

MORAES, K. S. ; GUMA, F. T. C. R.

Departamento de Bioquímica, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS, 90035-000, (51) 33085545. E-mail: ketlen.moraes@ufrgs.br;

INTRODUÇÃO

O Diabetes mellitus (DM) compreende um conjunto de doenças metabólicas caracterizadas por altos níveis de glicose sanguínea, causados pela não produção, produção insuficiente ou falta de resposta à insulina produzida pelas células β -pancreáticas. A linhagem celular murina MIN6 assemelha-se qualitativamente e quantitativamente as células pancreáticas. Então, esta linhagem apresenta resposta à glicose em baixas passagens, podendo crescer em monocamada ou tridimensionalmente formando as “pseudo-ilhotas” (PIs).

OBJETIVO

Avaliar o crescimento e desenvolvimento de PIs em diferentes concentrações de frutose-1,6-bisfosfato (FBP).

METODOLOGIA

As monocamadas de células MIN6 foram mantidas em meio DMEM com alta concentração de glicose (11,2 mM de glicose), 10% soro bovino fetal, 1% L-glutamina 200mM, 1% de penicilina e 1 μ L/250mL de β -mercaptoetanol. Para formação de PIs as células MIN 6 foram semeadas (densidade 2×10^4 cel/mL) em placas de petri e suplementadas com diferentes concentrações de FBP (5 mM; 2,5 mM; 1,25mM; 0,62mM, 0,30mM e controle). A formação e mensuração de PIs foi acompanhada por observação ao microscópio de contraste de fase. O tamanho das PIs foi determinado utilizando um retículo acoplado a ocular do microscópio. As PIs foram agrupadas por tamanho: pequenas (0,01x0,09 μ m), médias (0,10x0,19 μ m) e grandes (0,20x0,30 μ m). A determinação do tamanho das PIs foi realizada após 07 dias de cultura, por três observadores, contando e medindo 100 PIs. As seguintes contagens foram feitas no 10^o, 12^o, 14^o e 16^o dias de cultura. Para a determinação da curva de crescimento celular, foram semeadas 8×10^4 cel/mL em placas de 24 poços suplementadas com diferentes concentrações de FBP (5 mM; 2,5 mM; 1,25mM; 0,62mM, 0,30mM e controle). Após 24 horas, e nos 7 dias subsequentes, as células foram tripsinizadas e contadas com auxílio de câmara de Neubauer e azul de tripan.

RESULTADOS

Serão apresentados os resultados dos tratamentos com 0,3, 0,62 e 1,25 mM de FBP porque as concentrações mais altas (5mM e 2,5 mM) provocaram a morte das células de linhagem MIN6.

RESULTADOS

CONTAGEM E MENSURAÇÃO DE PIs TRATADAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FBP

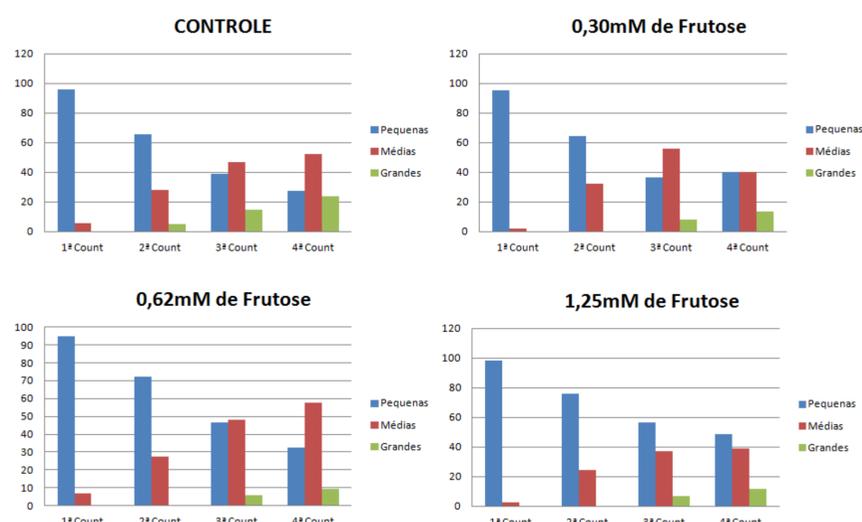


Figura 1: Efeito do tratamento com FBP sobre a formação e crescimento de PIs. O crescimento das PIs foi avaliados conforme descrito na metodologia e os resultados expressos como Média \pm EP. 1ª count: 10ª dia; 2ª count: 12ª dia; 3ª count: 14ª dia; 4ª count: 16ª dia

CURVA DE CRESCIMENTO MIN6

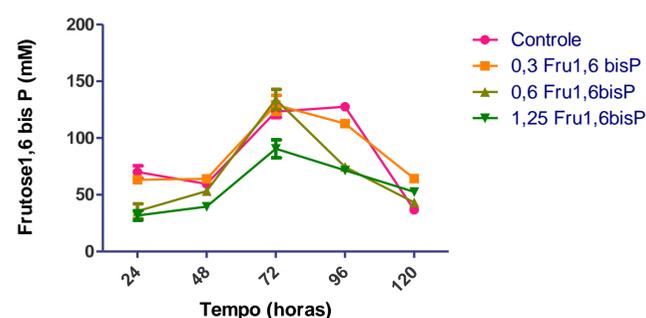


Figura 2: Efeito da FBP sobre a proliferação das células MIN6 em monocamada. As células foram contadas em câmara de Neubauer e os resultados expressos com Média \pm EP

CONCLUSÕES

•Formação de PIs:

-No grupo controle observamos o crescimento das PIs pelo decréscimo de PIs pequenas e aumento no número das médias e grandes.

-Nos grupos 0,3 e 0,62 mM observamos um aumento da formação de PIs médias em comparação com o grupo controle. No entanto o número de PIs grandes foi menor em todos os tratamentos

-O tratamento com 1,25 mM parece impedir o crescimento das PIs.

•Efeito da FBP sobre as monocamadas

As células tratadas com 0,3 mM tem comportamento igual ao grupo controle. Após 72 h o tratamento 0,62 mM parece inibir a proliferação ou ser citotóxico. A FBP na concentração de 1,25 mM inibe a proliferação das MIN6.

REFERÊNCIAS

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care, vol. 35, supplement 1, pp. S64–S71, 2012.

Hauge-Evans, A.C., et al. Pancreatic beta-cell-to-beta-cell interactions are required for integrated responses to nutrient stimuli: enhanced Ca²⁺ and insulin secretory responses of MIN6 pseudoislets. Diabetes, n. 48, p. 1402–1408, 1999.

ISHIHARA, H; ASANO, T; TSUKUD, K; KATAGIRI, H; INUKAI, K. Pancreatic beta cell line MIN6 exhibits characteristics of glucose metabolism and glucose-stimulated insulin secretion similar to those of normal islets. Diabetologia, n 36: 1139–1145, 1993.

Apoio: PIBIC, CNPq, FAPERGS.

Nº de Registro no Comitê de Ética UFRGS: 24763
Projeto aprovado pelo CEP UFRGS