \text{insulin} : \text{condition} + \text{insulin} : \text{condition} : \text{lactate} \end{aligned} \quad (1)$$

$$\text{lactate} = \text{condition} + \text{insulin} + \text{block} + \text{condition} : \text{insulin} \quad (2)$$

$$\text{insulin} = \text{condition} + \text{lactate} + \text{block} + \text{condition} : \text{lactate} \quad (3)$$

where insulin is the concentration of insulin produced per islet; lactate is the concentration of lactate produced per islet; condition is the glucose concentration (2.8 or 16.3 mmol L^{-1}) used in the assays; block is the specific lot of animals used in the experiment.

In the models presented above, the (+) signal indicates the addition of a term to the model, while the (:) signal indicates a statistical interaction between the terms.

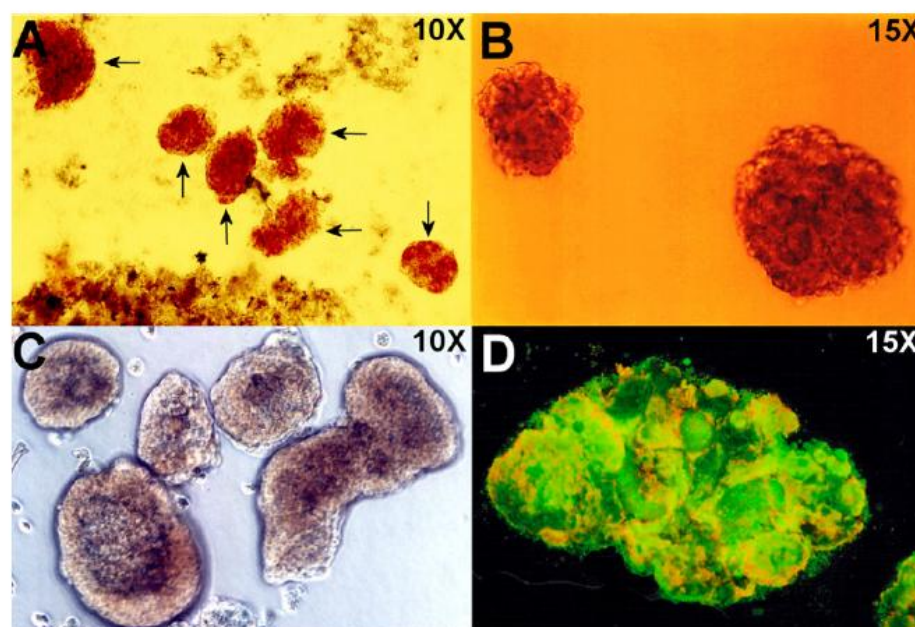


Fig. 1. Rat pancreatic islets before (A) and after (B) the purification step, stained with dithizone. Islets are indicated by arrows in (A), to differentiate them from the brown acinar tissue. Unstained cultured islets (C) after overnight incubation at 37 °C in 5% CO₂. (D) Single islet doubly stained for morphological viability with acridine orange (live cells in green) and propidium iodide (dead cells in red) immediately after the calorimetric experiment. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

3. Results and discussion

After digesting the rat pancreata, free islets could be visualized amongst the digested acinar tissue (Fig. 1A). As can be seen in Fig. 1B, the purification step successfully eliminated this acinar tissue, resulting in highly pure islet preparations. These islets were stained with dithizone, displaying a strong red color, indirectly indicating the presence of insulin stored inside the secretory granules of the beta cells (Fig. 1A and B).

The average islet yield obtained after murine pancreatic islets isolation varies depending on the technique employed. A comparative study of two different procedures [16] reported yields of 488 [15] and 719 [16] islets per pancreas. Our results are in good agreement with these and other reports [16,22], since the average yield obtained for our preparations was around 600 islets per pancreas. These purified islet preparations were cultured for 18–20 h prior to the calorimetric experiments exhibiting intact structures with well-defined borders (Fig. 1C).

A typical thermogram of 1000 murine pancreatic islets treated with 2.8 mmol L^{-1} glucose is shown in Fig. 2A. Two exothermic peaks can be distinguished in the graph, the first of which corresponds to the heat released by the glucose dilution. The second peak, more intense and broader than the first one, corresponds to the initial heat released by the islets upon treatment with 2.8 mmol L^{-1} glucose. The total heat released was calculated by integration of the area over 50 min. A blank ITC run in the absence of islets in the sample cell is shown in Fig. 2B, where only the peak corresponding to the dilution of 2.8 mmol L^{-1} glucose can be observed. To obtain only the heat released by the islets, the data from Fig. 2B were point-by-point subtracted from Fig. 2A, generating the graph shown in Fig. 2C. Similarly to the experiment with 2.8 mmol L^{-1} glucose, the 16.3 mmol L^{-1} glucose dilution heat was also subtracted from the experimental data (data not shown).

Immediately after the calorimetric experiment, the islets were removed from the calorimeter sample cell and checked for morphological viability (Fig. 1D). The islets presented a predominant green color, indicating that they were still viable at the end of the experimental procedures.

Twenty-three complete experiments, each with 1000 islets, were performed. The averages $\pm$ standard errors of heat released per 1000 islets during 50 min were $9.16 \pm 0.71 \text{ mJ}$ after the injection of 2.8 mmol L^{-1} glucose and $14.90 \pm 1.21 \text{ mJ}$ following the injection of 16.3 mmol L^{-1} glucose (Table 1).

Heat production is strongly influenced by the glucose concentration ($p < 0.001$). According to the linear mixed effects models statistical analysis, none of the other variables (insulin secretion and lactate production) influenced heat production. Previous studies on glucose metabolism of rat pancreatic islets demonstrated that most of the glucose utilized is accounted for by lactate production, which occurs at a constant rate throughout the 90 min period in which the islets were incubated with glucose [23].

The concentration of lactate was determined after the end of each calorimetric run. Eq. (2) was used to verify which variables

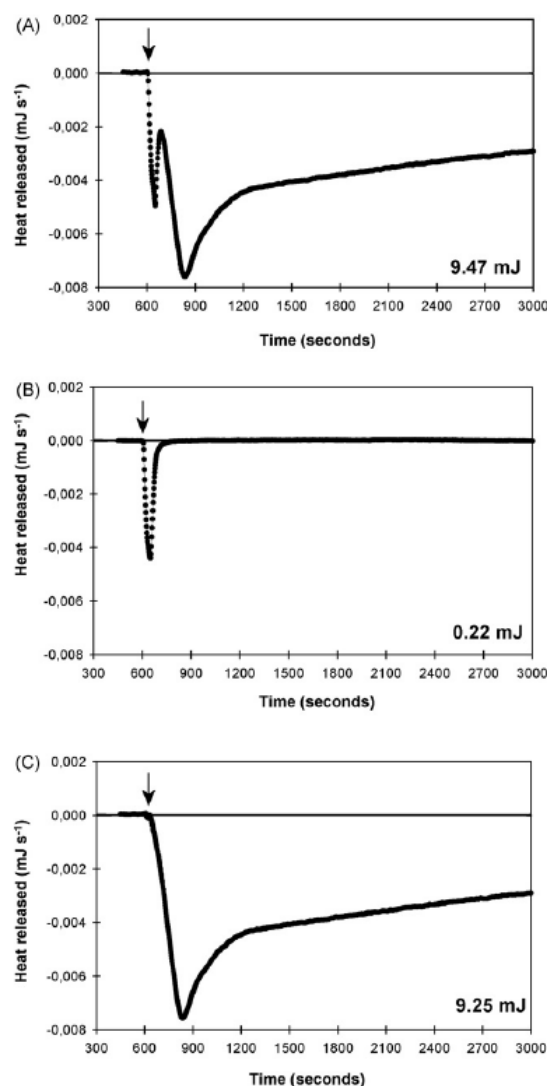


Fig. 2. Thermograms produced by (A) treatment of 1000 islets with 2.8 mmol L^{-1} glucose, (B) the dilution heat due to 2.8 mmol L^{-1} glucose and (C) thermogram obtained upon subtraction of B from A, resulting in the heat released by the islets without the dilution heat of glucose. The arrows in the thermograms indicate glucose injection. The total heat released is shown in the lower right corner of each graph.

Table 1
Heat, insulin and lactate released by 1000 rat pancreatic islets during 50 min in the calorimeter, under treatment with 2.8 or 16.3 mmol L^{-1} glucose

Experimental condition	Heat (mJ)	Insulin (nmol L^{-1})	Lactate ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
2.8 mmol L^{-1} glucose	9.16 ± 0.71^a	0.36 ± 0.07^a	20.53 ± 3.43^a
16.3 mmol L^{-1} glucose	14.90 ± 1.21^b	0.36 ± 0.05^a	41.60 ± 4.35^b
Glucose stimulation index ^c	1.72 ± 0.13	1.67 ± 0.30	2.91 ± 0.50

Different letters on the same column differ statistically ($p < 0.001$). Values are represented as mean $\pm$ standard error.

^c The glucose stimulation index is the ratio of the parameter values for $16.3 \text{ mM}/2.8 \text{ mM}$ glucose, for the same islet preparation.

would present a positive or negative correlation with the lactate output. The production of lactate is affected only by the glucose concentration used to stimulate the islets. At 2.8 mmol L^{-1} glucose, $20.53 \pm 3.43 \mu\text{mol L}^{-1}$ lactate was produced and at 16.3 mmol L^{-1} glucose $41.6 \pm 4.35 \mu\text{mol L}^{-1}$ lactate was produced (Table 1).

The model represented by Eq. (3) was also tested to verify which variables would contribute to insulin secretion. Surprisingly, none of the variables, including the glucose concentration, were found to influence insulin secretion.

The mean values for secreted insulin are statistically equal for the two glucose concentrations tested (Table 1). These are global mean values, from data pooled from all islet samples tested in low

and high concentrations of glucose, and show the natural variability of the data. But, in a real test of islet functional viability, the important information is the ratio or index of parameters observed with high glucose concentration divided by the value observed with low glucose concentration for the same islet preparation (glucose stimulation index). The data for the heat evolved, secreted insulin and produced lactate ratios are shown in Table 1. An important feature becomes apparent: all three ratios are statistically larger than unity. The produced lactate ratio value (2.91 ± 0.50) suggests that an increase in glucose concentration leads to increased amounts of lactate produced by the islet, a result supported by the literature [23,24]. Another important observation relates the other two ratios: the value for the released heat ratio (1.72 ± 0.13) is numerically similar to the value of secreted insulin index (1.67 ± 0.30), a fact that raises the important possibility of replacing the secreted insulin ratio by the released heat ratio in the evaluation of the viability of the pancreatic islets for transplants, with several possible practical advantages relative to the currently used methods.

Our results demonstrate that the calorimetric assay is an excellent method for assessing the viability of isolated rat islets. The complete evaluation required approximately 5 h, constituting a substantial reduction in the time required to obtain the results, when compared to RIA or ELISA. We also demonstrate that calorimetry is useful for studies of pancreatic islets metabolism, since a strong correlation was obtained between heat production and the concentration of glucose used to stimulate the islets. Glucose stimulation is also correlated to the lactate output from the islets, as already described in the literature [23,24]. In contrast to other methods, calorimetry avoided false-negative results since the evaluated islets were metabolically viable. The secreted insulin ratio or glucose stimulation index value was numerically similar to the released heat ratio or index value, observed calorimetrically. We are currently testing this calorimetric procedure to assess the viability of human Langerhans islets for human transplant.

Acknowledgements

J.M.S.A. and T.R.M.G. were supported by pre-doctoral fellowships from, respectively, CAPES and CNPq. We are especially grateful to Prof. Dr. Alfredo Miranda de Goes and Prof. Dr. Kenneth John Gollob, both from the Department of Biochemistry and Immunol-

ogy of the Universidade Federal de Minas Gerais, for allowing the use of their labs during the steps of islet isolation and culture. We also thank Dr. Cândido Celso Coimbra and André Luis Pimenta de Faria for their expert assistance in the determination of insulin, lactate and glucose and Drs. Iolanda Cuccovia, Flavio Maximiano, Angelo Carpinelli and Rui Curi for discussions and criticisms. We dedicate this article to the memory of the unforgettable Prof. Dr. Marcos Luiz dos Mares Guia (1935–2002), who put forth the idea of using calorimetry for islet assessment prior to transplantation.

References

- [1] A. Pileggi, R. Alejandro, C. Ricordi, *Curr. Opin. Org. Transpl.* 11 (2006) 7–13.
- [2] T. Titus, L. Badet, D.W.R. Gray, *Expert Rev. Mol. Med.* 2 (2000) 1–28.
- [3] E.A. Ryan, J.R.T. Lakey, R.V. Rajotte, G.S. Korbutt, T. Kin, S. Imes, A. Rabinovitch, J.F. Elliott, D. Bigam, N.M. Kneteman, G.L. Warnock, I. Larsen, J.A.M. Shapiro, *Diabetes* 50 (2001) 710–719.
- [4] L. Inverardi, N.S. Kenyon, C. Ricordi, *Curr. Opin. Immunol.* 15 (2003) 507–511.
- [5] C. Ricordi, *Diabetes* 52 (2003) 1595–1603.
- [6] P.G. Stock, J.A. Bluestone, *Annu. Rev. Med.* 55 (2004) 133–156.
- [7] E.H. Liu, K.C. Herold, *Trends Endocrinol. Metab.* 11 (2000) 379–382.
- [8] T. Kenmochi, M. Miyamoto, H. Sasaki, S. Une, Y. Nakagawa, S. Moldovan, Y.P. Benhamou, C.F. Brunicaudi, H. Tanaka, Y. Mullen, *LAP-1, Pancreas* 17 (1998) 367–377.
- [9] S. Merani, A.M.J. Shapiro, *Clin. Sci.* 10 (2006) 611–625.
- [10] M.A. Holmes, H.A. Clayton, D.R. Chadwick, P.R.F. Bell, N.J.M. London, R.F.L. James, *Transplantation* 60 (1995) 854–860.
- [11] S. Ishii, S. Sato, M. Terashima, T. Sato, S. Suzuki, S. Murakami, M. Gotho, *Transpl. Proc.* 36 (2004) 1191–1193.
- [12] A.M. Shapiro, C. Ricordi, B. Hering, *Lancet* 362 (2003) 1242.
- [13] A. Ault, *Lancet* 361 (2003) 2054.
- [14] H. Ichii, L. Inverardi, A. Pileggi, R.D. Molano, O. Cabrera, C. Alejandro, S.M.Y. Koruda, P.O. Berggren, C. Ricordi, *Am. J. Transpl.* 5 (2005) 1635–1645.
- [15] P.E. Lacy, M. Kostianovsky, *Diabetes* 16 (1967) 35–39.
- [16] J.M.A. Shapiro, E. Hao, R.V. Rajotte, N. Kneteman, *Cell Transpl.* 5 (1996) 631–638.
- [17] H.L. Bank, *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 24 (1988) 266–273.
- [18] R Development Core Team, *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2006, ISBN: 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- [19] J.C. Pinheiro, D.M. Bates, *Mixed-effects Models in S and S-Plus*, 1st ed., Springer, New York, 2002, pp. 1–528.
- [20] J.C. Pinheiro, D.M. Bates, S. DebRoy, D. Sarkar, *nlme: linear and nonlinear mixed effects models*. R package version 3, 2006, 1–75.
- [21] M.J. Crawley, *Statistical Computing: An Introduction to Data Analysis Using S-Plus*, 1st ed., John Wiley & Sons, Baffins Lane, 2002, pp. 1–761.
- [22] J. Delaby, M. Campana, C. Laborie, R. Assan, *Diabete Metab.* 15 (1989) 123–127.
- [23] A. Sener, J. Levy, W.J. Malaisse, *Biochem. J.* 156 (1976) 521–525.
- [24] L. Best, A.P. Yates, J.E. Meats, S. Tomlinson, *Biochem. J.* 259 (1989) 507–511.

MICROCALORIMETRIA DE ILHOTAS DE LANGERHANS HUMANAS

Foram isoladas ilhotas pancreáticas a partir de pâncreas humanos obtidos de doadores cadáveres consentidos, seguindo o protocolo de Edmonton (SHAPIRO *et al.*, 2000) com algumas modificações.

Após o isolamento as ilhotas foram mantidas em cultura em meio CMRL-1066 suplementado com 10% de SFB até o momento dos experimentos no microcalorímetro.

Amostras de ilhotas foram submetidas às colorações com o método “live/dead” e com ditizona, antes e depois do experimento completo ser realizado.

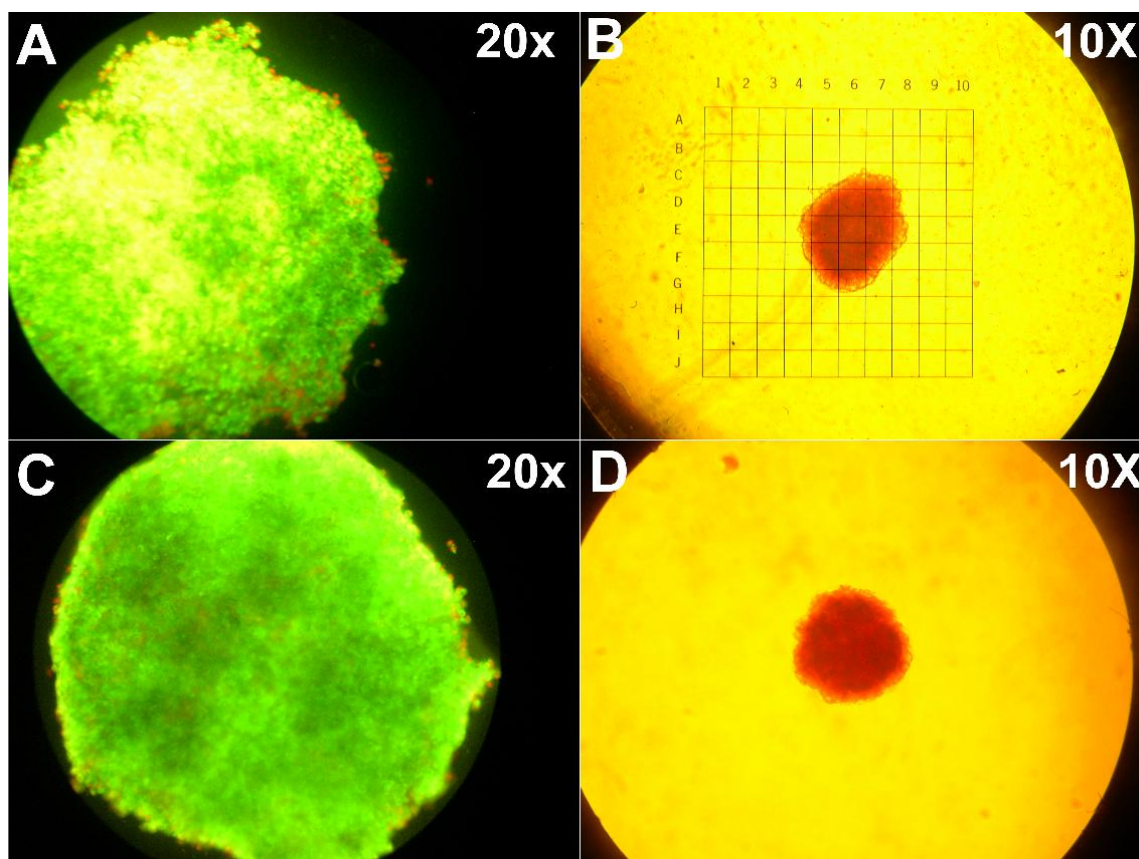


FIGURA 1 - Amostras de ilhotas de Langerhans humanas visualizadas antes (A) e (B) e após (C) e (D) os experimentos de microcalorimetria. As amostras (A) e (C) foram coradas pelo método “live/dead”. As amostras (B) e (D) foram coradas com ditizona. Os respectivos aumentos utilizados estão indicados nas figuras.

Também foram realizados experimentos de microcalorimetria com ilhotas de Langerhans humanas encapsuladas em cápsulas de Biodritin® (MARES-GUIA &

RICORDI, 2001), um material composto de uma mistura de alginato e sulfato de condroitina, gelificada em cloreto de bário.

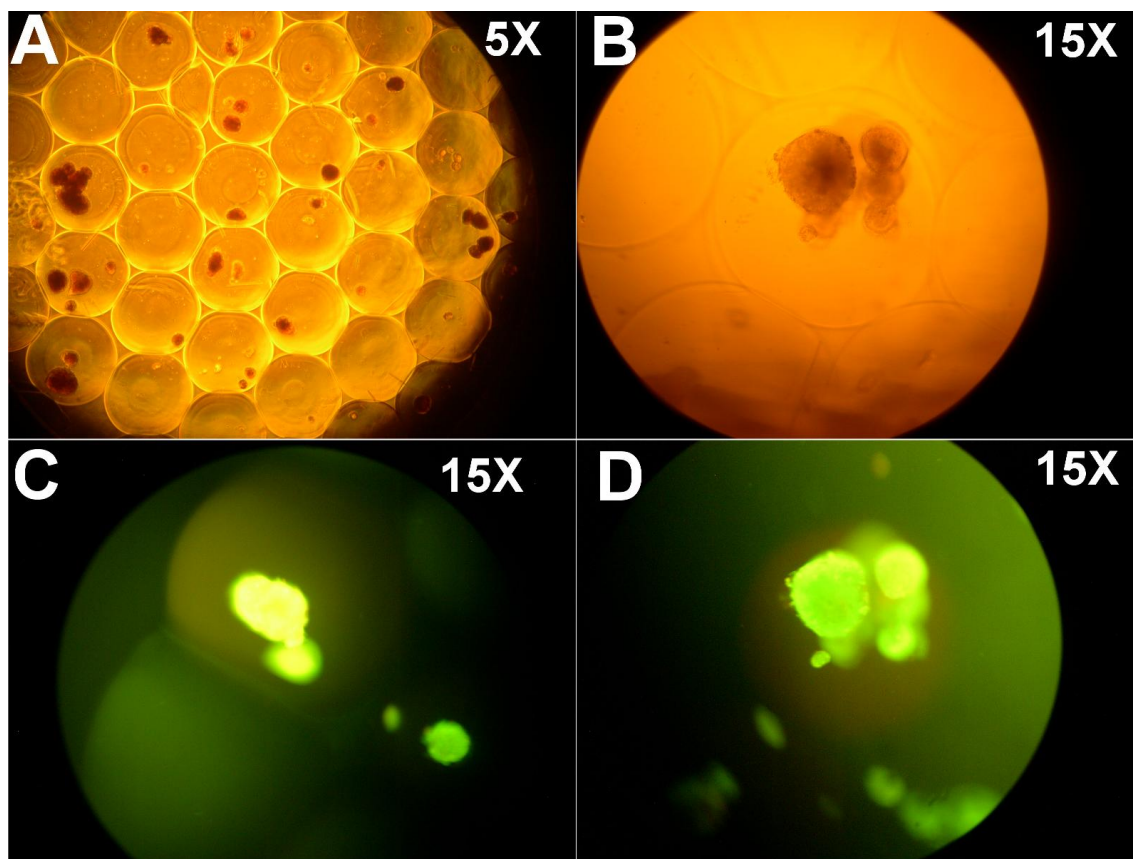


FIGURA 2 - Amostras de ilhotas de Langerhans humanas encapsuladas com Biodritin® visualizadas após os experimentos de microcalorimetria. As amostras (A) e (B) foram coradas com ditizona. As amostras (C) e (D) foram coradas pelo método “live/dead”. Os respectivos aumentos utilizados estão indicados nas figuras.

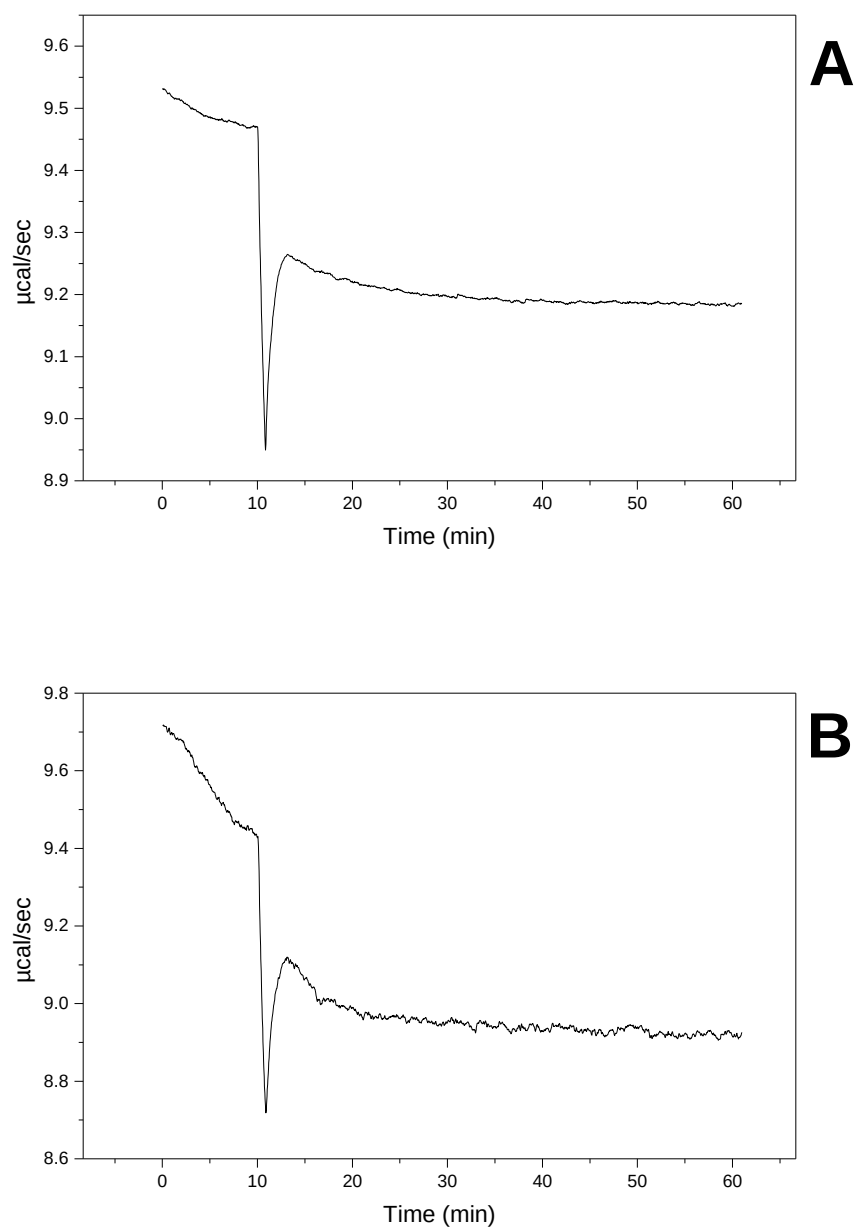


FIGURA 3 - Termogramas brutos produzidos por **(A)** 1.000 IEQs de ilhotas humanas estimuladas com $2,8 \text{ mmol.L}^{-1}$ de glicose e por **(B)** 1.000 IEQs de ilhotas humanas encapsuladas com Biodritin[®] estimuladas com $2,8 \text{ mmol.L}^{-1}$ de glicose.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v.28, p.S37-S42, 2005.

ANDERSSON, A & SANDLER, S. Viability tests of cryopreserved endocrine pancreatic cells. **Cryobiology**, v.20, p. 161-168, 1983.

ASHCROFT, F.M. K_{ATP} channels and insulin secretion: a key role in health and disease. **Biochememical Society Transactions**, v. 34, p. 243-246, 2006.

ASHCROFT, S.J.H., HEDESKOV, C.J. AND RANDLE, P.J. Glucose metabolism in mouse pancreatic islets. **Biochememical Journal**, v. 118, 143-154, 1970.

AULT, A. Edmonton's islet success tough to duplicate elsewhere. **The Lancet**, v. 361, p. 2054, 2003.

BANK, H. L. Assessment of islet cell viability using fluorescent dyes. **Diabetologia**, v.10, p. 812-816, 1987.

BANK, H. L. Rapid assessment of islet cell viability with acridine orange and propidium iodide. **In vitro**, v. 24, p. 266-272, 1988.

BARCELÓ, A. & RAJPATHAK, S. Incidence and prevalence of diabetes mellitus in the Americas. **Pan American Journal of Public Health**, v. 10, p. 300-308, 2001.

BERNEY, T., ANTONELLO, P., MOLANO, D.R. & RICORDI, C. Epithelial cell cultura: pancreatic islets. **Methods of Tissue Engineering**, v.12, p.203-218, 2001.

BIANCO, A.C. Hormônios Tireóideos, UCPs e Termogênese. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 44, p. 281-289, 2000.

BORELLI, M.I. & GAGLIARDINO, J.J. 2001. Possible modulatory effect of endogenous islet catecholamines on insulin secretion. **BMC Endocrine Disorders**. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1472-6823/1/>. Acesso em: 10. nov. 2003.

BOSCHERO, A.C., BORDIN, S., HERCHUELZ, A & LEBRUN, P. Effects of glucose on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ outflow, cytosolic Ca^{2+} concentration and insulin released from freshly isolated and cultured adult rat islets. **Cell Calcium**, v. 11, p. 603-609, 1990.

BRANDENBURG, K. Isothermal titration calorimetric investigations of endotoxin binding to macrophages and the inhibition by polymyxin. **Thermochimica Acta**, v. 415, p.63-67, 2004.

CABRERA, O., BERMAN, D.M., KENYON, N.S., RICORDI, C., BERGGREN, P.O. & CAICEDO, A. The unique cytoarchitecture of pancreatic islets has implications for islet cell function. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.103, p. 2334-2339, 2006.

CALAFIORE, R., BASTA, G., LUCA, G., LEMMI, A., RACANICCHI, L., MANCUSO, F., MONTANUCCI, M. P., & BRUNETTI P. Standard technical procedures for microencapsulation of human islets for graft into nonimmunosuppressed patients with type 1 Diabetes Mellitus. **Transplantation Proceedings**, v. 38, p. 1156-1157, 2006a.

CALAFIORE, R., BASTA, G., LUCA, G., LEMMI, A., MONTANUCCI, M. P., CALABRESE, G., RACANICCHI, L., MANCUSO, F., & PAOLO B. Microencapsulated pancreatic islet allografts into nonimmunosuppressed patients with type 1 diabetes. **Diabetes Care**, v. 29, p. 137-138, 2006b.

CHAPLIN, M.F. Monosaccharides. In: Chaplin, M.F. & Kennedy, J.F. (Ed.) **Carbohydrate analysis: a practical approach**. Publisher: IRL Press, Oxford, p. 1-36, 1986.

CRAWLEY, M. J. **Statistical Computing: An introduction to data analysis using S-Plus**. Baffins Lane: John Wiley & Sons, 2002.

CUNNINGHAM, A.C. Parasitic adaptative mechanisms in infection by *Leishmania*. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 72, p. 132-141, 2002.

DARLING, T.N., DAVIS, K.G., LONDON, R.E., & BLUM, J.J. Carbon dioxide abolishes the reverse Pasteur effect in *Leishmania major* promastigotes. **Molecular Biochemical Parasitology**, v.33, p.191-202, 1989.

DELABY, J., CAMPANA, M., LABORIE, C. & ASSAN, R. Reproducible high yields of rat islets of Langerhans. **Diabetes & Metabolism**, v.15, p.123-127, 1989.

DOYLE, M.L. Characterization of binding interactions by isothermal titration calorimetry. **Current Opinion in Biotechnology**, v.8, p.31-35, 1997.

GAISFORD, S. & BUCKTON, G. Potencial applications of microcalorimetry for the study of physical processes in pharmaceuticals. **Thermochimica Acta**, v. 380, p. 185-198, 2001.

GILON, P. & HENQUIN, J.C. Distinct effects of glucose on the synchronous oscillations of insulin release and cytoplasmic Ca^{2+} concentration measured simultaneously in single mouse islets. **Endocrinology**, v.136, p.5725-5730, 1995.

GRAY, D.W. & MORRIS, P.J. The use of fluorescein diacetate and ethidium bromide as a viability stain for isolated islets of Langerhans. **Stain Technology**, v.62, p. 373-381, 1987.

GÜTTE, N., KÜHN, F., MATTHES, G., GEORGI, K., GRONAU, K. & BRAUN, K. The MTT-dye test for the in vitro vitality control of fresh as opposed to cryopreserved rat pancreatic islets for syngeneic intraportal islet transplantation. **Zeitschrift für Experimentelle Chirurgie, Transplantation und Künstliche Organe**, v. 22, p. 323-329, 1989.

GYLFE, E. & HELLMAN, B. The heat production of pancreatic beta-cells stimulated by glucose. **Acta Physiologica Scandinavica**, v.93, n.2, p.179-183, 1975.

HENQUIN, J.C. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. **Diabetes**, v. 49, p. 1751-1760, 2000.

HENQUIN, J.C., RAVIER, M.A., JONAS, J.C. & GILON, P. Hierarchy of the β -cells signals controlling insulin secretion. **European Journal of Clinical Investigation**, v.33, p.742-750, 2003.

HOLMES, M.A., CLAYTON, H.A., CHADWICK, D.R., BELL, P.R.F., LONDON, N.J.M. & JAMES, R.F.L. Functional studies of rat, porcine, and human pancreatic islets cultured in ten commercially available media. **Transplantation**, v.60, p.854-860, 1995.

HONG, S., RICORDI, C. & MARES-GUIA, M. Evaluation of the metabolic state of human islets by microcalorimetry. *Cell Transplantation*. abstract n°63, v. 8, p. 186, 1999.

ICHII, H., INVERARDI, L., PILEGGI, A., MOLANO, R.D., CABRERA, O., CAICEDO, A., MESSINGER, S., KURODA, Y., BERGGREN, P-O., RICORDI, C. A novel method for the assessment of cellular composition and beta-cell viability in human islet preparations. **American Journal of Transplantation**, v. 5, p. 1635-1645, 2005.

INVERARDI, L., KENYON, N.S. & RICORDI, C. Islet transplantation: immunological perspectives. **Current Opinion in Immunology**, v.15, p.507-511, 2003.

ISHII, S., SATO, Y., TERASHIMA, M., SAITO, T., SUZUKI, S., MURAKAMI, S. & GOTOH, M. A novel method for determination of ATP, ADP, and AMP contents of a single pancreatic islet before transplantation. **Transplantation Proceedings**, v. 36, p. 1191-1193, 2004.

JARRETT, I.G., CLARK, D.C., FILSELL, O.H., HARVEY, J.W., CLARK, M.G. The application of microcalorimetry to the assessment of metabolic efficiency in isolated rat hepatocytes. **Biochemical Journal**, v. 180, p. 631-638, 1979.

KEEGAN, F. & BLUM, J.J. Effects of oxygen concentration on the intermediary metabolism of *Leishmania major* promastigotes. **Molecular Biochemical Parasitology**, v.38, p.85-89, 1990.

KENMOCHI, T., MIYAMOTO, M., SASAKI, H., UNE, S., NAKAGAWA, Y., MOLDOVAN, S., BENHAMOU, Y.P., BRUNICARDI, C.F., TANAKA, H. & MULLEN, Y. LAP-1. Cold preservation solution for isolation of high-quality human pancreatic islets. **Pancreas**, v.17, n.4, p.367-377, 1998.

KENNEDY, R.T., KAURI, L.M., DAHLGREN, G.M., JUNG, S-K. Metabolic oscillations in β cells. **Diabetes**, v.51,Suppl.1, p.S152-S161, 2002.

KÜHN, F., ABRI, O., LÖHDE, E., GÜTTE, N., SCHULZ, H.J. & JAHR, H. In vitro rapid colorimetric assay for viability control of fresh isolated and deep-frozen human pancreatic islets. **Diabetes**, v. 38, (suppl 1), p. 278, 1989.

KULKARNI, R. N. The islet β -cell. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, p. 365-371, 2004.

LACY, P.E. & KOSTIANOVSKY, M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. **Diabetes**, v.16, p.35-39, 1967.

LACY, P.E., WALKER, B.S. & FINK, C.J. Perifusion of isolated rat islets in vitro: participation of the microtubular system in the biphasic release of insulin. **Diabetes**, v. 21, p. 987-988, 1972.

LAKEY, J.R.T., HELMS, L.M.H., KIN, T., KORBUTT, G.S., RAJOTTE, R.V., SHAPIRO, J.A.M. & WARNOCK, G.L. Serine-protease inhibition during islet isolation increases islet yield from human pancreases with prolonged ischemia. **Transplantation**, v.72, n.4, p.565-570, 2001.

LATIF Z.A, NOEL J, ALEJANDRO R. A simple method of staining fresh and cultured islets. **Transplantation**, v.45, n.4, p.827-830, 1988.

LIU, E.H. & HEROLD, K.C. Transplantation of the islets of Langerhans: New Hope for treatment of type 1 diabetes mellitus. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.11, n.9, p.379-382, 2000.

LONDON, N.J.M, SWIFT, S.M. 7 CLAYTON, H.A. Isolation, culture and functional evaluation of islets of Langerhans. **Diabetes & Metabolism**, v.23, p.200-207, 1998.

LONDON, N.J.M., CONTRACTOR, H., LAKE, S.P., AUCCOTT, G.C., BELL, P.R.F., JAMES, R.F.L. A microfluorimetric viability assay for isolated human and rat islets of Langerhans. **Diabetes Research**, v. 12, p. 141-149, 1989.

LOWELL, B.B 7 SHULMAN, G.I. Mitochondrial dysdunction and Type 2 Diabetes. **Science**, v. 307, p. 384-387, 2005.

MARES-GUIA, M. & RICORDI, C. Hetero-polysaccharide conjugate and methods of making and using the same. U.S. Patent N° 6,281,341, 28 agosto 2001.

MARES-GUIA, M., NASCIMENTO, V.V., LOVRIEN, R. and MELO, M.N. Microcalorimetric determination of glucose utilization by *Leishmania*. **Thermochimica Acta**, v.172, p.203-211, 1990.

MARIA-ENGLER, S.S., MARES-GUIA, M., CORREA, M.L.C., OLIVEIRA, E.M.C., AITA, C.A.M., KROGH, K., GENZINI, T., MIRANDA, M.P., RIBEIRO, M., VILELA, L., NORONHA, I.L., ELIASCHEWITZ, F.G. & SOGAYAR, M.C. Miroencapsulation and tissue engineering as an alternative treatment of diabetes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.34, p.691-697, 2001.

MASHARANI, U., KARAM, J.H., GERMAN, M.S. Pancretic hormones & Diabetes Mellitus. In Greenspan, F.S. & Gardner, D.G. (Ed). **Basic & Clinical Endocrinology**. Publisher: 7th edition. McGraw-Hill, 2004. p.658-746.

McKAY, D.B. & KAROW, A.M. Factors to consider in the assessment of viability of cryopreserved islets of Langerhans. **Cryobiology**, v. 20, p. 151-160, 1983.

MELO, Maria Norma. **Cultivo de *Leishmania* em meio definido. Estudos de suas exigências nutricionais.** 1982. 133f. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 1982.

MERANI, S. & SHAPIRO, A.M.J. Current status of pancreatic islet transplantation. **Clinical Science**, v. 10, p. 611-625, 2006.

MERCHANT, F.A., AGGARWAL, S.J., DILLER, K.R., BARTELS, K.A., BOVIK, A.C., Three-dimensional distribution of damaged cells in cryopreserved pancreatic islets as determined by laser scanning confocal microscopy. **Journal of Microscopy**, v.169, p.329-338, 1993.

NASCIMENTO, V. V. **Estudo da utilização de carboidratos por promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, através de microcalorimetria de condução.** 1992. 94f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 1992.

O'BRIEN, R., CHOWDHRY, B.Z., LADBURY, J.E. in: Harding, S.E. & Chowdhry, B.Z. (Eds). **A practical approach to protein-ligand interactions.** Oxford University Press, Oxford, UK, p.263-286, 2001.

PIERCE, MM, RAMAN, CS AND NALL, BT. Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions. **Methods**, v.19, p.213-221, 1999.

PILEGGI, A., ALEJANDRO, R. & RICORDI, C. Islet transplantation: steady progress and current challenges. **Current Opinion in Organ Transplantation**, v. 11, p. 7-13, 2006.

PINHEIRO J.C., BATES D.M. **Mixed-effects models in S and S-Plus.** New York: Springer: 1-528, 2002.

PINHEIRO, J. C., BATES, D. M., DEBROY, S. & SARKAR, D. (2006). nlme: Linear and nonlinear mixed effects models. R package version 3.1-75.

R Development Core Team (2006). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Disponível em <http://www.R-project.org>. Acesso em: 10 ago. 2006.

RAJJOTE, R.V., STEWART, H.L., VOSS, W.A.C., SHNITKA, T.K., DOSSETOR, J.B. Viability studies on frozen-thawed rat islets of Langerhans. **Cryobiology**, v. 14, p. 116-120, 1977.

RETTORI, D. & VOLPE, P.L.O. Microcalorimetria: Uma técnica aplicável ao estudo do diauxismo da *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, v. 23, p. 257-261, 2000.

RHODES, C.J. & WHITES, M.F. Molecular insights into insulin action and secretion. **European Journal of Clinical Investigation**, v.32, Suppl.3, p.3-13, 2002.

RICORDI, C. Islet transplantation: a brave new world. **Diabetes**, v.52, p.1595-1603, 2003.

RICORDI, C., GRAY, D.W., HERING, B.J., KAUFMAN, D.B., WARNOCK, G.L., KNETEMAN, N.M., LAKE, S.P., LONDON, N.J., SOCCI, C., ALEJANDRO, R., et al. Islet isolation assessment in man and large animals. **Acta Diabetologica Latin**, v. 27, p. 185-195, 1990.

RICORDI, C., LACY, P., FINKE, H.E., OLACK, B. J., & SCHARP, D. Automated method for isolation of human pancreatic islets. **Diabetes**, v. 37, p. 413-420, 1988.

ROLO, A.P. & PALMEIRA, C.M. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.212, p. 167-178, 2006.

RORSMAN, P. The pancreatic beta-cell as a fuel sensor: an electrophysiologist's viewpoint. **Diabetologia**, v.40, p.487-495, 1997.

RORSMAN, P., ELIASSON, L., RENSTRÖN, E., GROMADA, J., BERG, S. & GÖPEL, S. The cell physiology of biphasic insulin secretion. **News in physiological sciences: an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society**, v.15, p.72-77, 2000.

RYAN, E.A., LAKEY, J.R.T., RAJOTTE, R.V., KORBUTT, G.S, KIN, T., IMES, S., RABINOVITCH, A., ELLIOTT, J.F., BIGAM, D., KNETEMAN, N.M., WARNOCK, G.L., LARSEN, I. & SHAPIRO, J. A. M. Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton Protocol. **Diabetes**, v.50, p.710-719, 2001.

SALTIEL, R.A., KAHN, R. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v.414, p.799-806, 2001.

SENNER, A., LEVY, J. & MALAISSE, W.J. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin released. Does glycolysis control calcium transport in the B-cell? **Biochememical Journal**, v. 156, p 521-525, 1976.

SHAPIRO, A.M., LAKEY, J.R.T, RYAN, E.A., KORBUTT, G.S., TOTH, E., WARNOCK, G.L., KNETEMAN, N.M. & RAJOTTE, R.V. Islet transplantation in seven patients with type I diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunossuppressive regimen. **New England Journal of Medicine**, v. 343, p. 230-238, 2000.

SHAPIRO, A.M., RICORDI, C. & HERING, B. Edmonton's islet success has indeed been replicated elsewhere. **The Lancet**, v. 362, p. 1242, 2003.

SHAPIRO, A.M.J., HAO, E, RAJOTTE, R.V., KNETEMAN, N. High yield rodent islets with intraductal collagenase and stationary digestion - A comparison with standard technique. **Cell Transplantation**, v.5, n.6, p.631-638, 1996.

SILVA-ALVES, Janete Maria. **Microcalorimetria de Condução como um processo de "screening" de drogas contra promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis***. 1998. 65f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 1998.

SILVA-FILHO, E. & VOLPE, P. Estudo calorimétrico da interação de álcoois com *Saccharomyces cerevisiae* a 298 K. **Química Nova**, v. 22, p. 309-311, 1999.

SIMON, M.W., JAYASIMHULU, K., & MUKKADA, A. The free amino acid poll in *Leishmania tropica* promastigotes. **Molecular Biochemical Parasitology**, v.9, p.47-57, 1983.

Sociedade Brasileira de Diabetes. Disponível em: <http://www.diabetes.org.br>. Acesso em: 14 out. 2006.

TALHOUT, R. & ENGBERTS, J.B.F.N. Thermodynamic analysis of binding of *p*-substituted benzamidines to Trypsin. **European Journal of Biochemistry**, v.268, p.1554-1560, 2001.

TAMARIT-RODRIGUEZ, J., IDAHI, L.A., GINÉ, E., ALCAZAR, O. AND SEHLIN, J. Lactate production in pancreatic islets. **Diabetes**, v. 47, p. 1219-1223, 1998.

The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v.26, p.S5-S19, 2003.

The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v.26, p.S5-S19, 2006.

TITUS, T., BADET, L. & GRAY, D.W.R. Islet transplantation for insulin-dependent diabetes mellitus: perspectives from the present and prospects for the future. **Expert Reviews in Molecular Medicine**. 2000. Disponível em: <http://www.ermm.cbcu.cam.ac.uk>

WADSÖ, I. Design and testing of a micro reaction calorimeter. **Acta Chemica Scandinavica**, v.22, n.3, p.927-937, 1968.

WIEDERKEHR, A. & WOLLHEIM, C.B. Minireview: Implication of mitochondria in insulin secretion and action. **Endocrinology**. v. 147 (6), p. 2643-2649, 2006.

WILD, S., ROGLIC, G., GREEN, A., SICREE, R. & KING, H. Global prevalence of Diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, p. 1047-1053, 2004

World Health Organization - Media centre. Diabetes. Facts & figures. Fact sheets. Fact sheet n° 312. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre>. Acesso em: 16 out. 2006.

World Health Organization - Regional Office for the Western Mediterranean. Leishmaniasis. [PDF] Control of leishmaniasis. Disponível em: <http://www.emro.who.int>. Acesso em: 8. nov. 2006.

ZHANG, C.Y, BAFFY, G., PERRET, P., KRAUSS, S., PERONI, O., GRUJIC, D., HAGEN, T., VIDAL-PUIG, A.J., BOSS, O., KIM, Y.B., ZHENG, X.X., WHEELER, M.B., SHULMAN, G.I., CHAN, C.B., LOWELL, B.B. Uncoupling protein-2 regulates insulin secretion and is a major link between obesity, β cell dysfunction, and Type 2 Diabetes. **Cell**, vol. 105, p. 745-755, 2001.

ZIMMET, P., ALBERTI, K.G.M.M. & SHAW, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature**, v.414, p.782-787, 2001.