

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO DA FRUTOSE-1,6-BISFOSFATO EM  
LINHAGEM CELULAR PANCREÁTICA MURINA MANTIDA EM CULTURA

TATIANA AMARAL GUERRA

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Fátima Costa Rodrigues Guma

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Elvira Alicia Aparicio Cordero

Porto Alegre  
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO DA FRUTOSE-1,6-BISFOSFATO EM  
LINHAGEM CELULAR PANCREÁTICA MURINA MANTIDA EM CULTURA

TATIANA AMARAL GUERRA

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Fátima Costa Rodrigues Guma

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Elvira Alicia Aparicio Cordero

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas ICBS – Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.**

Porto Alegre  
2015

“A ciência é a disposição de aceitar os fatos mesmo quando eles são opostos aos desejos”.  
(Burrhus Frederic Skinner)

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que de alguma forma fizeram parte dessa etapa tão importante na minha vida.

Aos meus pais, Eonara e Rodolfo, se não fosse por eles nada disso seria possível. Obrigada pelo incentivo, apoio e amor incondicional.

À minha orientadora Dra. Fátima Guma, agradeço pela oportunidade de ter me recebido como aluna e por acreditar que eu fosse capaz de realizar esse projeto. Agradeço pela confiança, paciência, incentivo, ensinamentos e principalmente pelo exemplo profissional e pessoal.

Ao Exército Brasileiro, principalmente ao Ten Cel Marco Antônio Diel e sua esposa Cinthia Castilho Diel, pelo incentivo e apoio em meu aperfeiçoamento profissional.

À minha coorientadora Elvira Cordero, por ser meu braço direito e esquerdo durante todo esse tempo. Agradeço a paciência, com meus horários complicados e com minha inexperiência. Obrigada pelos ensinamentos, companheirismo e principalmente pela amizade.

À Kétlen Moraes, estagiária querida, por todo apoio e amizade na realização de todas as etapas do nosso projeto.

Aos colegas de departamento e amigos de laboratório: Leo, Lucas, Gabi, Mari Parisi, Mari Ilha, Babi, Flô, Priscila, Fran, Moema e Nevtton sem palavras para agradecer todo o apoio e paciência de vocês.

A veterinária Sílvia, por ter incentivado a minha vinda ao laboratório 21 e mostrado o outro lado da bioquímica, fora da Faculdade de Veterinária.

Ao amigo Eduardo Costa, pela agilidade no apoio estatístico.

Ao Thiago, meu amor, obrigada por incentivar meu crescimento acadêmico, profissional e pessoal.

Aos meus animais, os principais responsáveis pelas minhas escolhas.

A minha família e meus amigos pelo apoio e compreensão nos momentos de ausência ao dedicar-me ao meu trabalho.

E por fim, mas não menos importante, agradeço a Faculdade de Veterinária da UFRGS, por mostrar-me a “bioquímica” e fazer com que eu me apaixonasse por ela.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>PARTE I.....</b>	<b>1</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>2</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>5</b>
2.1 Caracterizando o problema: Diabetes .....	5
2.2 Considerações sobre o Transplante de Ilhotas Pancreáticas .....	8
2.3 Linhagem de células $\beta$ de insulinoma de camundongo (MIN6) .....	10
2.4 Considerações sobre soluções de preservação celular em transplantes.....	12
2.5 Frutose-1,6-Bisfosfato .....	14
2.5.1 Efeitos fisiológicos: glicólise e gliconeogênese .....	14
2.5.2 Efeitos protetores: uso exógeno de FBP.....	15
<b>3 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>19</b>
<b>4 OBJETIVOS .....</b>	<b>20</b>
4.1 Objetivo Geral .....	20
4.2 Objetivos Específicos .....	20
<b>PARTE II .....</b>	<b>21</b>
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>22</b>
5.1 Cultura Celular da linhagem MIN6 .....	22
5.1.1 Monocamada de MIN6.....	22
5.1.2 Pseudoilhotas de MIN6 .....	22
5.2 Diluição da FBP .....	22
5.3 Caracterização funcional da linhagem celular .....	23
5.3.1 Produção de insulina .....	23
5.3.1.1 Extração de RNA Total, síntese do cDNA e expressão do mRNA.....	23
5.3.1.2 Coloração com Ditizona .....	24
5.4 Secreção de insulina .....	24
5.4.1 Secreção de insulina em responsividade à glicose.....	24
5.5 Efeitos do uso da FBP sobre a linhagem celular MIN6.....	25
5.5.1 Curva de proliferação celular.....	25
5.5.2 Ensaio da Sulforrodamina B.....	25
5.5.3 Formação de pseudoilhotas (PIs) .....	26

5.5.4 Viabilidade das pseudoilhotas (PIs) .....	26
5.6 Análises estatísticas .....	27
<b>6 RESULTADOS .....</b>	<b>28</b>
6.1 Estabelecimento da cultura de MIN6 em monocamada e da formação de PIs .....	28
6.2 Caracterização funcional da linhagem celular: secreção de insulina .....	28
6.3 Efeito da FBP sobre a adesão e a proliferação em monocamada (MIN6) .....	31
6.4 Efeito da FBP sobre a formação e crescimento das PIs .....	33
6.5 Efeito da FBP sobre a viabilidade das PIs .....	35
<b>PARTE III.....</b>	<b>36</b>
<b>7 DISCUSSÃO .....</b>	<b>37</b>
<b>8 CONCLUSÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>45</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>54</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>55</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>56</b>

## RESUMO

O diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é uma síndrome autoimune órgão-específica caracterizada pela destruição seletiva de células  $\beta$  que leva à morte celular. A DM1 é a causa de mais de 5% do total de mortes na população por ano e são poucas as estratégias de tratamento disponíveis. As linhagens celulares, são amplamente utilizadas nos estudos da DM1 como um modelo *in vitro*. A linhagem celular derivada de insulinoma murino, chamada de MIN6, assemelha-se as ilhotas de camundongo. Sendo assim, pesquisadores comprovaram que estas células apresentam características funcionais semelhantes às células  $\beta$ -pancreáticas em resposta a glicose e a outros secretagogos. Através de agregação espontânea e crescimento tridimensional, estas células formam as pseudoilhotas (PIs). A frutose-1,6-bisfosfato (FBP) é um açúcar bifosforilado, que apresenta duas estruturas anoméricas denominadas  $\alpha$  e  $\beta$  furanose. Já são conhecidas algumas ações importantes da FBP, como: ação citoprotetora, antioxidante e anti-inflamatória. Com base no descrito, o objetivo deste estudo foi avaliar a possível ação citoprotetora da FBP sobre células MIN6, cultivadas em monocadas e como pseudoilhotas. Para tal, foram avaliados os efeitos do tratamento com diferentes concentrações (0,30 mM, 0,62 mM e 1,25 mM) de FBP sobre a viabilidade, proliferação e síntese de insulina em células MIN6. Também foram determinados os efeitos da FBP na formação, crescimento e viabilidade das PIs. Os resultados mostraram, que em qualquer das doses testadas, a FBP aumentou a adesão das células MIN6. No entanto, os tratamentos com 0,62 e 1,25 mM de FBP provocaram uma inibição significativa da proliferação. A síntese de insulina foi detectada por imunocitoquímica e sua secreção basal estimulada por glicose determinada por ELISA. Como esperado, a formação e o crescimento de PIs é tempo dependente, tanto nas culturas controle como nas tratadas com FBP. Nas culturas tratadas com FBP, a formação de PIs maiores (150-300  $\mu$ m) foi menor que nas culturas controle. A incorporação de iodeto de propídeo mostrou um aumento da porcentagem de células inviáveis nas culturas de PIs tratadas com 1,25 mM de FBP, sendo citotóxica nessa concentração. Embora ainda sejam necessários mais estudos para aprofundar o conhecimento da atividade citoprotetora da FBP em outros modelos celulares e em ilhotas pancreáticas, nossos resultados mostram que em monocamadas e PIs, da linhagem celular MIN6 utilizadas nos experimentos, que a FBP não apresentou atividade citoprotetora.

**Palavras-chave:** diabetes mellitus, pseudoilhotas, frutose-1,6-bisfosfato, MIN6, células  $\beta$



## ABSTRACT

Diabetes mellitus type 1 (DM 1) is an organ-specific autoimmune syndrome characterized by the selective destruction of  $\beta$  cells that leads to cell death. The DM1 is the cause of more than 5% of all deaths in the population per year and there are few treatment strategies available. Cell lines are widely used in studies of DM1 in vitro model. The cell line derived from a mouse  $\beta$  insulinoma MIN6 is similar to the mouse islets. Studies of these cells exhibit functional characteristic similar to pancreatic  $\beta$ -cells in response to glucose and other secretagogues. Spontaneous aggregation and tridimensional growth those cells form the pseudoislets (PIs). Fructose-1,6-bisphosphate (FBP) is a biphosphorylated sugar with two anomeric forms designated  $\alpha$  and  $\beta$  furanoses. Important actions of FBP as antioxidant, cytoprotective and anti-inflammatory. Based on the described, in this work, our objective is evaluate the cytoprotective effect of FBP on MIN6 cells in monolayer and pseudoislets aggregate cells. The effects of FBP with different concentrations (0.30 mM, 0.62 mM and 1.25 mM) in MIN6 cells on the proliferation, viability and insulin synthesis. We also determined the effects of FBP in the formation, growth and viability of PIs. The results showed that all doses of FBP tested increased adhesion on MIN6 cells. However, the treatment with 0.62 and 1.25 mM of FBP causes a significant decrease in cell proliferation. Insulin synthesis detected by immunocytochemistry, basal and glucose-stimulated insulin secretion was determined by ELISA. As expected, PIs formation and growth is time dependent in the control cultures and treated with FBP. In cultures treated with FBP the formation of larger (150-300  $\mu$ m) PIs was lower than in control cultures. Propidium iodide incorporation showed an increasing percentage of nonviable PIs cells in cultures treated with 1.25 mM of FBP, including cytotoxic. More studies are required to deepen understanding of the role of cytoprotective activity of FBP in other cell types and in pseudoislets, but our results indicate in cell line MIN6, monolayers and pseudoislets, that FBP did not show cytoprotective activity.

**Key-Words:** diabetes mellitus, pseudoislets, fructose-1,6-bisphosphate, MIN6,  $\beta$  cells

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABTO	Associação Brasileira de Transplante de Órgãos
ADA	<i>American Diabetes Association</i>
APCs	Células apresentadoras de antígenos
ATP	Adenosina trifosfato
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
DCCT	<i>Diabetic Control and Complication Trial</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMG	Diabetes mellitus gestacional
FBP	Frutose-1,6-bisfosfato
FN	Fibronectina
GLUT	Transportador de glicose
GLUT 2	Transportador de glicose – 2
HEPES	Ácido N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2'-ethanesulfonic
IEQ	Equivalente de ilhotas pancreáticas
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IFN - $\gamma$	Interferon gama
IL	Interleucina
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 Beta
IL-6	Interleucina 6
IP-10	Indutor de proteína -10

INS1	Gene da insulina 1
KRB	Tampão Krebs-Ringer
LDH	Lactato desidrogenase
MCP-1	Proteína quimioatraente de macrófagos-1
MIN6	Linhagem celular derivada de células $\beta$ de insulinoma de camundongo
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NADP	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
NF- $\kappa\beta$	Fator nuclear kappa beta
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização mundial de saúde
pb	Pares de bases
PBS	Solução tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI	Pseudoilhota
RT	Transcrição reversa
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SSP1	Fator de transcrição específico da polimerase - 1
TCA	Ácido tricloroacético
TGF- $\beta$ 1	Fator de transformação do crescimento - $\beta$ 1
TNF	Fator de necrose tumoral
UV	Ultravioleta
UW	<i>Universidade de Wisconsin</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

## **PARTE I**

## 1 INTRODUÇÃO

A incidência global do diabetes mellitus (DM) tem aumentado nos últimos anos, tornando-se uma das doenças mais comuns entre patologias crônicas. Estima-se que cerca de 50% dos indivíduos com diabetes ainda não receberam o diagnóstico da doença, sendo que anualmente 4,8 milhões de pessoas morrem devido complicações (IDF, 2014) e atualmente, no mundo, 347 milhões de pessoas são afetadas pelo diabetes (WHO, 2015).

Essa é uma doença que traz elevados custos aos sistemas de saúde (ADA, 2013). Atualmente, são gastos 612 bilhões de dólares para tratamentos de saúde de indivíduos com DM no mundo. No Brasil, em 2014, o gasto destinado ao tratamento da diabetes foi, aproximadamente, 22 bilhões de dólares e de 30 bilhões de dólares para toda América Latina (IDF, 2014).

Sabe-se que os gastos relacionados à saúde são cinco vezes maiores em indivíduos diabéticos quando comparados aos dos não diabéticos. Isto ocorre porque diabéticos apresentam complicações a longo prazo como ataque cardíaco, acidente vascular cerebral, cegueira, falência renal e amputações, o que ampliam os gastos com o tratamento (YACH *et al*, 2006).

O diabetes, ao longo da história, representou uma condição clínica fatal que, com o advento da terapia com insulina exógena, há cerca de 80 anos, transformou-se em uma doença crônica (ELIASCHEWITZ, 2009). Alterações do estilo de vida que ocorrem com a globalização, com o crescimento e o envelhecimento populacional, têm aumentado a prevalência do DM (WHO, 2013).

O DM não é uma única doença, mas um grupo de doenças metabólicas caracterizadas pela hiperglicemia e resultante de defeitos na secreção de insulina, ação da insulina, ou ambos, caracterizando então a hiperglicemia crônica. O DM é frequentemente acompanhado

de outras alterações, como dislipidemias, hipertensão arterial, obesidade e disfunção endotelial (ADA, 2011).

O DM, se não tratado e acompanhado de forma adequada, geralmente progride para o aparecimento de complicações crônicas, que comprometem a produtividade, a qualidade de vida e a sobrevida (SBD, 2007).

O tratamento do DM tem como objetivo a manutenção da normoglicemia frente às variações da ingesta alimentar. O objetivo principal dessa terapia é proporcionar uma quantidade adequada de insulina para normalizar o metabolismo intermediário, reduzir lentamente a concentração sanguínea de glicose, restaurar as perdas hídricas e eletrolíticas, corrigir a acidose e identificar os fatores precipitantes, além de reduzir a concentração de glicose plasmática (GRUN, 2012).

O uso de soluções preservadoras de órgãos em transplantes é indispensável. Nesse sentido, Hirokawa et al., em 2002, publicou o seguinte: “a evolução dos transplantes depende, mais propriamente dos progressos nos métodos de preservação de órgãos do que das técnicas de cirurgia e imunossupressão” (HIROKAWA, 2002).

Com a ausência da circulação sanguínea, as células mudam do metabolismo aeróbico para o anaeróbico, e isto exige mais substrato energético para gerar ATP. O resultado é rápido, ocorre o esgotamento da energia intracelular, acúmulo de metabólitos tóxicos e ácido láctico. Então a membrana celular despolariza devido a falta de ATP, ocorrendo a entrada de sódio, saída de potássio e conseqüentemente a integridade celular é perdida. A finalidade da preservação de órgãos é prevenir ou impedir estas mudanças o mais breve possível (WATSON; DARK, 2012).

A frutose-1,6-bisfosfato (FBP) é uma substância que está sendo estudada há algum tempo e vem apresentando bons resultados como protetor celular em diversas situações clínicas (SOUTHARD,1990). Vários estudos demonstram que, por se tratar de uma

substância oriunda da degradação fisiológica da glicose, a FBP apresenta baixa toxicidade e pode ser um importante constituinte de novas formulações de soluções de preservação de órgãos para transplante.

Este trabalho, pretende abordar a ação da FBP na proliferação, viabilidade, síntese e secreção de insulina na linhagem celular MIN6, uma linhagem derivada de células  $\beta$  de insulinoma de camundongo. Também, serão analisados os efeitos do tratamento com FBP sobre a capacidade da formação de agregados tridimensionais de células MIN6, conhecidos como pseudoilhas (PI).

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Caracterizando o problema: Diabetes**

As Ilhotas de Langerhans são pequenas estruturas fortemente irrigadas, compostas de quatro tipos celulares principais: células  $\alpha$ , células  $\beta$ , células  $\sigma$  e células PP, responsáveis pela função endócrina do pâncreas, pois produzem os hormônios glucagon, insulina, somatostatina, grelina e polipeptídeo pancreático, que agem primordialmente como importantes reguladores no metabolismo de glicose (LUCHINI,2015).

O tipo celular predominante nas ilhotas é o das células  $\beta$ , que constituem cerca de 60% das ilhotas, dependendo da espécie analisada. As células  $\beta$  têm como papel principal produzir e secretar insulina, o hormônio controlador dos níveis de glicose no sangue (MATVEYENKO, 2015).

A síntese e a secreção da molécula de insulina são processos complexos que ocorrem em diversas etapas e necessitam da participação de inúmeros fatores, tais como, alguns aminoácidos, hormônios peptídicos, nucleotídeos e sobretudo, a glicose. Alguns estudos demonstram que a glicose é responsável pela indução da maioria dessas etapas, incluindo a transcrição do mRNA da pré-pró-insulina, o processamento do mRNA, a estabilização deste mRNA, a tradução em proteína e até mesmo o processamento da pró-insulina em insulina (RIBOLDI, 2014).

O diabetes mellitus (DM) compreende um conjunto de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia e são resultantes da secreção deficiente de insulina, no mecanismo de ação deste hormônio ou de ambas (DIABETES CARE, 2012).

A classificação do DM é baseada em sua etiologia e incluem quatro classes clínicas distintas: DM1, DM2, DM gestacional e outros tipos específicos de DM, denominados de pré-diabetes que são a glicemia em jejum alterada e a tolerância à glicose diminuída. Essas



categorias não são consideradas sinais clínicos e sim fatores de risco para o desenvolvimento de DM e de doenças cardiovasculares (DIABETES CARE, 2010; WHO, 2013).

O DM1 é uma síndrome autoimune órgão-específica caracterizada pela destruição seletiva das células  $\beta$  nas ilhotas pancreáticas. Compreende um grupo clínico e geneticamente heterogêneo de doenças que apresentam como característica comum os níveis elevados de glicemia e distúrbios no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas que ocorrem devido a produção ou ação deficiente da insulina pelo organismo.

No DM1, as primeiras células a invadirem as ilhotas de Langerhans são as APCs, seguidas pelos macrófagos e linfócitos T, causando a insulite. A insulite é caracterizada pelo aumento da expressão de mediadores inflamatórios como: interleucina (IL)-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . A combinação dessas três citocinas induz a expressão do receptor ou proteína de membrana pró-apoptose (FAS) na superfície das células  $\beta$  e a ativação da via NF- $\kappa$ B, aumentando sua destruição autoimune (WACHLIN *et al*, 2003 ; OSTERBYE *et al*, 2010).

O DM2, também chamado de diabetes não insulino dependente ou diabetes do adulto, corresponde a 90% dos casos da doença. Ocorre geralmente em pessoas obesas com mais de 40 anos de idade, embora, atualmente, tenha uma maior ocorrência em jovens com maus hábitos alimentares, sedentarismo e estresse. Neste tipo de diabetes, ocorre a produção da insulina pelo pâncreas, porém sua ação é dificultada pela resistência das células-alvo associada também a variados graus de deficiência de secreção de insulina pelas células  $\beta$ , o que gera a hiperglicemia (DIABETES CARE, 2010).

Por ser pouco sintomático, o diabetes pode permanecer por longos períodos sem diagnóstico e sem o devido tratamento, isso favorece a ocorrência de complicações clínicas no paciente (DIABETES CARE, 2014).

O sucesso no tratamento faz toda a diferença a longo prazo na vida do paciente diabético. Dentre as estratégias de tratamento disponíveis estão a insulino terapia e o uso de

fármacos hipoglicemiantes orais como terapia paliativa, o transplante total de pâncreas como terapia definitiva e o transplante de ilhotas pancreáticas, ainda considerado em caráter experimental (OLOKOBA, 2012).

O DCCT demonstrou de modo inequívoco que o controle estrito da glicemia é importante para evitar ou retardar as complicações microvasculares, razão pela qual a insulino terapia deve ser utilizada na sua modalidade intensiva. Deve-se preconizar a utilização da insulina basal (com uma ou mais aplicações diárias) associada à insulina de ação rápida (antes das refeições) em doses variáveis de acordo com o conteúdo de carboidratos a serem ingeridos na dieta e com os resultados da monitorização dos níveis de glicemia no paciente (DCCT, 1993).

Estudos demonstraram que a terapia intensiva com insulina, comprovadamente, diminui o aparecimento das complicações micro e macro vasculares que ocorrem no diabetes. Além disso, o desenvolvimento dos análogos de insulina e de bombas de infusão subcutânea permitiram aos pacientes um estilo de vida mais flexível. No entanto, a terapia intensiva com insulina está associada a um aumento de três vezes na incidência de hipoglicemia. Mesmo com toda a evolução da insulino terapia, ainda há um pequeno contingente de pacientes (em torno de 5% a 10%) que apresentam flutuações intensas e inesperadas de glicemia, resultando em múltiplos episódios de hipoglicemia. Para estes pacientes, o transplante de pâncreas é a alternativa que está em uso clínico e o transplante de ilhotas pancreáticas seria uma outra alternativa ainda em desenvolvimento (RHEINHEIMER, 2010).

## 2.2 Considerações sobre o Transplante de Ilhotas Pancreáticas

Conforme os últimos dados publicados da ABTO, no ano de 2014 houve uma queda no número de doações de órgãos comparado ao ano de 2013. Atualmente no Brasil, 462 pacientes estão na fila de espera para um transplante de pâncreas (ABTO, 2014).

A consequência natural da pouca oferta é a aceitação de órgãos provindos dos chamados doadores marginais, indivíduos com condições hemodinâmicas limítrofes, idade avançada, presença de infiltração gordurosa significativa afetando a qualidade do órgão, entre outros. É de conhecimento geral que, quanto pior o estado do doador, pior a qualidade do enxerto e do prognóstico do transplante, elevando-se as chances do mesmo ser danificado durante os procedimentos de retirada e implante (SHAPIRO, 2011).

No ano 2000, a Universidade de Alberta no Canadá desenvolveu o protocolo de Edmonton, utilizando-o para aprimorar o transplante de ilhotas pancreáticas. Essa técnica vem se firmando como uma alternativa eficaz para o tratamento de casos selecionados de DM1 (SHAPIRO, 2011; BRUNI *et al*, 2014). A principal vantagem do transplante de ilhotas consiste em envolver um procedimento cirúrgico pouco invasivo e bastante seguro, pois somente o tecido endócrino (que corresponde a aproximadamente 1% a 2% do pâncreas é transplantado (SHAPIRO, 2011).

O Brasil fez seu primeiro transplante de ilhotas em dezembro de 2002, conforme os dados da ABTO. Entretanto, a eficiência do transplante de ilhotas, que é ainda experimental na maioria dos países, é afetada pelo baixo rendimento do processo de isolamento/purificação das ilhotas e pela baixa viabilidade das células após o transplante (SCHARFMANN, 2003).

A experiência obtida até hoje tem demonstrado que, para atingir insulino-independência, é necessário transplantar um número suficiente de ilhotas superior a 10.000 ilhotas equivalentes (IEQ) por quilo de peso do paciente receptor (BRUNI *et al*, 2014). Mas,

as ilhotas começam a ser danificadas mesmo antes da retirada do pâncreas, uma vez que a morte encefálica do doador está relacionada com a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF, IL-1 $\beta$  e IL-6, as quais induzem apoptose das células e diminuem a qualidade do enxerto (CONTRERAS, 2003).

A secreção dessas citocinas depende em parte da ativação do NF- $\kappa$ B, que consequentemente estimula a produção de NO por parte das células  $\beta$ . O complexo formado pela citocina e o respectivo receptor regula positivamente a produção de radicais livres dependentes de NF- $\kappa$ B. Por sua vez, os radicais livres possuem efeitos nocivos nas ilhotas pancreáticas, pois inibem a liberação de insulina estimulada por glicose e estimulam a apoptose dessas células (LIU *et al*, 2011).

Outras moléculas pró-inflamatórias induzidas como receptores do tipo Toll, MCP-1 e IP-10 também contribuem para a quimioatração, ativação, proliferação e a subsequente diferenciação de células do sistema imune ao sítio do implante, comprometendo assim, a viabilidade do enxerto das ilhotas pancreáticas (BARBE-TUANA, 2006).

Além disso, os centros de isolamento de ilhotas, recebem pâncreas cadavéricos, o que faz com que o tempo de isquemia do órgão seja acima do ideal, que seria de menos de doze horas (LEITÃO, 2008). Como a isquemia causa grandes danos ao tecido pancreático, o tipo de solução utilizada para preservação do pâncreas e diminuição dos efeitos deletérios da hipóxia, tem um papel importante no resultado desses transplantes (CÔRREA-GIANNELLA, 2009).

O transplante de ilhotas pancreáticas deve ser considerado como um tratamento capaz de diminuir a ocorrência de hipoglicemias graves e melhorar o controle glicêmico em alguns pacientes diabéticos selecionados (RHEINHEIMER *et al*, 2010). Entre as principais motivações descritas pelos candidatos para realização do transplante de ilhotas, destacam-

se: a melhora da qualidade de vida, a obtenção de insulino-independência e de uma dieta sem restrições (PERCEGONA *et al*, 2008).

### **2.3 Linhagem de células $\beta$ de insulinoma de camundongo (MIN6)**

Recentes avanços na manipulação gênica permitem o melhor entendimento dos mecanismos celulares envolvidos na cultura de linhagens celulares. A utilização de células  $\beta$  primárias em pesquisas bioquímicas e moleculares é principalmente limitada pela disponibilidade de tecido pancreático endócrino (RHEINHEIMER *et al*, 2010).

Para um isolamento de células pancreáticas, a purificação dessas células e a manutenção das suas características fisiológicas é tecnicamente exigente. A pesquisa nesta área também se torna limitada pela diferença celular e heterogeneidade hormonal entre os indivíduos e, além disso, as células  $\beta$  primárias, em cultura, não proliferam (SKELIN *et al*, 2010).

O desenvolvimento de linhagens celulares a partir de tecido pancreático de roedores tem apresentado um progresso significativo ao longo dos anos, Wollheim e colaboradores, em 1990, já haviam relatado a tentativa do desenvolvimento de linhagens produtoras de insulina na pesquisa científica (WOLLHEIM, 1990). Apesar de alguns sucessos, existiram limitações significativas na utilização de linhagens de células  $\beta$  para os estudos da secreção de insulina, pois essas células ou tornavam-se inadequadas para a cultura ou eram incapazes de responder a glicose (MCCLLENAGHAN, 1999).

As fontes de onde estas linhagens celulares atualmente são obtidas incluem: insulinomas de origem espontânea, insulinomas induzidos por carcinógenos, insulinomas induzidos por vírus oncogênicos, insulinomas induzidos pela combinação de carcinógenos e vírus oncogênicos e insulinomas derivados de camundongos transgênicos, os quais

expressam oncogenes dominantes, em especial o antígeno SV40 T sob o controle dos promotores da insulina (DEMETERCO,2001).

Essas linhagens, oferecem a possibilidade de serem modificadas *in vitro* por meio de transferência de genes, podendo ter suas propriedades otimizadas, além de não necessitarem do emprego de matrizes extracelulares ou de fatores de crescimento necessários para a expansão de células  $\beta$  primárias *in vitro* (SORIA *et al*, 2000). Assim, um dos grandes objetivos da terapia gênica para diabetes é a geração de fontes ilimitadas de células que apresentem secreção normal de insulina em resposta ao estímulo da glicose, capazes de serem transplantadas sem a necessidade de imunossupressão sistêmica (MELLADO-GIL *et al*, 2012).

Ishihara e seus colaboradores, em 1993, desenvolveram e iniciaram os estudos com uma linhagem celular derivada de insulinoma de células  $\beta$  de camundongos, chamando-a de MIN6 (*Transgenic C57BL/6 mouse insulinoma cell line*) (ISHIHARA, *et al*, 1993). Em 1999, Hauge-Evans e pesquisadores comprovaram que essa linhagem se assemelha as células  $\beta$ , essa linhagem expressa o antígeno T promotor da secreção de insulina e que pode formar agregados celulares tridimensionais semelhante de ilhotas pancreáticas. Expressam também o GLUT-2, o antígeno SV40, glicoquinases e respondem à ação da glicose (HAUGE-EVANS *et al*, 1999).

Embora o comportamento das linhagens celulares não mimetize perfeitamente a fisiologia das células  $\beta$  pancreáticas, elas são ferramentas extremamente valiosas para os estudos subjacentes a funções dessas células, e podem representar uma fonte potencial em transplantes para superar a limitada disponibilidade de ilhotas pancreáticas (SKELIN *et al*, 2010).

O processo de isolamento e manipulação de ilhotas pancreáticas é simultaneamente demorado e de baixo rendimento. Jones e Mann relataram que o processamento de um

pâncreas de camundongo, utilizando a colagenase, produz entre 300 e 500 ilhotas (JONES; MANN, 1993). Por esta razão, juntamente com a constante necessidade de encontrar novas e adequadas formas para o tratamento da DM1, a atenção tem sido dirigida para a “bioengenharia”, com a formação das pseudoilhotas (PI) a partir da linhagem denominada MIN6, conhecidas como “PIMIN6” (KELLY *et al*, 2010).

#### **2.4 Considerações sobre soluções de preservação celular em transplantes**

O desenvolvimento dos transplantes e sua aplicação no tratamento das doenças terminais de alguns órgãos converteram-se num dos capítulos de maior êxito na história da medicina e, em aproximadamente três décadas, o transplante de órgãos evoluiu de um procedimento relativamente arriscado, realizado apenas em pacientes com doença renal crônica em estágio final, para uma intervenção terapêutica eficaz em pacientes com doenças terminais do coração, fígado, pâncreas e pulmão (WATSON, 2012).

A preservação de um órgão é a chave inicial para o sucesso do transplante e o sucesso de um transplante tem como fator primordial a viabilidade do enxerto. A maior parte das dificuldades atuais não se encontra na técnica cirúrgica, mas no manejo da tríade preservação-rejeição-infecção. Ao preservar um órgão, objetiva-se manter sua viabilidade pelo maior tempo possível e assegurar o seu funcionamento imediato após o transplante (YAMAKI, 2013).

Evitar o desequilíbrio redox é a principal função de uma solução de conservação de órgãos em transplante e ocorre através de alguns mecanismos, como: reduzir o edema intracelular e extracelular, prevenir a acidose intracelular, minimizar o estresse oxidativo, restaurar o metabolismo intracelular e evitar o acúmulo intracelular de cálcio (GUIBERT, 2011).

A manutenção de ilhotas viáveis e funcionais é crítica em um transplante bem sucedido. Durante os procedimentos de isolamento, as ilhotas estão expostas a uma série de insultos, incluindo isquemia, estresse oxidativo e lesão por liberação de citocinas, que causam uma redução na massa dessas ilhotas viáveis que foram transplantadas (KARAOZ *et al*, 2010).

Trabalhos com aditivos antioxidantes e hormonais, como vitamina D, estradiol, prolactina, monóxido de carbono, peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP 1), fator de crescimento semelhante a insulina -1, inibidor de proteases, piruvato, proteína quinase C, utilizados nos meios de cultura de preparações de ilhotas para transplante, resultam em redução da morte dessas células, uma melhor recuperação celular após o isolamento e melhor funcionabilidade, representando uma estratégia minimamente invasiva para a otimização do enxerto da ilhota (PILEGGI *et al*, 2004).

Um estudo de Karaoz e colaboradores, em 2010, utilizando o cocultivo de ilhotas pancreáticas com células tronco mesenquimais, demonstrou os mecanismos subjacentes que modulam a viabilidade das ilhotas pancreáticas e que podem ser atribuídos aos mediadores parácrinos IL6, TGF- $\beta$ 1, SSP1 e FN secretadas pelas células tronco (KARAOZ *et al*, 2010). Co-culturas com células-tronco mesenquimais podem ter um potencial protetor significativo por meio de ações parácrinas, tais como efeitos citoprotectores, anti-inflamatórios e anti-apoptóticos (ICHIM *et al*, 2010).

Entretanto, o aumento do número de transplantes está diretamente associado à elevação dos custos. Dentre os itens que promovem este aumento estão as soluções utilizadas para a preservação de órgãos. A solução mais utilizada para transplante de órgãos intra-abdominais é a solução de preservação desenvolvida pela Universidade de Wisconsin (UW), com o nome comercial de ViaSpan®, embora alguns trabalhos debatam suas limitações devido sua viscosidade e alta concentração de potássio (CAMERON; CORNEJO, 2015), a

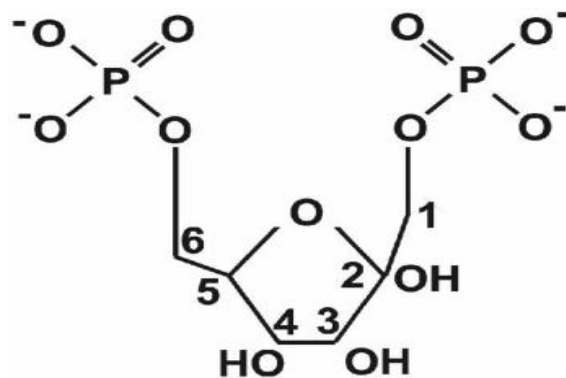


histidina-triptofano-cetoglutarato (HTK), com o nome comercial de Custodiol®, a solução Celsior e a solução do Instituto George Lopez-1 (VOIGT *et al*, 2013). Atualmente, novas tecnologias são incorporadas às soluções com a descoberta de novos aditivos de preservação. Isso irá permitir um mínimo dano celular e preservar os órgãos mais próximos ao estado funcional (CAMERON; CORNEJO, 2015).

## 2.5 Frutose-1,6-Bisfosfato

### 2.5.1 Efeitos fisiológicos: glicólise e gliconeogênese

A frutose-1,6-bisfosfato (FBP) é um açúcar bisfosforilado (Figura 1) que tem duas estruturas estáveis anoméricas, a  $\alpha$  e a  $\beta$  furanosa (KIRTLEY; MCKAY, 1977). Produzida pelo organismo de forma endógena, é classificada como um regulador metabólico, pois é um intermediário da rota glicolítica e participa de diversas reações no metabolismo energético (HANLEY *et al*, 2006).



**Figura 1:** Adaptação do diagrama esquemático da molécula de frutose-1,6-bisfosfato (LIU *et al*, 2011).

A glicose é a principal fonte de energia utilizada pelas células. Através de uma série de reações catalisadas por diferentes enzimas, a glicose é metabolizada, com liberação de energia. A captação da glicose não envolve gasto energético (difusão facilitada) e é mediada

principalmente por uma família de proteínas transmembrana (GLUT). Após a ligação da glicose na porção extracelular, estes transportadores sofrem uma mudança conformacional que resulta no transporte desta molécula de glicose para o meio intracelular (BELL *et al*, 1990).

O papel da glicose é fornecer energia química e metabólitos para a manutenção e o funcionamento dos diversos tecidos do organismo (GUYTON; HALL, 2006; ARONOFF *et al*, 2004).

A oxidação da glicose é conhecida como glicólise ou via de Embden-Meyerhof em mamíferos e é principal via no fornecimento de energia à maioria das células. Devido a sua capacidade de disponibilizar ATP rapidamente e não depender do metabolismo oxidativo e, conseqüentemente, da presença de O<sub>2</sub>, esta via assume fundamental importância para a sobrevivência celular (STANLEY; CONNETT, 1991), sendo, portanto, fortemente regulada por vários mecanismos diferentes (BEITNER *et al*, 1979).

### **2.5.2 Efeitos protetores: uso exógeno de FBP**

O uso exógeno da FBP, exerce efeitos em uma ampla variedade de modelos experimentais, desde culturas de células, tecidos ou órgãos isolados de modelos *in vivo*. Quanto aos efeitos metabólicos, as evidências apontam efeitos sinérgicos deste metabólito (ALVA, 2011).

Os efeitos descritos de FBP incluem: diminuição do consumo de ATP pelo aumento da eficiência metabólica (ESPANOL *et al*, 1998), transporte ativo e passivo transmembrana através de canais de íons (ROIG *et al*, 1997). Além disso, a FBP exerce propriedades quelantes sobre o cálcio intracelular regulando, assim, a apoptose (CALAFELL *et al*, 2009).

Ehringer e seus colaboradores, em um estudo no ano de 2000, publicou que a FBP pode passar através das membranas celulares. Também mostrou que a FBP, uma vez dentro

das células do tecido cardíaco, pode aumentar o metabolismo desses cardiomiócitos. Vários outros estudos indicam que a FBP pode atravessar a bicamada lipídica da membrana plasmática (HARDIN; ROBERTS, 1994).

Análises por espectroscopia de ressonância magnética nuclear demonstraram a metabolização da  $^{13}\text{C}$ -FBP por segmentos das artérias carótidas suínas (HARDIN *et al*, 2001). Um achado semelhante utilizando FBP em fatias de cérebro de neonatos de rato foi relatado por Espanol e colaboradores (1998). No entanto, a permeabilidade da FBP através da bicamada lipídica da membrana plasmática tem sido questionada em vários estudos (ESPANOL *et al*, 1998).

Por exemplo, Roig e colaboradores, em 1997, sugeriram que a FBP não atravessa a membrana celular, mas sim altera o fluxo de potássio que por sua vez diminui a demanda de ATP pela célula (ROIG *et al*, 1997).

A diminuição do fluxo de potássio por FBP também foi documentada em um estudo realizado por Galzigna e Rigobello (GALZIGNA; RIGOBELLO, 1986).

Existem consensos controversos sobre a forma como a FBP exógena ao ser adicionada ao meio de cultivo, se pode entrar nas células, complementar ou preservar os níveis de ATP (HANLEY *et al*, 2006).

Uma das conclusões importantes de diversos estudos é que a FBP é uma molécula solúvel em água e pode difundir passivamente através das bicamadas da membrana plasmática (DIAS, 2014). A quantidade de FBP que pode mover-se passivamente através das camadas da membrana é relativamente pequena. No entanto, o significado dessa quantidade quando comparada com a concentração celular interna da FBP já é considerável. Esta descoberta tornou-se importante no campo da preservação de órgãos, de tecidos, e das necessidades em processos isquêmicos já abordados (LU *et al*, 2013).

Em alguns trabalhos, foram descritos os efeitos protetores da FBP em lesões hepáticas induzidas por agentes químicos, onde ocorreram a reversão dos danos envolvidos na isquemia e na reperfusão do órgão (BOUDJEMA, 1991). Também efeitos benéficos nos casos de septicemia em murinos, provocando uma diminuição do índice de mortalidade nos ratos quando tratados com FBP (KLEMPNAUER, 2002; BRASS, 1993). A FBP é capaz de aumentar a sobrevivência de animais submetidos à sepse experimental, diminuir a liberação das enzimas hepáticas que são usadas como marcadores de dano, como as transaminases e a lactato desidrogenase (DE OLIVEIRA *et al*, 1992; DE MELLO *et al*, 2011).

Os mecanismos pelos quais a FBP protege as células e tecidos não são claros. Um possível mecanismo de proteção inclui o metabolismo anaeróbico da FBP em gerar adenosina trifosfato (ATP) (GOBBEL *et al*, 1994) ou reduzir a sua perda (GREGORY *et al*, 1990), e/ou pela sua propriedade quelante de cálcio na modulação de segundos mensageiros (HASSINEN; NUUTINEN *et al*, 1991).

O mecanismo pelo qual a FBP reduz a formação de radicais livres pode ser decorrente do aumento nos níveis de ATP, tendo em vista que este pode ser o regulador fisiológico da atividade catalítica da enzima NADP, uma das enzimas responsáveis pela produção destes radicais (BABIOR; PETERS, 1981). A FBP inibe a formação de espécies reativas de oxigênio e a ativação de neutrófilos (SOLA *et al*, 2003), reduz a proliferação e a viabilidade de linfócitos T (NUNES *et al*, 2003) e também inibe a apoptose em hepatócitos (CALAFELL; BOADA *et al*, 2009).

Outros trabalhos mostram que a FBP é capaz de aumentar o potencial antioxidante das células por aumentar os níveis de glutatona e a atividade da catalase (DE MELLO *et al*, 2011; GUIMARAES *et al*, 2007) e com isso, impedir a ativação das células estreladas hepáticas (DONG *et al*, 2014). Entretanto, um estudo recente mostrou resultados conflitantes, sugerindo que a eficácia da FBP contra hepatocarcinoma foi causada por uma

atividade pró-oxidante, devido a uma maior produção de peróxido de hidrogênio ocorrido nos experimentos (LU *et al.*, 2013).

### 3 JUSTIFICATIVA

Em estudos prévios, diversos autores relatam as propriedades terapêuticas antioxidantes e anti-inflamatórias da FBP em modelos animais e em culturas celulares. Os estudos demonstram que, por se tratar de uma substância oriunda do metabolismo da glicose, ela apresenta baixa toxicidade e pode ser um importante constituinte para novas formulações de soluções de preservação de órgãos para transplante.

A liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e citocinas pró-inflamatórias em culturas isoladas, contribui significativamente na diminuição da viabilidade dessas células (MORESCO *et al.*, 2004). Sabendo-se que nas células em cultivo, os mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas e ROS são liberados e comprometem a atividade celular, tornou-se importante considerar que a FBP possa reverter a ação desses mediadores. Por essa razão, esse estudo tem como finalidade avaliar a ação citoprotetora da FBP sobre a viabilidade da linhagem celular MIN6, em monocada e na formação de pseudoilhotas.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo Geral**

Este trabalho tem como finalidade a avaliação da possível atividade protetora da FBP sobre a linhagem celular MIN6.

### **4.2 Objetivos Específicos**

1 – Objetivo 1: Implantação dos protocolos de cultivo de pseudoilhotas (PIs) derivadas da linhagem celular MIN6.

Meta 1 – Determinar a funcionalidade das PIs, através da avaliação da síntese de insulina e capacidade de resposta à glicose.

2 - Objetivo 2: Análise do efeito protetor da FBP sobre monocamadas e na formação de PIs da linhagem celular MIN6.

Meta 1 – Avaliar os efeitos de diferentes doses de FBP sobre o crescimento em monocamada e na formação de PIs, em diferentes tempos de cultura.

Meta 2 – Avaliar os efeitos da FBP sobre a formação, crescimento e viabilidade das PIs.

## **PARTE II**



## **5 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1 Cultura Celular da linhagem MIN6**

#### **5.1.1 Monocamada de MIN6**

Para crescimento em monocamada, as células MIN6 (*Transgenic C57BL/6 mouse insulinoma cell line*), provenientes do banco de células do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro/RJ, foram mantidas em garrafas para cultura celular de 25 cm<sup>2</sup> em DMEM *high glucose*, 1 µL de β-mercaptoetanol, 1 % de antibiótico, 2,5 mL de L-glutamina, concentração de 10% soro fetal bovino e 1 % HEPES. Todas as culturas foram mantidas em estufa a 37°C e com 5% CO<sub>2</sub> em incubadora umidificada e a troca de meio realizada a cada dois dias.

#### **5.1.2 Pseudoilhotas de MIN6**

Para formação de PIs, as células MIN6 foram semeadas na proporção de 2 x 10<sup>4</sup> células/mL, em placas petri de plástico não aderentes e mantidas em cultura por 07 dias. Utilizamos o mesmo meio utilizado para as monocamadas e a troca de meio era realizada apenas no quarto dia.

Após este período, espontaneamente formam-se estruturas tridimensionais semelhantes a ilhotas pancreáticas, denominadas de pseudoilhotas.

### **5.2 Diluição da Frutose-1,6-Bisfosfato (FBP)**

Para utilização nos experimentos, a FBP (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo), foi diluída em meio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) high glucose (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo), previamente preparado conforme recomendado pelo fabricante. As concentrações finais de frutose utilizadas foram: 0,30 mM, 0,62 mM, 1,25 mM. As concentrações de FBP seguiram as propostas na literatura para atividade

citoprotetora (OLIVEIRA, 2008; GRUN, 2012; MESQUITA, 2013; DIAS, 2014). As análises foram feitas em diferentes tempos ao longo dos experimentos descritos e durante 10 dias dos tratamentos das culturas. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

### 5.3 Caracterização funcional da linhagem celular

#### 5.3.1 Produção de insulina

##### 5.3.1.1 Extração de RNA Total, síntese do cDNA e expressão do mRNA

O RNA total de culturas em monocamada e de pseudoilhotas foi extraído por TRIzol® (Invitrogen, Estados Unidos) segundo o protocolo do fabricante. Após a extração, o RNA total foi quantificado por absorvância UV no aparelho BioPhotometer Plus (Eppendorf, Alemanha). A síntese de cDNA foi realizada a partir da mesma concentração de RNA para cada amostra (1,2 µg), com a enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen, Estados Unidos).

As sequências de *primer* foi desenhada com o software IDT Design Software (Integrated DNA Technologies Inc., USA), disponível no *GenBank*.

As reações de PCR foram realizadas em um termociclador Veriti® (Applied-Biosystem, Estados Unidos), com o kit comercial da Invitrogen®, Estados Unidos e os produtos do PCR, foram visualizados após eletroforese em gel de agarose 2,5 %. Foi utilizada a β-2-Microglobulina. (β2-Micro) como gene endógeno.

As sequências dos *primers* para os genes INS1 (NM 008386.3) e Microglobulina (NM 009735) foram: INS1 direto 5' - GGCATCCAGTAACCCCCAGCC -3', INS1 reverso 5' - GGCTCCCAGAGGGCAAGCAG -3'; β2-Micro direto 5' - TCC TGG CTC ACA CTG AAT TC- 3', β2-Micro reverse 5' - CTG CGT GCA TAA ATT GTA TAG CA -3'.

### **5.3.1.2 Coloração com Ditizona**

A coloração com ditizona, para detecção de grânulos de insulina no citoplasma celular, foi realizada nas culturas, utilizando 50 mg de ditizona em 5 mL de DMSO (Sigma, St. Louis, EUA). A solução foi filtrada em filtro de 0,22 µm de diâmetro (Millipore, Massachusetts, EUA).

## **5.4 Secreção de insulina**

A secreção de insulina foi determinada por imunocitoquímica em microscopia Confocal nas pseudoilhotas. As pseudoilhotas foram coletadas por centrifugação (5 minutos a 1200 rpm). O pellet formado após essa centrifugação, foi lavado com PBS e fixado em paraformaldeído tamponado a 4%, por 10 minutos. As células foram permeabilizadas e os sítios inespecíficos bloqueados com 1% BSA, 0,1% TritonX-100 e 0,05% Tween 20, por 30 minutos. A expressão da insulina foi detectada com anticorpo policlonal Dako A0564, produzido em porco da índia, diluição 1:150, por 1 hora em temperatura ambiente. O anticorpo secundário, IgG contra porco da índia, foi conjugado com TRITC, na diluição 1:500, por 1 hora em temperatura ambiente. Os núcleos foram revelados utilizando-se o corante Hoechst. As imagens foram adquiridas em um Microscópio Confocal Olympus FV1000.

### **5.4.1 Secreção de insulina em responsividade à glicose**

A estimulação da secreção de insulina pelas células está diretamente ligada a responsividade à presença de mais ou menos glicose. Para as diluições da glicose utilizada neste experimento (soluções de 2,8 mM e 28 mM), foi usado o tampão Krebs-Ringer (KRB) (HOLMES et. al., 1995; MERANI; SHAPIRO, 2006).

Foram coletadas nas culturas entre 10 a 15 agregados de pseudoilhotas. Como controle positivo, foram utilizadas ilhotas pancreáticas murinas cedidas pela Dra. Florência coordenadora do Laboratório de Biologia Molecular deste departamento. As células foram incubadas por 30 minutos nas diferentes soluções de KRB suplementadas com as duas concentrações de glicose. Nas placas de 6 poços, onde estavam as monocamadas MIN6, foram tripsinizados um poço por placa, obtendo-se  $2 \times 10^4$  células/mL e usadas as mesmas concentrações de glicose para as incubações.

Após esse período o sobrenadante foi coletado e a insulina secretada mensurada pelo método de ELISA. Os ensaios para avaliação da secreção de insulina estimulada por glicose pelas células MIN6 em monocamada, pseudoilhotas e ilhotas pancreáticas primárias, foram realizados no B.E.T Laboratories no Rio de Janeiro/RJ, através do kit de ELISA, Insulin Coat-A-Count® Rat/mouse (Siemens, Estados Unidos).

## **5.5 Efeitos do uso da FBP sobre a linhagem celular MIN6**

### **5.5.1 Curva de proliferação celular**

Para a curva de proliferação celular em monocamada, foram plaqueadas  $5 \times 10^4$  céls/mL por poço em uma placa de 24 poços aderentes. O experimento foi dividido em quatro grupos, com seis poços para cada tratamento de FBP (0,30 mM, 0,62 mM e 1,25 mM). Após 24, 48, 72, 96 e 120 horas do plaqueamento, as culturas eram tripsinizadas (tripsina/EDTA 0,25%) e contadas em câmara de Neubauer utilizando o azul de tripan 0,4%, por três observadores diferentes.

### **5.5.2 Ensaio da Sulforrodamina B**

Foram plaqueadas, em três placas de 24 poços,  $5 \times 10^4$  células/mL por poço de placa. Os testes foram realizados após 2 horas, 24 horas e 72 horas, com seis poços para cada

concentração de FBP (0,30 mM, 0,62 mM, 1,25 mM) e controle. Após o término de cada tempo, o meio da placa foi descartado, as culturas lavadas por três vezes com PBS, as células fixadas com 200 µL de paraformaldeído 4%, por 15 minutos. Após remoção do fixador e lavagem das culturas com PBS, foi adicionada a sulforrodamina B (250 µL) por 1 hora, O corante foi descartado e as culturas lavadas com água destilada para retirar toda a sulforrodamina não ligada a proteínas. A sulforrodamina adsorvida nas células foi solubilizada em 1 mL de SDS 1%. A absorbância foi medida em espectrofotômetro de microplacas com comprimento de onda de 560 nm.

### **5.5.3 Formação de pseudoilhotas (PIs)**

Foram semeadas  $2 \times 10^4$  células/mL em placas petri, não aderentes, medindo 10 cm de diâmetro. Em cada placa petri, foi colocada uma concentração de FBP diferente (0,30 mM, 0,62 mM, 1,25 mM) e o controle sem tratamento. A mensuração do tamanho das células foi feita em triplicata por três observadores diferentes a cada 48 horas, durante 10 dias, utilizando a régua micrométrica do microscópio óptico invertido (Nikon, Japão). Foi medido o maior eixo transversal e longitudinal de 100 células viáveis de cada preparação, utilizando a objetiva de aumento em 20 vezes. As PIs foram classificadas conforme o tamanho em pequenas (30 -50 µm), médias (80 - 100 µm) e grandes (150 - 300 µm).

### **5.5.4 Viabilidade das pseudoilhotas (PIs)**

Após 10 dias em cultura as PIs eram dissociadas com tripsina e as células lavadas com PBS. Posteriormente, as células eram incubadas com iodeto de propídeo diluído em tampão de marcação (1:10), por 15 minutos à temperatura ambiente, em local escuro, seguindo as instruções do fabricante.

A análise foi realizada em um citômetro de fluxo, FACScan Calibur (BD®, Estados Unidos). Foram adquiridos 20 mil eventos e os resultados analisados pelo programa FCS Express 4 Flow Citometry (De Novo Softwares - Estados Unidos).

## **5.6 Análises estatísticas**

Para avaliarmos os efeitos dos tratamentos e do tempo, na contagem e no tamanho das PIs, utilizou-se a técnica equação de estimação generalizada (GEE). Além disso, a variável tempo entrou no modelo como um fator, bem como foi testada a interação de tempo e tratamento nas contagens.

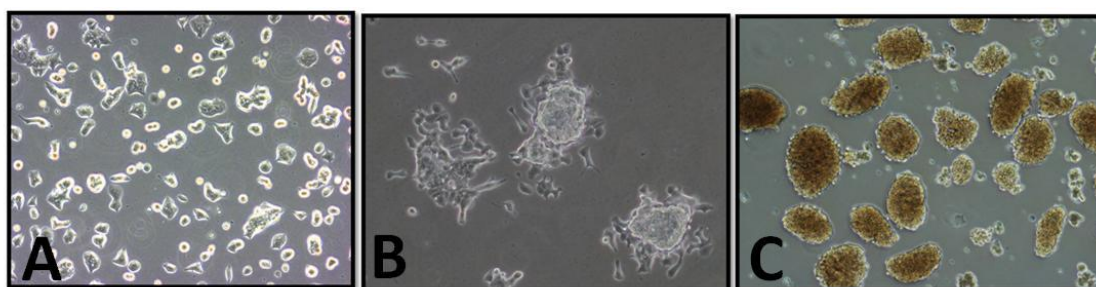
Para cada um dos tamanhos das PIs (pequenas, médias e grandes) foi realizado um modelo, totalizado assim, três modelos. As análises foram realizadas utilizando o PROC GENMOD no software SAS 9.2 (Inst., Cary, Estados Unidos).

No ensaio de adesão e proliferação celular (método de Sulforrodamina B), foi utilizado análise de variância de duas vias (ANOVA) seguida do teste Tukey com valor de 5% de nível de significância. Neste caso, o tempo não configura dependência entre as observações, sendo utilizado como fator fixo. A análise foi realizada utilizando o programa PROC GENMOD SAS 9.2 (Inst., Cary, Estados Unidos).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Estabelecimento da cultura de MIN6 em monocamada e da formação de PIs

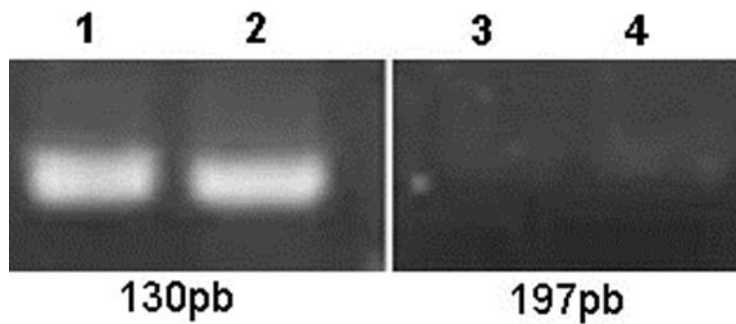
Inicialmente estabelecemos em nosso laboratório, o protocolo para cultura da linhagem MIN6 em monocamada e para a formação de pseudoilhotas (Figura 2). Para a formação de pseudoilhotas, determinamos a melhor densidade de semeadura que foi  $2 \times 10^4$  cels/mL e o tempo necessário para a sua formação entre 07 a 10 dias.



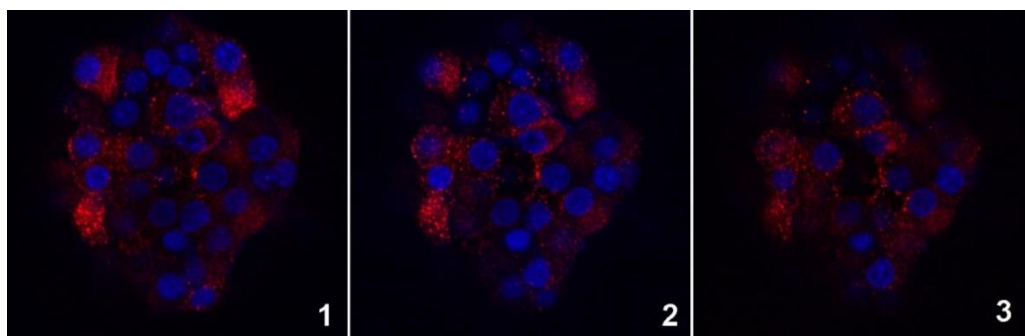
**Figura 2: Cultura de células MIN6.** Em monocamada; (A) Início da formação de PIs após 5 dias em cultura; (B) PIs após 10 dias em cultura; (C). Observação em microscópio de contraste de fase. Aumento original de 200x.

### 6.2 Caracterização funcional da linhagem celular: secreção de insulina

Para confirmarmos a natureza endócrina das células, determinamos a expressão do mRNA (Figura 3), para a expressão gênica e secreção da insulina (Figura 4). As células também foram coradas positivamente com ditizona (figura 5) e a capacidade celular para a secreção de insulina, tanto em monocamadas de linhagem MIN6 quanto em pseudoilhotas está demonstrada na tabela 1.

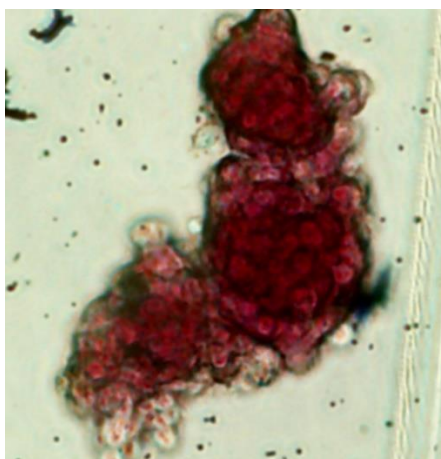


**Figura 3: Expressão gênica da insulina.** Gel de agarose 2,5% corado com SYBR Safe e observado sob luz ultravioleta. Linhas 1 e 3 (MIN6 - pseudoilhotas); linhas 2 e 4 (MIN6 – monocamada). Produto de PCR de 130 pb esperado para o mRNA Ins1. Produto de PCR de 197 pb esperado para a  $\beta$  2-Microglubulina.



**Figura 4: Expressão da proteína insulina em pseudoilhotas (PIs).** A insulina foi detectada por imunocitoquímica conforme descrito em Materiais e Métodos. Vermelho: grânulos de insulina; azul: núcleos das células corados com Hoechst 33342. As imagens 1, 2 e 3 representam diferentes secções de microscopia confocal.





**Figura 5: Pseudoilhota corada com ditizona.** Observada em microscópio de contraste de fase. Aumento original de 200x.

A secreção de insulina basal estimulada por glicose, foi determinada em monocamadas e em PIs. Os resultados, na tabela 1, mostram claramente o estímulo produzido pelo aumento da concentração de glicose no meio de incubação. Uma preparação de ilhotas pancreáticas de camundongos, cedidas pelo laboratório de Biologia Molecular deste departamento, foi utilizada como controle positivo e água destilada como o controle negativo da reação.

**Tabela 1: Secreção de insulina basal estimulada por glicose, determinada pelo método de ELISA**

<b>Secreção de Insulina</b>	<b><math>\mu\text{UI/mL}</math></b>
Ilhota (2,8 mM glicose)	72,92
Ilhota (28 mM glicose)	135,9
PI (2,8 mM)	3,14
PI (28 mM)	8,44
MIN6 (2,8 mM)	3,22
MIN6 (28 mM)	6,53

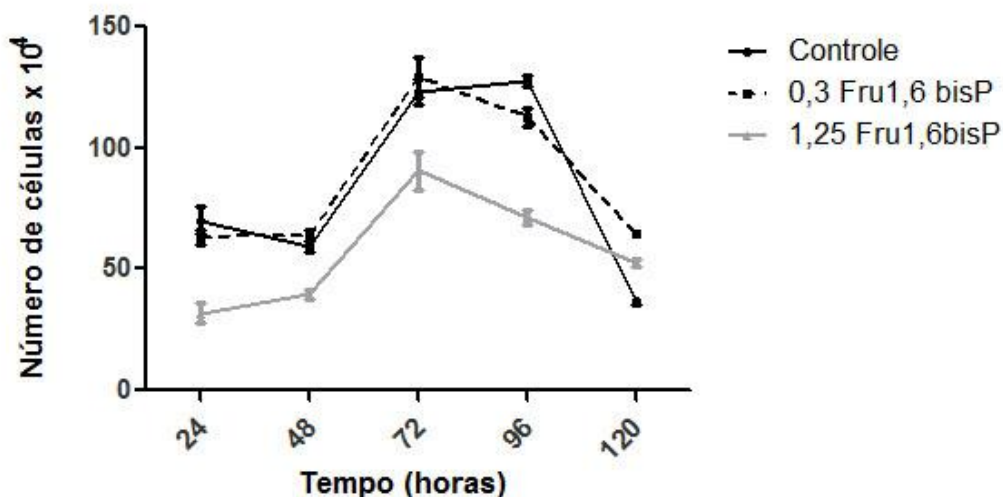
Experimento realizados em triplicada (n=3).

### 6.3 Efeito da FBP sobre a adesão e a proliferação em monocamada (MIN6)

A determinação das propriedades de adesão e a curva de proliferação são importantes para a caracterização do comportamento de células em cultura. Essa curva reflete as fases de adaptação das células às condições ambientais, à disponibilidade de nutrientes e ao suporte de ancoragem necessários para promover a produção de novas células.

Na figura 6, o efeito dos tratamentos com 0,30 mM e 1,25 mM de FBP sobre a proliferação foi determinado pela contagem das células após 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h.

Observamos uma curva de proliferação, apresentando uma fase de crescimento lenta até 48 h e exponencial de 48 h até 72 h, quando as culturas atingem a confluência. A partir de 96 h o número de células começa a diminuir. Os resultados mostram, já nas 24 h, a inibição significativa da proliferação nas culturas tratadas com 1,25 mM de FBP. As culturas tratadas com 0,30 mM de FBP apresentaram comportamento semelhante as culturas controle.

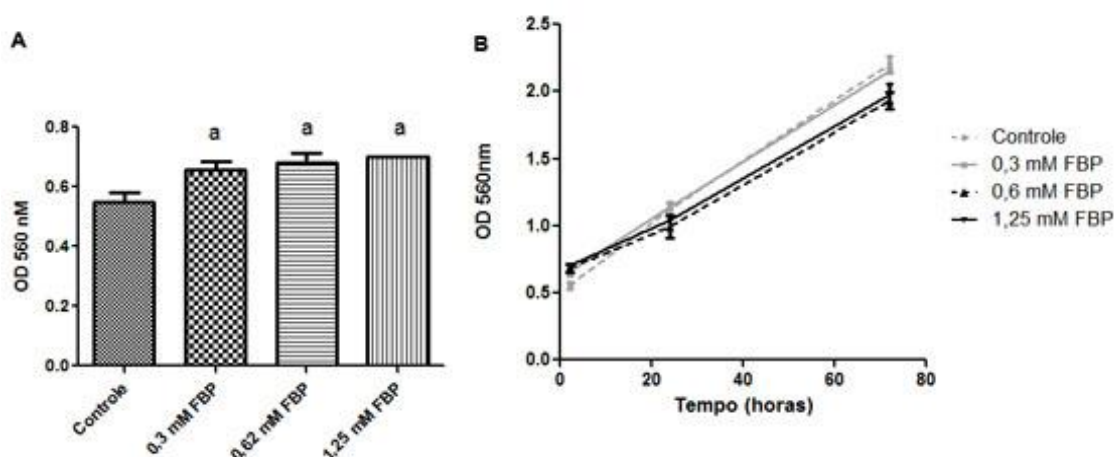


**Figura 6: Curva de proliferação de células MIN6 tratadas com diferentes doses de frutose-1,6-bisfosfato (FBP).** As células foram contadas com azul de tripan e cada ponto representa a média  $\pm$  SD, n =6.

A figura 7 representa a adesão e a proliferação de células MIN6 avaliada através do ensaio da Sulforrodamina B (SRB). A SRB é um corante que se liga de forma

estequiométrica aos aminoácidos básicos das proteínas celulares, sendo assim a quantidade de corante extraído da camada celular é proporcional a quantidade de proteína da amostra. O ensaio da SRB, também é utilizado como um indicativo de sobrevivência celular (HOUGHTON *et al*, 2007).

Os resultados apresentados na figura 7A mostram que a FBP aumenta significativamente a adesão das células MIN6 de maneira independente da dose. Já a figura 7B e a Tabela 2 mostram os efeitos da FBP sobre a proliferação das células MIN6. Embora a FBP aumente a adesão, as doses de 0,62 e 1,25 mM inibem significativamente a proliferação já em 24 h. Esses resultados confirmam os encontrados na contagem celular mostrada na figura 6.



**Figura 7: Efeito da FBP sobre a adesão (A) e proliferação de células MIN6 (B).** A adesão e proliferação foram determinadas pelo método da Sulforrodamina B conforme descrito em Materiais e Métodos, nos tempos de 2 h (adesão) e 24 e 72 h (proliferação). Os valores representam a média  $\pm$  SD de pelo menos dois experimentos realizados em triplicatas. (a) todos os grupos tratados com FBP diferem do grupo controle.  $P < 0,05$ .

**Tabela 2: Análise estatística da proliferação celular avaliada pelo método da Sulforrodamina B**

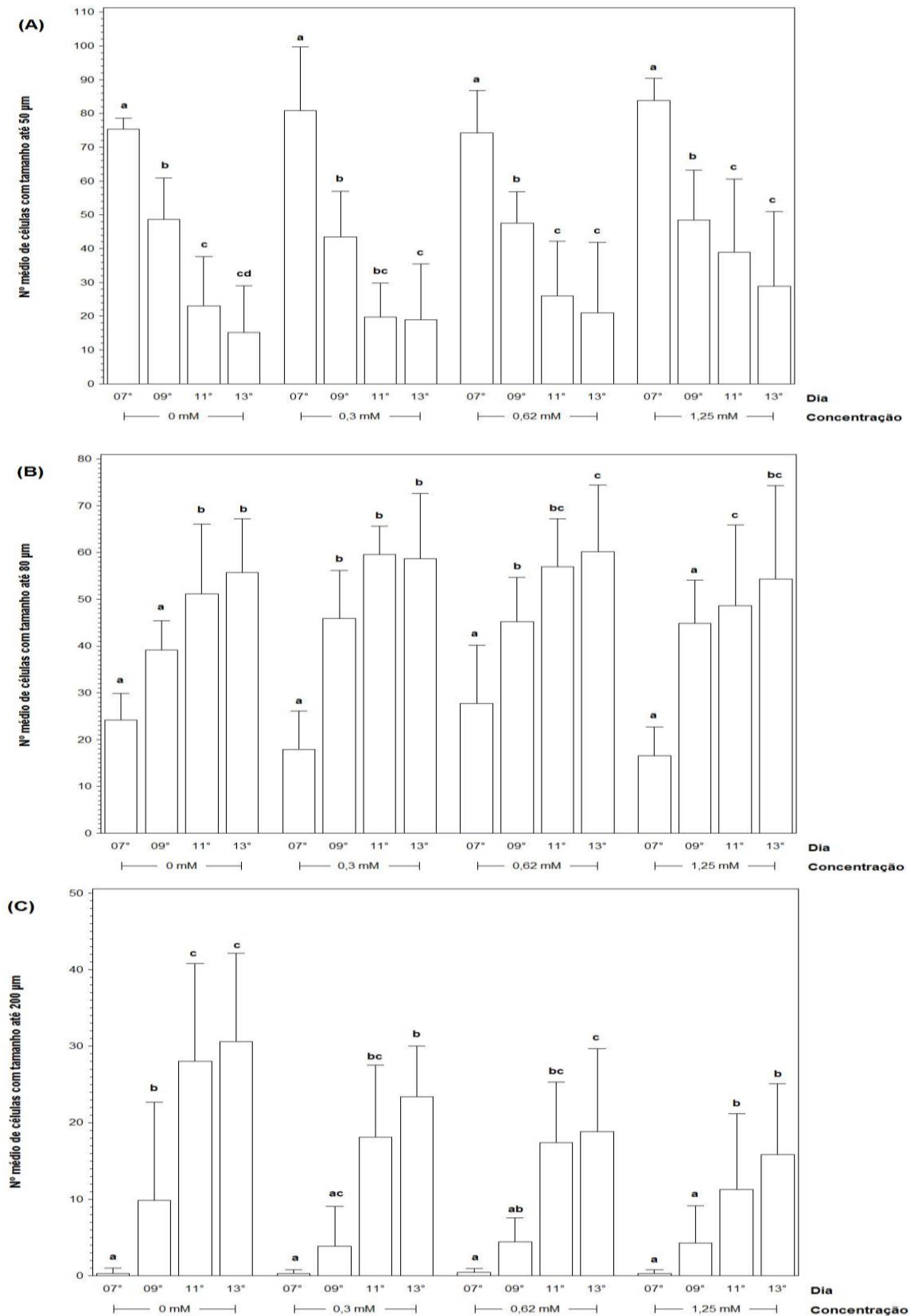
Tratamentos FBP	Tempo (horas)		
	2 horas	24 horas	72 horas
0 mM	0,54 bA	1,12 aB	2,20 aC
0,30 mM	0,65 abA	1,13 aB	2,15 aC
0,62 mM	0,68 abA	0,99 bB	1,93 bC
1,25 mM	0,70 aA	1,03 bB	1,98 bC

Comparação múltipla de médias por ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Tukey. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna significam diferença estatística em nível de 5%. Letras maiúsculas diferentes na mesma linha significam diferença estatística em nível de 5%. A ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo do fator tempo e da dose de FBP.

#### **6.4 Efeito da FBP sobre a formação e crescimento das PIs**

As figuras 8A, B e C mostram a ação dos tratamentos (0 mM, 0,30 mM, 0,62 mM, 1,25 mM) na formação e crescimento das pseudoilhotas nas culturas de células MIN6. A formação de PIs inicia, aproximadamente, entre o quinto e sétimo dia de cultura MIN6. Para avaliação da formação e crescimento das PIs foram realizadas quatro contagens e medições de 100 PIs a partir do sétimo dia, com intervalos de 48 h. As PIs foram classificadas em pequenas (30 -50  $\mu\text{m}$ ), médias (80 - 100  $\mu\text{m}$ ) e grandes (150 - 300  $\mu\text{m}$ ).

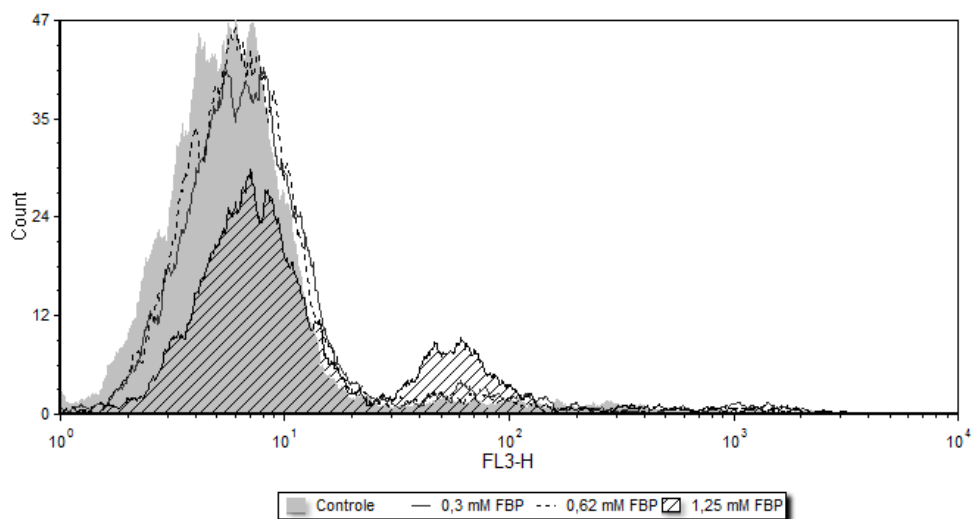
Observamos neste experimento que o crescimento das PIs é tempo-dependente (Figura 8A, B e C) e que, a partir da segunda contagem, os tratamentos com FBP diminuía a formação de PIs de tamanho grande, como na figura 8C. Após a quarta avaliação, em 15 dias em cultura, as células entram em declínio em seu crescimento.



**Figura 8: Avaliação do efeito da FBP sobre a formação e crescimento das PIs em culturas de células MIN6 ao longo do tempo: (A): Número médio de pseudopodios pequenos (até 50 μm); (B): Número médio de PIs médias (até 80 μm); (C): Número médio de PIs grandes (até 200 μm). A contagem e medição das PIs foi realizada conforme descrito em materiais e métodos em três experimentos independentes. Letras diferentes representam diferenças significativas para um  $P < 0,05$ .**

## 6.5 Efeito da FBP sobre a viabilidade das PIs

A viabilidade celular analisada por citometria de fluxo foi afetada ao utilizarmos nas culturas a maior dose de FBP (1,25 mM), quando aumentou a quantidade de células mortas ao analisarmos as PIs, como mostra a figura 9.



**Figura 9: Análise da viabilidade das pseudoilhotas por citometria de fluxo.** A viabilidade foi avaliada pela incorporação do iodeto de propídeo, conforme descrito nos materiais e métodos. Experimento representativo de três outros realizados nas mesmas condições.

### **PARTE III**

## 7 DISCUSSÃO

Esforços têm sido feitos para melhorar as diversas etapas do isolamento e do transplante de ilhotas pancreáticas. O futuro de qualquer modalidade de terapia de reposição celular para o tratamento do diabetes, dependerá da criação de uma fonte sustentável de tecido secretor de insulina e com o desenvolvimento de novas técnicas de preparação das ilhotas, além do rígido controle da imunossupressão nos pacientes. Com isso, será possível atingir a insulino-independência com a infusão de massa celular menor e o transplante de ilhotas poderá oferecer a mesma eficácia clínica que o transplante de pâncreas, com menor custo e com menor morbidade (ELIASCHEWITZ,2009; RHEINHEIMER, 2010).

O sucesso do transplante de pâncreas criou a motivação para que o transplante de ilhotas se desenvolvesse. Esta nova modalidade cria a oportunidade para que novas técnicas sejam estudadas e aprimoradas (DEMETERCO,2001). Sabe-se do limitado potencial de replicação das células  $\beta$  adultas, e isso despertou nos pesquisadores um grande interesse no estudo de seus precursores como fonte de tecido para transplante (GABA *et al*, 2012).

Neste sentido, o desenvolvimento de linhagens de células derivadas de insulinomas de animais de laboratório representam uma alternativa amplamente utilizada para o estudo de mecanismos fisiológicos e patofisiológicos que envolvem o metabolismo de glicose e para o estabelecimento de modelos *in vitro* envolvendo danos de célula beta que ocorrem em DM1 (FRODIN *et al*, 1995; GYLFE AND HELLMAN, 1986; HILL; *et al*, 1987).

Quando se trabalha em experimentos que necessitam do uso de células em cultura, é necessária a avaliação constante das células. Uma das formas de se avaliar o crescimento celular é sua quantificação. A quantificação é utilizada para definir a viabilidade celular, as condições de crescimento e o início de experimentos. Como forma de quantificação direta, o método mais utilizado é a contagem em câmara de Neubauer com o azul de tripan. No



método indireto, as técnicas são baseadas no metabolismo celular ou até mesmo na dosagem de macromoléculas presentes na célula, como as proteínas e/ou o DNA (MOLINARO,2010).

Neste trabalho, utilizamos como modelo a linhagem de insulinoma murino (MIN6), para a qual estabelecemos os protocolos de cultura em nosso laboratório.

Seguindo uma publicação de Baserga, a contagem de células em uma placa petri diz quanto a população celular cresceu, porém não informa as células que estão ou não proliferando. Quando desejamos determinar o efeito de qualquer alteração da proliferação celular no meio de cultura, ou seja, sua capacidade de estimular ou inibir a divisão celular, o método mais indicado é contar o número de células antes e após o tratamento (BASERGA,1990).

Essa linhagem, quando em cultura, agrega-se espontaneamente em crescimento tridimensional, formando as chamadas pseudoilhotas, estruturas celulares em formato e tamanho semelhantes a ilhotas pancreáticas primárias que crescem entre 7 a 10 dias em cultura (RODERIGO-MILNE *et al*, 2002), característica que também pudemos observar em nossos experimentos.

As células  $\beta$  pancreáticas expressam a molécula de adesão cálcio-dependente (E-caderina), que parece ter um papel importante na regulação da agregação das células  $\beta$  constituintes das ilhotas pancreáticas e consequente manutenção da citoarquitetura destas ilhotas (DAHL *et al*, 1996; ROUILLER *et al*, 1991; YAMAGATA *et al*, 2002). Hauge-Evans e colaboradores em 1999, mostraram que a formação de pseudoilhotas a partir de uma suspensão de células  $\beta$  da linhagem MIN6 é dependente desta proteína e a exposição *in vitro* ao anticorpo anti-E-caderina bloqueia a formação destas estruturas.

A utilização, fosforilação e o transporte de glicose, assim como a resposta secretória estão bem caracterizados na linhagem MIN6 (ISHIHARA *et al*, 1993). Estas características são similares àquelas encontradas em ilhotas isoladas, indicando que a linhagem MIN6 pode

ser um modelo apropriado no estudo de mecanismos de secreção de insulina estimulado por glicose em células beta pancreáticas (ISHIHARA *et al*, 1993; HAUGE-EVANS *et al*, 1999).

Apesar das linhagens tumorais não mimetizarem perfeitamente a fisiologia das células  $\beta$  primárias, elas são ferramentas extremamente importantes para o estudo de eventos moleculares que envolvam a função/disfunção destas células (POITOUT; OLSON; ROBERTSON, 1996).

A secreção de insulina realizada pelas ilhotas pancreáticas depende da ação sincronizada das células  $\beta$ . A biossíntese, a secreção basal e a secreção estimulada dessa insulina, dependem da citoarquitetura da ilhota que é ditada pela expressão diferencial de moléculas de adesão (ARONOFF *et al*, 2004). No presente trabalho, avaliamos a natureza endócrina das células determinando a expressão do mRNA do gene INS1, em monocamadas de MIN6 e em PIs. Os resultados obtidos indicaram que tanto as monocamadas como as PIs expressaram o gene INS1. A síntese da proteína insulina, detectada por imunocitoquímica, foi visualizada por microscopia confocal, evidenciando a presença dos grânulos de insulina nas “pseudoilhotas”.

Avaliamos a secreção de insulina basal e estimulada por glicose, tanto em monocamadas como em PIs. Ao compararmos com as ilhotas pancreáticas de camundongos, mesmo que não seja possível evidenciar uma relação quantitativa entre ilhotas primárias, monocada e as PIs de MIN6, obtivemos resultados satisfatórios. Os ensaios utilizados para avaliar a secreção de insulina estimulada pela glicose são considerados como padrão e são utilizados em todo o mundo para avaliar a viabilidade das ilhotas, inclusive antes de transplantes (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.

Foi possível observar também, que as células coraram com o uso da ditizona. A ditizona é um corante avermelhado que se liga às moléculas de  $Zn^{2+}$  presentes nos grânulos de insulina. Dessa forma, é possível a visualização e diferenciação das células, que adquirem cor avermelhada (OMAIMA, 2013).

No entanto, é importante saber que essas células podem diferir de seus progenitores nos tecidos das quais são originárias, devido à seleção espontânea de clones que pode ocorrer ao longo das sucessivas passagens *in vivo* ou *in vitro* (ALBERTS, 2002).

Paralelo a isso, diversos efeitos protetores têm sido atribuído ao uso da FBP, um intermediário do metabolismo da glicose, em culturas celulares (BAJIC *et al*, 2011; BOCHI *et al*, 2012; DONG *et al*, 2014; HARDIN *et al*, 2001; SPASOJEVIC *et al*, 2009). Para a verificação de nossa hipótese, as células MIN6 (monocamada e pseudoilhotas) foram tratadas com diferentes concentrações de FBP. As concentrações de FBP utilizadas neste estudo (0,30 mM, 0,62 mM e 1,25 mM) foram as mesmas sugeridas por (NUNES,2003; GRUN,2012; MESQUITA *et al*, 2013; DIAS, 2014) em seus respectivos trabalhos.

Salienta-se que, embora a FBP seja permanentemente reportada em trabalhos científicos como um promissor agente terapêutico, pouco tem sido feito para elucidar seu mecanismo de ação e para justificar as atividades da FBP reportadas nas diferentes áreas de pesquisa.

Por exemplo, em um dos primeiros estudos realizados com a FBP, Galzigna e Rigobello em 1986 propuseram que a FBP agiria como uma “estabilizadora de membrana” capaz de interferir com a entrada de  $Ca^{2+}$ , enquanto Cattani, anos antes, sugeriu que a FBP favoreceria a captação de  $K^+$  em músculo cardíaco e liberação de  $H^+$  nos eritrócitos (CATTANI *et al*,1984; GALZIGNA; RIGOBELLO,1986). Desde então, tem sido descrito que a FBP ao interagir diretamente com a membrana celular, modifica a sua permeabilidade a íons e ocasiona um fluxo iônico direto que culminaria com diferentes efeitos celulares

(CATTANI *et al*, 1980; CHLOUVERAKIS, 1968; HASSINEN *et al*, 1991). Não obstante a essas propostas serem suficientes para endossar tais trabalhos, é pertinente questioná-las no sentido de sugerir que tais alterações na permeabilidade celular a íons como  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{K}^+$ , por exemplo, possa ocorrer via ativação mecanismos celulares já existentes, como via abertura de canais iônicos em decorrência da ativação direta ou indireta de receptores, ao invés de uma suposta interação estabilizadora pouco fundamentada da FBP com a membrana celular.

Por não haver relatos na literatura de que a FBP possa atuar diretamente sobre algum receptor próprio na superfície celular ou mesmo sobre receptores de alguma molécula sinalizadora, durante vários anos muitas publicações justificaram as atividades da FBP debatendo a capacidade de certos açúcares fosfatados serem capazes de atravessar a membrana celular (CATTANI *et al*, 1980; EDDY *et al*, 1981).

Ehringer e outros pesquisadores, no ano de 2000, demonstraram que apesar da presença de dois grupos fosfato em sua estrutura, a FBP possui capacidade de atravessar membranas celulares inclusive de maneira dose dependente, corroborando vários autores e finalizando uma polêmica de décadas atrás (EHRINGER, 2000; HARDIN; ROBERTS, 1994; LAZZARINO *et al*, 1984).

Dentre os estudos, foi demonstrado, também, que a FBP é capaz de aumentar a produção de ATP (ANTUNES *et al*, 2006), evidenciando sua capacidade de atingir o citosol em quantidade suficiente para interferir com a via glicolítica (ANTUNES *et al*, 2006; GREGORY *et al*, 1990; HASSINEN *et al*, 1991; LAZZARINO *et al*, 1984; NUUTINEN *et al*, 1991). Então, por não ser conhecido que a FBP possua um receptor próprio que seja capaz de ativar ou inibir receptores de membrana, é pertinente procurar dentre seus metabólitos algum a qual se possa atribuir tal atividade. Um estudo de Valério e colaboradores em 2009, mostrou que a FBP é capaz de aumentar a quantidade extracelular de adenosina supostamente como resultado do aumento da síntese dos nucleotídeos de adenina ou por

hidrólise enzimática de ATP (VALERIO, 2009). Não é recente na literatura que a adenosina participa de diversos processos fisiológicos mediados por diferentes receptores de membrana acoplados à adenilato ciclase via proteína G, sendo que esse metabólito desempenha fundamental atividade da integridade celular (MOURA, 2011).

Usando o método da Sulforrodamina B, pudemos observar um aumento na adesão celular em culturas tratadas com as diferentes concentrações de FBP. Após 2 horas, no grupo controle, a adesão foi estatisticamente menor que nos grupos tratados. Nas 24 e 72 horas do início do experimento, a proliferação nos grupos tratados com 0,62 e 1,25 mM de FBP foi significativamente menor que no grupo controle e no tratado com 0,30 mM de FBP.

A proliferação das células MIN6 em monocamada também foi avaliada por contagem das células em câmara de Neubauer. Observamos uma curva de crescimento padrão para linhagens celulares, apresentando uma fase de crescimento lenta até 48 h, exponencial de 48 h até 72 h, quando as culturas atingem a confluência. A partir de 96 h a proliferação decresce e o número de células começa a diminuir. A proliferação celular avaliada pela contagem de células e pelo ensaio da SRB apresentaram resultados semelhantes.

Também mostramos que o crescimento das PIs é tempo-dependente. Verifica-se que na primeira avaliação feita (após 7 dias) de cultura as PIs pequenas (até 50  $\mu\text{m}$ ), são predominantes. A presença de PIs médias (até 80  $\mu\text{m}$ ) e grandes (até 200  $\mu\text{m}$ ) aumenta a partir da segunda avaliação, aos 10 dias de cultura, mostrando a transformação de PIs pequenas em médias e de médias em grandes. No entanto, a formação de PIs grandes foi menor nas culturas tratadas com FBP.

Após a quarta avaliação, em 15 dias em cultura, as células entram em declínio no crescimento e morrem. A observação e avaliação do crescimento mostrou que esses agregados celulares, aumentam de tamanho não só por meio de divisões celulares, mas

também pela agregação de novas células que se movem em sua direção e pela união de agregados adjacentes como demonstrado na figura 2.

Há mais de 100 anos, em 1912, o pesquisador Carrel descrevia pela primeira vez uma cultura celular em 3 dimensões. A sua utilização como uma cultura de células tumorais crescidas em ambiente tridimensional foi mostrada nos trabalhos desenvolvidos por Moscona em 1957. Em ambiente 3D, as células não são igualmente expostas ao meio, tal fato faz com que haja a formação de microambientes que, no interior dos esferóides, podem levar a seleção de diferentes grupos celulares. (CARREL, 1912). Decréscimos regionalizados de tomada de oxigênio e nutrientes podem levar, neste contexto, a formação de áreas de necrose nestes esferóides, o que explica a morte celular (KIM, 2005).

Nos experimentos de avaliação do crescimento celular em monocamada, realizamos a análise do efeito da FBP sobre a viabilidade das pseudoilhas pela incorporação de iodeto de propídeo. A análise de viabilidade celular envolve a utilização de ferramentas que qualificam e/ou quantificam células “vivas”, ou seja, células metabolicamente ativas em uma cultura (ROGERO *et al*, 2000). Nossos resultados mostraram que nenhuma das doses de FBP utilizadas neste estudo exerceram efeitos citoprotetores, o que diferiu do mostrado pelo estudo de Grun em 2012 (GRUN, 2012), onde utilizou no estudo, ilhotas pancreáticas murinas e altas doses de FBP, sendo que em nossos experimentos, a dose mais alta de 1,25 mM foi citotóxica.

Izumi, em 2003, realizou um experimento adicionando FBP ao meio de cultura de hipocampo de ratos e concluiu que os efeitos neuroprotectores obtidos no estudo, foram mediados por outros mecanismos não envolvidos com uso da FBP (IZUMI *et al*, 2003). Também foi publicado por Oliveira e colaboradores, que a FBP não apresentou efeito na viabilidade, na contagem de ilhotas pancreáticas e na redução de radicais livres em seus experimentos utilizando ilhotas pancreáticas murinas (OLIVEIRA, 2009).

## **8 CONCLUSÃO**

Embora ainda sejam necessários mais estudos para aprofundar o conhecimento da atividade citoprotetora da FBP em outros modelos celulares e em ilhotas pancreáticas, nossos resultados mostram que em monocamadas e em PIs da linhagem MIN6 o tratamento com FBP não apresentou o efeito protetor esperado, sendo inclusive citotóxico nas doses mais elevadas.

## REFERÊNCIAS

ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, et al. **Isolating Cells and Growing Them in Culture. Available.** Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science; 2002.

ALVA, N.; CARBONELL, T.; ROIG, T.; BERMÚDEZ, J.; PALOMEQUE, J. Fructose 1,6 biphosphate administration to rats prevents metabolic acidosis and oxidative stress induced by deep hypothermia and rewarming. **Eur J Pharmacol**, n. 1, p. 259-264, 2011. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.03.034.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 35, p. S64–S71, 2012.

ANTUNES, N.; MARTINUSSO, C.A.; TAKIYA, C.M.; DA SILVA, A.J.; DE ORNELLAS, J.F.; ELIAS, P.R.; LEITE, M.J.R.; CARDOSO, L.R. Fructose-1,6 diphosphate as a protective agent for experimental ischemic acute renal failure. **Kidney Int.**, New York, v.69, n.1, p.68-72, 2006.

ARONOFF, S.L.; BERKOWITZ, K.; SHREINER, B.; WANT, L. Glucose metabolism and Regulation: Beyond Insulin and Glucagon. **Diabetes Spectrum**, v. 17, n. 3, p. 183-190, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS (ABTO). Registro brasileiro de transplantes. Ano XX, nº 4, 2014. Acesso em: <http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2014/rbt2014-lib.pdf>.

BABIOR, B. M.; PETERS, W. A. The O<sub>2</sub> producing enzyme of human neutrophils. Further properties. **J Biol Chem**, n. 256, p. 2321-2322, 1981.

BAJIC, A., et al. Relevance of the ability of fructose-1,6-bisphosphate to sequester ferrous but not ferric ions. **Carbohydr Res**, v. 346, p. 416-20, 2011.

BARBÉ-TUANA, F. M. Papel pró-inflamatório do receptor CD40 em ilhotas pancreáticas. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Nefrologia, 2006. Acesso em: <http://hdl.handle.net/10183/7312>.

BASERGA, R. Cell growth and division - a practical approach. **Philadelphia: I R L Press**, p.1-16, 1990.

BEITNER, R.; NORDENBERG, J. Inhibition of 6-phosphogluconate dehydrogenase (decarboxylating) by glucose 1,6-bisphosphate. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 583, n. 2, p. 266–269, 1979.

BELL, G. I.; KAYANO, T.; BUSE, J.B.; BURANT, C.F.; TAKEDA, J.; LIN, D.; FUKUMOTO, H.; SEINO, S. Molecular biology of mammalian glucose transporters. **Diabetes Care**, v. 13, n.3, p. 198-208,1990.



BOCHI, G.V.; TORBITZ, V. D.; CARGNIN, L. P.; SANGOI, M. B.; SANTOS, R.C.; GOMES, P.; MORESCO, R. N. Fructose-1,6-bisphosphate and N-acetylcysteine attenuate the formation of advanced oxidation protein products, a new class of inflammatory mediators, in vitro. **Inflammation**, n. 35, p. 1786-92, 2012.

BOUDJEMA, K.; LINDELL, S. L.; BELZER, F. O.; SOUTHARD, J. H. Effects of method of preservation on functions of livers from fed and fasted rabbits. **Cryobiology**, n. 28, p. 227–236, 1991.

BRASS, C. A.; CRAWFORD, J. M.; NARCISO, J. P.; GOLLAN, J. L. Evaluation of University of Wisconsin cold-storage solution in warm hypoxic perfusion of rat liver: the addition of fructose reduces injury. **Gastroenterology**, n. 105, p. 1455-63, 1993.

BRUNI, A; GALA-LOPEZ ,B; PEPPER, AR; ABUALHASSAN, N. S.; SHAPIRO A. J. Islet cell transplantation for the treatment of type 1 diabetes: recent advances and future challenges. **Diabetes Metab Syndrome Obes.** p. 211-223, 2014.

CALAFELL, R.; BOADA, J.; SANTIDRIAN, A. F.; GIL, J.; ROIG, T.; PERALES, J.C.; BERMUDEZ, J. Fructose 1,6 bisphosphate reduced TNF alpha induced apoptosis in galactosamine sensitized rat hepatocytes through activation of nitric oxide and cGMP production. **Eur J Pharmacol**, n. 610, p. 128 – 133, 2009.

CAMERON, A. M.; CORNEJO, J. F. B. Organ preservation review: history of organ preservation. **Current Opinion in Organ Transplantation**, n. 20, p. 146-151, 2015.

CARREL A. On the permanent life of tissues outside of the organism. **Journal of Experimental Medicine**, v. 15, p. 516-528, 1912.

CATTANI, L.; COSTRINI, R.; CERILLI, C. Fructose-1,6-diphosphate dependence on the toxicity and uptake of potassium ions. **Agressologie**. Paris, v.21, n.5, p.263, 1980.

CATTANI, L.; COSTRINI, R.; LAZZARINO, G.; DIANA, M.; GALZIGNA, L. Fructose-1,6-diphosphate counteracts potassium effects on cardiac muscle. **Pharmacol Res Commun.**, New York, v.16, n.8, p. 785–793, 1984.

CORRÊA-GIANNELLA, M. L; RAPOSO DO AMARAL, A. S. Pancreatic islet transplantation. **Diabetology and Metabolic Syndrome**. n.1, v.9, 2009.

CHLOUVERAKIS, C. The lipolytic action of fructose-1,6-diphosphate. **Metabolism.**, New York, v.17, n.8, p. 708-716, 1968.

CONTRERAS, J. L.; ECKSTEIN, C.; SMYTH, C. A.; SELLERS, M. T. Brain death significantly reduces isolated pancreatic islet yields and functionality in vitro and in vivo after transplantation in rats. **Diabetes**, n. 52, p. 2935 – 2942, 2003.

DAHL, U.; SJODIN, A.; SEMB, H. Cadherins regulate aggregation of pancreatic beta-cells in vivo. **Development**, n. 122, p. 2895–2902, 1996.

- DEMETERCO, C. Terapia Gênica para o Diabetes. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 45, n. 1, 2001.
- DE OLIVEIRA, C. S. A. Pancreatic islet isolation and the alternative use of fructose-1,6-bisphosphate. **Scientia Medica**, v. 19, n. 3, p. 129-134, 2009.
- DIABETES CARE. **Standards of Medical Care in diabetes**, v. 33, supplement 1, jan 2010.
- DIABETES CARE. **Diagnosis and classification of diabetes mellitus**, v. 35, supplement 1, jan 2012.
- DIABETES CARE. **Standards of Medical Care in diabetes**, v. 37, supplement 1, jan 2014.
- DIABETIC CONTROL AND COMPLICATION TRIAL. **The Effect of Intensive Treatment of Diabetes on the Development and Progression of Long-Term Complications in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus**, v. 329, n. 14, 1993.
- DIAS, Henrique Bregolin. **Avaliação da atividade da frutose-1,6-bisfosfato em células GRX expostas a ferro livre**. Dissertação de Mestrado, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2014. Acesso em: <http://hdl.handle.net/10923/6818>.
- DONG, Y., et al. Catalase ameliorates hepatic fibrosis by inhibition of hepatic stellate cells activation. **Front Biosci (Landmark Ed)**, n. 19, p. 535-41, 2014.
- EDDY, L.J.; CHAMBERS, D.; HONIG, S; DOWNEY, J.M. Lack of a direct metabolic effect of fructose-1,6-diphosphate in ischemic myocardium. **Am. J. Physiol.**, Washington, v.241, n.4, p.H576–H582, 1981.
- ELIASCHEWITZ, F., G. ; FRANCO, D.; R. Does brittle diabetes exist as a clinical entity? **Arq Bras Endocrinol Metabol**; v. 53, n. 4, p. 466-9, 2009.
- EHRINGER, W.D.; NIU, W.; CHIANG, B.; WANG, O.L.; GORDON, L.; CHIEN, S. Membrane permeability of fructose-1,6-diphosphate in lipid vesicles and endothelial cells. **Mol Cell Biochem.**, The Hague, v.210, n.1-2, p.35-45, 2000.
- EHRINGER, W.D.; CHIANG, B.; CHIEN, S. The uptake and metabolism of fructose-1,6-diphosphate in rat cardiomyocytes. **Mol Cell Biochem**, The Hague, v.221, n.1-2, p.33-40, 2001.
- ESPANOL, M.T.; LITT, L.; HASEGAWA, K.; CHANG, L.H.; MACDONALD, J.M.; GREGORY, G.; JAMES, T.L.; CHAN, P.H. Fructose-1,6-bisphosphate preserves adenosine triphosphate but not intracellular pH during hypoxia in respiring neonatal rat brain slices. **Anesthesiology.**, Philadelphia, v.88, n.2, p.461-472, 1998.
- 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**. n. 26, Suppl 1:S5-20, jan 2003.

FIDELIS-DE-OLIVEIRA, P.; CARVALHO, A. C., et al. Soluble factors from multipotent mesenchymal stromal cells have antinecrotic effect on cardiomyocytes in vitro and improve cardiac function in infarcted rat hearts. **Cell Transplantation**, v. 21, p. 1011-1021, 2012.

FRODIN, M.; SEKINE, N.; ROCHE, E.; FILLOUX, C.; PRENTKI, M.; WOLLHEIM, C.B. Glucose, other secretagogues, and nerve growth factor stimulate mitogenactivated protein kinase in the insulin-secreting beta-cell line, INS-1. **J. Biol. Chem.** n. 270, p. 7882–7889, 1995.

GABA, R. C.; GARCIA-ROCA, R; OBERHOLZER, J. Pancreatic islet cell transplantation: an update for interventional radiologists. **Journal of Vascular and Interventional Radiology**, v. 23, n. 5, p. 583–594, 2012.

GALZIGNA, L.; RIGOBELLO, M. Proton and potassium fluxes in rat red blood cells incubated with sugar phosphates. **Experientia Basel**, v.42, n.2, p. 138–139, 1986.

GOBBEL, G. T.; CHAN, T.Y.; GREGORY, G. A.; CHAN, P. H. Response of cerebral endothelial cells to hypoxia: modification by fructose-1,6- bisphosphate but not glutamate receptor antagonists. **Brain Res**, n. 653, p. 23-30, 1994.

GREGORY, G.A.; WELSH, F.A.; YU, A.C.; CHAN, P.H. Fructose-1,6-bisphosphate reduces ATP loss from hypoxic astrocytes. **Brain Res.**, Amsterdam, v.516, n.2, p.310-312, 1990.

GRUN, L. K. **Uso da frutose-1,6-bisfosfato em ilhotas pancreáticas mantidas em cultura celular**. Trabalho de conclusão. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Biotecnologia. Porto Alegre, 2012. Acesso em: <http://hdl.handle.net/10183/72347>.

GUIBERT, E.E.; PETRENKO, A.Y.; BALABAN, C. L.; SOMOV, A.Y.; RODRIGUEZ, J.V.; FULLER, B. J. Organ Preservation: Current Concepts and New Strategies for the Next Decade. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, n. 38, p. 125-142, 2011.

GUYTON, A.; HALL, J. Tratado de Fisiologia Médica, 11ª ed. **Elsevier**, 2006.

GYLFE, E.; HELLMAN, B. Glucose-stimulated sequestration of Ca<sup>2+</sup> in clonal insulin-releasing cells. Evidence for an opposing effect of muscarinic-receptor activation. **Biochem J.** n. 233, p. 865–870, 1986.

HANLEY S., et al. **Transplantation**, n. 27, p. 813-8, 2006.

HARDIN, C.D.; ROBERTS, T.M. Metabolism of exogenously applied fructose-1,6-bisphosphate in hypoxic vascular smooth muscle. **Am J Physiol.**, Washington, v.267, n.6 Pt2, p.H2325–H2332, 1994.

HARDIN, C.D.; LAZZARINO, G.; TAVAZZI, B.; DI PIERRO, D.; ROBERTS, T.M.; GIARDINA, B.; ROVETTO, M.J. Myocardial metabolism of exogenous FDP is consistent with transport by a dicarboxylate transporter. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, Bethesda, v.281, n.6, p.H2654-H2660, 2001.

HASSINEN, I.E.; NUUTINEN, E.M.; ITO, K.; NIOKA, S.; LAZZARINO, G.; GIARDINA, B.; CHANCE, B. Mechanism of the effect of exogenous fructose 1,6-bisphosphate on myocardial energy metabolism. **Circulation**, Dallas, v.83, n.2, p.584-593, 1991.

HAUGE-EVANS, A.C., et al. Pancreatic beta-cell-to-beta-cell interactions are required for integrated responses to nutrient stimuli: enhanced Ca<sup>2+</sup> and insulin secretory responses of MIN6 pseudoislets. **Diabetes**, n. 48, p. 1402–1408, 1999.

HILL, R.S.; OBERWETTER, J.M.; BOYD, A. E. Increase in cAMP levels in beta-cell line potentiates insulin secretion without altering cytosolic free-calcium concentration. **Diabetes**, n. 36, p. 440–446, 1987.

HIROKAWA, F.; NAKAI, T.; YAMAUE, H. Storage solution containing fructose-1,6-bisphosphate inhibits the excess activation of Kupffer cells in cold liver preservation. **Transplantation**, n. 74, p. 779-83, 2002.

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.

HOUGHTON, P.; FANG, R.; TECHATANAWAT, I.; STEVENTON, G.; HYLANDS, P. J.; LEE, C.C. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. **Methods**, v. 42, p. 377-387, 2007.

ICHIM, T., E.; ALEXANDRESCU, D.T.; SOLANO, F.; LARA, F. Mesenchymal stem cells as anti-inflammatories: implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. **Cell Immunol**, v. 260, p. 75–82, 2010.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2014. <http://www.idf.org/media-events/pressreleases/2011/diabetes-atlas-5-edição>. Acesso em: 11 de março de 2015.

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.

IZUMI, Y; BENZ, A. M.; KATSUKI, H.; MATSUKAWA, M.; CLIFFORD, D. B.; ZORUMSKI, C. F. Effects of fructose-1,6-bisphosphate on morphological and functional neuronal integrity in rat hippocampal slices during energy deprivation. **Neuroscience**, v. 116, n. 2, p. 465–475, 2003.

JONES, P. M.; MANN, F. M. Russell's viper venom stimulates insulin secretion from rat islets of Langerhans. **J Endocrinology**, v. 136, p. 27-33, 1993.

KARAOZ, E.; GENÇ, Z. S.; DEMIRCAN, P.; AKSOY, A.; DURUKSU, G. Protection of rat pancreatic islet function and viability by coculture with rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Nature**, n. 36, 2010.

KELLY, C., et al. Comparison of insulin release from MIN6 pseudoislets and pancreatic islets of Langerhans reveals importance of homotypic cell interactions. **Pancreas**, n 39, p. 1016-23, 2010.

KLEMPNAUER, J.; SCHREM H.; BECKER, T. Liver transplantation today. **Transplant Proc**, n. 33, p. 3433-3435, 2002.

KIM, J. B. Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. **Seminars in Cancer Biology**, v. 15, n. 5, p. 365-377, 2005.

KIRTLEY, M. E.; MCKAY, M. Fructose-1,6-bisphosphate, a regulator of metabolism. **Mol Cell Biochem**, n. 18, p.141-149, 1977.

LAZZARINO, G.; CATTANI, L.; COSTRINI, R.; MULIERI, L.; CANDIANI, A.; GALZIGNA, L. Increase of intraerythrocytic fructose-1,6-diphosphate after incubation of whole human blood with fructose-1,6-diphosphate. **Clin. Biochem.**, Toronto, v.17, n.1, p.42-45, 1984.

LEITÃO, C. B; THARAANIS, T; CUER, P; PILEGGI, A; BAIDOL, D. A; RICORDI, C. Restoration of hypoglycemia awareness after islet transplantation. **Diabetes Care**, v. 31, p. 2113-5, 2008.

LIU, J.; LITT, L.; SEGAL, M.R.; KELLY, M.,J.,S.; PELTON, J.,G.; KIM, M. Metabolomics of Oxidative Stress in Recent Studies of Endogenous and Exogenously Administered Intermediate Metabolites. **International Journal of Molecular Sciences**, v.12, n.10, p. 6469-6501, 2011.

LIU, B.; SONG, S.; BAKER, D. GPR55 deletion is coupled to impaired glucose tolerance and increased islet cell apoptosis. **Diabetologia**, vol. 56, p. S46-S46, 2013.

LUCHINI, L.; WICKI, G.; ROMANO, L. A. The Ultrastructure of Secretory Cells of the Islets of Langerhans in South American Catfish *Rhamdia quelen*. **Journal of Histology**, 6 pages, 2015.

MATVEYENKO, A., VELLA, A. Regenerative Medicine in Diabetes. **Mayo Clinic Proceedings**, v, 90, n. 4, p. 546–554, 2015.

MCCLLENAGHAN, N. H; FLATT, P. R. Engineering cultured insulin-secreting pancreatic *B-cell* lines. **J Mol Med**, n. 77, p. 235-243, 1999.

MELLADO-GIL, J. M.; COBO-VUILLEUMIER, N.; GAUTHIER, B. R. Islet  $\beta$ -Cell Mass Preservation and Regeneration in Diabetes Mellitus: Four Factors with Potential Therapeutic Interest. Review Article. **Journal of Transplantation**, article ID 230870, 2012.

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

MESQUITA, F. C. ; BITENCOURT, S. ; CABERLON, E. , SILVA, G. V. ; BASSO, B.S. ; SCHMID, J. ; FERREIRA, G.A. ; DE OLIVEIRA, F., S. ; DE OLIVEIRA, J., R. Fructose-

1,6-bisphosphate induces phenotypic reversion of activated hepatic stellate cell. **Eur J Pharmacol.** p. 320-5, 2013.

MOLINARO, E. M. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios. Cultivo celular. FIOCRUZ, v.2, cap. 5, 2010.

MORESCO, R. N. et al. Protective effect of fructose-1,6-bisphosphate in the cold storage solution for liver preservation in rat hepatic transplantation. **Transplant Proc**, v. 36, n. 5, p. 1261-4, 2004.

MOSCONA A. The development in vitro of chimeric aggregates of dissociated embryonic chick and mouse cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n. 43, p. 184-94, 1957.

MOURA, P.; VIDAL, F. Receptores Acoplados à Proteína G. **Scientia Medica**, v. 21, n.31, 2011.

NUNES, F.B., GASPARETO, P.B., SANTOS, R.C.V., ASSIS, M., GRAZIOTTIN, C.M., BIOLCHI, V., ALVES FILHO, J.C.F., LUNARDELLI, A., ÁVILA, L.D., PIRES, M.G.S., WACHTER, P.H., OLIVEIRA, J.R., Intravenous toxicity of fructose-1,6-bisphosphate in rats. **Toxicology Letters**, vol. 143, n. 1, p. 73 – 81, 2003.

NUUTINEN, E.M.; LAZZARINO, G.; GIARDINA, B.; HASSINEN, I.E. Effect of exogenous fructose-1,6-bisphosphate on glycolysis in the isolated perfused rat heart. **Am. Heart. J.**, St. Louis, v.122, n.2, p.523-527, 1991.

OLIVEIRA, C. S. A. et al. Pancreatic islet isolation and the alternative use of fructose-1,6-bisphosphate. **Scientia Medica**, Porto Alegre, v. 19, n. 3, p. 129-134, jul./set. 2008.

OLOKOBA A. B; OBATERU O. A; OLOKOBA L. B. Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends. **Oman Med J.** n. 4, p. 269-73, 2012.

OMAIMA, M.; Silvia, F.; Daniel, W; Fraga, J.; Sih, E. V. Characterization of a nanogland for the autotransplantation of human pancreatic islets, **Lab Chip**, n. 13, p. 367, 2013.

OSTERBYE, T.; et al. **A subset of human pancreatic beta cells express functional CD14 receptors: a signaling pathway for beta cell-related glycolipids, sulfatide and  $\beta$ -galactosylceramide.** *Diabetes Metab Res Rev.* n. 26, p. 656-67, 2010.

PERCEGONA, L. S.; AITA, C. A. M.; PEREIRA, E.; SOTTA, E. D.; SILVA, I.C.; RIELLA, M. C. Protocolo Clínico para seleção de candidatos ao transplante de ilhotas. **Arq. Bras. Endocrinol.Metab.** n. 52, v. 3, p. 506-514, 2008.

PILEGGI, A.; FENJVES, E.; KLEIN, D.; RICORDI, C.; PASTORI, R. Protecting Pancreatic  $\beta$ -cells. **IUBMB Life**, n. 56, p. 387–394, 2004.

POITOUT, V; OLSON, L. K; ROBERTSON, R. P. Insulin-secreting cell lines: Classification, characteristics and potential applications. **Diabetes and Metabolism**, n. 22, p. 7-14, 1996.

- RHEINHEIMER, J.; et al. Human Pancreatic Islet Transplantation: literature review and establishment of a pancreatic islet isolation laboratory. **Rev HCPA**, v. 30, p. 407-418, 2010.
- RIBOLDI, B. P. Carga Alimentar em indivíduos com diabetes. Tese Mestrado em Epidemiologia – Faculdade de Medicina. **Universidade do Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 117 p, 2014.
- ROBERTSON, R. P.; HARMON, J. S. Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. **Diabetes**, n. 52, p. 581-7, 2003.
- RODERIGO-MILNE, H.; HAUGE-EVANS, A. C.; PERSAUD, S. J.; JONES, P. M. Differential expression of insulin genes 1 and 2 in MIN6 cells and pseudoislets. **Biochem Biophys Res Commun**, n. 296, p. 589-595, 2002.
- ROGERO, S.O.; HIGA, O.Z.; SAIKI, M.; CORREA, O.V.; COSTA, I. **Toxicology in Vitro**, v. 14, n. 6, p. 497-504, 2000.
- ROIG, T.; BARTRONS, R.; BERMÚDEZ, J. Exogenous fructose 1,6- biphosphate reduces K<sup>+</sup> permeability in isolated rat hepatocytes. **Am J Physiol.**, Washington, v.273, n.2 Pt 1, p.C473-478, 1997.
- ROUILLER, D. G.; CIRULLI, V.; HALBAN, P., A. Uvomorulin mediates calcium-dependent aggregation of islet cells, whereas calcium-independent cell adhesion molecules distinguish between islet cell types. **Developmental Biology**, n.148, p. 233–242, 1991.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Tratamento e acompanhamento do Diabetes Mellitus**: diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, Rio de Janeiro: SBD, 2007.
- SCHARFMANN. Alternative sources of beta cells for cell therapy of diabetes. **Eur J Clin Invest**, n. 33, p. 595-600, 2003.
- SHAPIRO AM. Strategies toward single-donor islets of Langerhans transplantation. **Current Opin Organ Transplant**, v. 16, p. 627–631, 2011.
- SKELIN, M; RUPNIK, M; CENCIC, A. Pancreatic beta cell lines and their applications in diabetes mellitus research. **Altex**, n. 27, p. 105–13, 2010.
- SOLA, A; PANÉS, J.; XAUS, C.; HOTTER, G. Fructose-1,6-biphosphate and nucleoside pool modifications prevent neutrophil accumulation in the reperfused intestine. **J Leukoc Biol**, v. 73, p. 74-81, 2003.
- SOUTHARD, J. H.; GULIK, T. M.; AMETANI, M. S.; VREUGDENHIL, P. K.; LINDELL, S. L.; PIENAAR, B. L.; BELZER, F. O. Important components of the UW solution. **Transplantation**, n. 49, p. 251–257, 1990.
- SORIA, B.; BERNA, G. Engineering pancreatic islets. **Pflugers Arch**, n. 440, p. 1-18, 2000.
- SPASOJEVIC, I., et al. Relevance of the capacity of phosphorylated fructose to scavenge the hydroxyl radical, **Carbohydr Res**, n. 344 , p. 80-4, 2009.

STANLEY, W., C.; CONNETT, R., J. Regulation of muscle carbohydrate metabolism during exercise. **Faseb J**, v. 5, p. 2155– 2159, 1991.

VALÉRIO, D.; FERREIRA, F.; CUNHA, T. Fructose-1,6-bisphosphate reduces inflammatory pain-like behaviour in mice: role of adenosine acting on A<sub>1</sub> receptors. **British Journal of Pharmacology**, n. 158, p. 558-568, 2009.

VOIGT, M. R.; DELARIO, G. T. Perspectives on abdominal organ preservation solutions: a comparative literature review. **Prog Transplant.**, n. 23, p. 383-391, 2013.

WACHLIN, G. et al. IL-1beta, IFN-gamma and TNF-alpha increase vulnerability of pancreatic beta cells to autoimmune destruction. **Journal of Autoimmunity**, n. 20, p. 303-312, 2003.

WATSON, C. J. E.; DARK, J. H. Organ transplantation: historical perspective and current practice. **Br. J. Anaesth**, n. 108, 2012.

WOLLHEIM, C. B.; MEDA, P.; HALBAN, P. A. Establishment and culture of insulin-secreting beta cell lines. **Methods Enzymol**, n.192, p. 223-235, 1990.

YACH, D; STUCKLER, D; BROWNELL, K. D; Epidemiologic and economic consequences of the global epidemics of obesity and diabetes. **Nat Med**, v. 12, p. 62-66, 2006.

YAMAGATA, K.; NAMMO, T.; MORIWAKI, M. Overexpression of dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor-1 alpha in pancreatic beta-cells causes abnormal islet architecture with decreased expression of E-cadherin, reduced beta-cell proliferation, and diabetes. **Diabetes**, n. 51,p. 114–123, 2002.

YAMAKI, V. N.; TEIXEIRA, R. N. C.; BRITO, M. V. H. Uso de soluções hipertônicas para preservação hepática em ratos. **ABCD, arq. bras. cir. dig.**, São Paulo , v. 26, n. 1, p. 44-48, 2013.



## **ANEXOS**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Secreção de insulina basal estimulada por glicose, determinada pelo método de ELISA .....	30
<b>Tabela 2:</b> Análise estatística da proliferação celular avaliada pelo método da Sulforrodamina B.....	33

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Adaptação do diagrama esquemático da molécula de frutose-1,6-bisfosfato. .	14
<b>Figura 2:</b> Cultura de células MIN6 .....	28
<b>Figura 3:</b> Expressão do gênica da insulina .....	29
<b>Figura 4:</b> Expressão da proteína insulina em pseudoilhotas (PIs). .....	29
<b>Figura 5:</b> Pseudoilhota corada com ditizona .....	30
<b>Figura 6:</b> Curva de proliferação de células MIN6 tratadas com diferentes doses de frutose-1,6-bisfosfato (FBP).....	31
<b>Figura 7:</b> Efeito da FBP sobre a adesão e proliferação de células MIN6 .....	32
<b>Figura 8:</b> Avaliação do efeito da FBP sobre a formação e crescimento das PIs em culturas de células MIN6 ao longo do tempo .....	34
<b>Figura 9:</b> Análise da viabilidade das pseudoilhotas por citometria de fluxo .....	35