

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS
Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde
Área de Concentração em Nefrologia
Dissertação de Mestrado

**USO DA FRUTOSE-1,6-BISFOSFATO COMO ALTERNATIVA
PARA O ISOLAMENTO DE ILHOTAS PANCREÁTICAS**

Carmen Silvana Araujo de Oliveira

Porto Alegre
2008

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: NEFROLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

USO DA FRUTOSE-1,6-BISFOSFATO COMO ALTERNATIVA PARA O
ISOLAMENTO DE ILHOTAS PANCREÁTICAS

CARMEN SILVANA ARAUJO DE OLIVEIRA

Porto Alegre, RS, Brasil
Dezembro de 2008

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: NEFROLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

USO DA FRUTOSE-1,6-BISFOSFATO COMO ALTERNATIVA PARA O
ISOLAMENTO DE ILHOTAS PANCREÁTICAS

CARMEN SILVANA ARAUJO DE OLIVEIRA

Dissertação de Mestrado sob orientação:
Prof. Dr. David Saitovitch (Orientador)
Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira (Co-orientador)

Porto Alegre, RS, Brasil
Dezembro de 2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

O48u Oliveira, Carmen Silvana Araujo de

Uso da frutose-1,6-bisfosfato como alternativa para o isolamento de ilhotas pancreáticas / Carmen Silvana Araújo de Oliveira. – Porto Alegre, 2008.

87 f. il.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Mestrado em Medicina Ciências da Saúde. Área de Concentração: Nefrologia.

Orientador: Prof. Dr. David Saitovitch.

1. Diabetes Mellitus Tipo 1. 2. Transplantes de Ilhotas Pancreáticas.
3. Isolamento de Ilhotas Pancreáticas.
4. Frutose-1,6-bisfosfato. I. Saitovitch, David. II. Título.

CDD 617.557

**Ficha Catalográfica elaborada por
Nívea Bezerra Vasconcelos e Silva CRB 10/1255**

*“Se pude ver mais longe foi porque
estive apoiado em ombros de gigantes”*

Isaac Newton

Dedicatória

Aos meus avós e anjos da guarda;

*Anáusia e Manoel Araujo
Celina e Romagueira de Oliveira*

Exemplos de vida! Levo os ensinamentos de vida que apreendi com vocês para sempre. Estejam sempre comigo, minhas fontes de luz.

Aos meus pais

Carmen Lia e José Antônio

Meu porto-seguro, minha força. Obrigada, pelo apoio em todas minhas difíceis decisões, por partilharem meus momentos de alegria e dificuldade, por entenderem minha ausência e por me doarem amor incondicional. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo que me proporcionou!

Ao Prof. Dr. David Saitovitch, pela confiança em me orientar, pela paciência, por ter compreendido minhas dificuldades, por tudo que me ensinou e principalmente pelas palavras de que tudo iria dar certo!

Ao Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira, meu co-orientador, orientador de iniciação científica e meu paraninfo de turma. Agradeço por, através de sua dedicação como pesquisador, ter me apresentado o maravilhoso mundo da ciência.

À Doutoranda e amiga Patrícia Sesterheim (Patty), por tudo! Pela ajuda incondicional, pela atenção e pela paciência. Uma profissional e pesquisadora brilhante! Um presente que o mestrado proporcionou ao te conhecer e poder te ter como amiga.

À minha colega de laboratório e amiga Tássia Marquezan, pelos momentos compartilhados, pela ajuda e pelo apoio em todas as etapas desse trabalho. Outra grande amizade que o mestrado me proporcionou.

Às colegas de laboratório Daniele, Denise, Fernanda, muito obrigada pela ajuda.

À Profa. Dra. Bartira E. Pinheiro da Costa pelas conversas científicas pela ajuda no laboratório e pelo aprendizado.

Aos meus colegas da pós-graduação, que compartilharam conhecimentos, informações, angústias e ajudas, seja durante as aulas ou até mesmo em nossos momentos do café.

Ao Serviço de Nefrologia e ao Prof. Dr. Domingos D'ávila, pela ajuda no subsídio desse trabalho, para que esse projeto não parasse.

À minha pequena e grande família, por ser dessa forma, tão especial.

À minha amiga Elen Fagherazzi, pela pronta ajuda nesse momento final da dissertação. Pela nossa longa amizade, desde o início da faculdade.

Ao meu amigo Gabriel P. Martins, pela força nos momentos difíceis, por me sempre ter uma palavra de coragem e otimismo.

Ao Cristian Viezzer, pela sempre pronta ajuda e empréstimos de materiais.

Aos queridos Professores da Nefrologia, Dr. Domingos D'ávila, Dr. Ivan Antonello, Dr. David Saitovitch, Dr. Carlos Poli de Figueiredo e Dra. Bartira Costa. Pelos valiosos ensinamentos científicos.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Biofísica da Inflamação Robson e Luís pela ajuda na execução desse projeto.

Ao amigo Eduardo Caberlon (Edu), pelas nossa “conversas celulares” e por ter me aberto as portas quando fiz iniciação científica. Para sempre lembrarei nossa primeira conversa.

À secretaria do Programa de Pós-graduação: Ernesto e Vanessa, por sempre prontamente sanarem nossas dúvidas de forma cordial.

À CAPES, por permitir, através da bolsa de mestrado, que eu pudesse realizar esse sonho .

Aos meus anjos da guarda!

Muito obrigada!

SUMÁRIO

Dedicatória	4
Agradecimentos	5
Lista de Abreviaturas	11
Lista de Figuras	13
Lista de Tabelas	14
Resumo	15
Abstract	16
Considerações sobre a Dissertação	17
Artigo de Revisão	19
Objetivos	37
Artigo Original	38
Conclusão	53
Anexo 1	55

Carta de aprovação da Comissão Científica

Anexo 256

Carta de aprovação do Comitê de Ética para Uso de Animais

Anexo 357

Certificado de apresentação em Amostra da Pós-Graduação

Anexo 458

Considerações sobre a metodologia

Anexo 564

Resultados adicionais

Anexo 668

Artigo original (versão português)

LISTA DE ABREVIATURAS E SINAIS

ATP – Adenosina trifosfato

°C – Graus centígrados

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CEUA – Comitê de Ética para o Uso de Animais

DM1 – Diabetes Mellitus tipo 1

FBP – Frutose-1,6-Bisfosfato

HBSS – Hank's balanced salt solution

IL – Interleucinas

INF- α – Interferon alfa

INF- γ – Interferon gama

MCP-1 – Proteína quimioatrativa de monócitos

MDA - Malondialdeído

mL – Mililitro

mM - Milimolar

NF- $\kappa\beta$ – Fator de ativação nuclear Kappa β

NO – Óxido nítrico

PUCRS – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

ROS – Espécies reativas de Oxigênio

RPM – Rotação por minuto

TCA – Ácido tricloro acético

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

μ L – Microlitro

% - Por cento

LISTA DE FIGURAS

Artigo Original:

Figura 1: Gráfico da contagem de ilhotas pancreáticas nos diferentes grupos.

Figura 2: Gráfico da viabilidade celular (em porcentagem) nos diferentes grupos.

Figura 3: Gráfico da média de redução de radicais livres quando comparado os valores mensurados após a etapa de digestão e final do processo de isolamento das ilhotas pancreáticas

Anexo 5 – Resultados adicionais:

Figura 1: Gráfico da mensuração de radicais livres no sobrenadante coletado após etapa de digestão pancreática

Figura 2: Gráfico da mensuração de radicais livres no sobrenadante coletado após o final do processo de isolamento das ilhotas pancreáticas

LISTA DE TABELAS

Anexo 5 – Resultados adicionais

Tabela 1 - Contagem de ilhotas pancreáticas coradas com ditizona

Tabela 2 - Viabilidade de ilhotas pancreáticas (%) nos grupos experimentais

Tabela 3 - Mensuração dos radicais livres (nmol/g de proteína) em sobrenadante coletado após etapa de digestão pancreática.

Tabela 4 - Mensuração dos radicais livres (nmol/g de proteína) em sobrenadante após o final do processo de isolamento das ilhotas pancreáticas.

RESUMO

O transplante de ilhotas surge como uma alternativa para o tratamento do diabetes mellitus tipo 1. Entretanto, durante o processo de isolamento, há grande perda celular, principalmente na periferia da ilhota pancreática. As espécies reativas de oxigênio (ROS) contribuem significativamente neste processo afetando a viabilidade destas células para transplante. Vários esforços estão sendo feitos na tentativa de minimizar os danos causados pela liberação e produção de ROS. Apresentando importante papel de citoproteção e redução da formação e liberação de radicais livres, a frutose-1,6-bisfosfato é um regulador metabólico que estimula as reações catabólicas da glicólise, contribuindo para melhora da preservação do tecido frente à isquemia em órgãos como coração, fígado e rins. Diante destas características, a frutose-1,6-bisfosfato pode apresentar uma possibilidade de uso no isolamento de ilhotas na tentativa de promover proteção celular. Foi realizado um estudo utilizando FBP durante o isolamento de ilhotas pancreáticas de camundongos, analisando a contagem e a viabilidade celular, assim como a mensuração de radicais livres. Nesse trabalho não foi encontrado efeito nas diferentes concentrações de FBP versus controle, tanto na contagem de ilhotas pancreáticas quanto nas suas viabilidades. Na mensuração dos radicais livres também não foi observado a ação citoprotetora nas doses de FBP estudadas.

Palavras chaves: Diabetes mellitus tipo 1, frutose-1,6-bisfosfato, transplantes de ilhotas pancreáticas.

ABSTRACT

The islets transplantation is an alternative for the treatment of type 1 diabetes mellitus. However, during the process of isolation, there are large cell loss, mainly on the periphery of the pancreatic islet. The reactive oxygen species (ROS) contribute significantly in this process affecting the viability of these cells for transplant. Various efforts are being made in an attempt to minimize the damage caused by the release and production of ROS. Presenting important role in cytoprotection and reducing training and free radicals, the fructose-1,6-bisphosphate is a metabolic regulator that stimulates the catabolic reactions of glycolysis, contributing to improved preservation of the tissue in front of organs such as heart ischemia, liver and kidneys. Facing these characteristics, the fructose-1,6-bisphosphate may present an opportunity to use the isolation of islets in an attempt to promote cellular protection. A study using FBP during the isolation of pancreatic islets in mice, analyzing the counting and cell viability, as well as the measurement of free radicals. In this study found no effect at different concentrations of FBP versus control, both in the counting of pancreatic islets as in its viability. In the measurement of free radicals neither the action cytoprotector was observed at doses of FBP studied.

Key words: Type 1 diabetes, fructose-1,6-bisphosphate, transplants of pancreatic islets.

1. CONSIDERAÇÕES SOBRE A DISSERTAÇÃO

O Programa de Pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde – FAMED/PUCRS não exige um formato específico para a apresentação de dissertação. Assim, as recomendações de Spector foram empregadas e as referências bibliográficas seguiram as normas do estilo Vancouver, sendo que as citações indicadas no texto seguiram o sistema de citações em seqüência. A logística de apresentação dessa dissertação segue a ordem dos seguintes itens: Artigo de revisão, objetivos, artigo original, considerações sobre a dissertação, conclusão, bibliográfica consultada e anexos.

Este trabalho surgiu da integração entre os laboratórios de Nefrologia do Instituto de Pesquisas Biomédica e o Laboratório de Pesquisa em Biofísica Celular e Inflamação, integrando as linhas de pesquisas com transplante de ilhotas pancreáticas e frutose-1,6-bisfosfato, respectivamente. Essa parceria entre os laboratórios proporcionou o surgimento de uma linha de pesquisa que objetiva avaliar a ação da frutose como uma possível solução citoprotetora em transplante celular.

Todo o projeto foi realizado no Laboratório de Nefrologia (IPB). A FBP foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Laboratório de Pesquisa em Biofísica Celular e Inflamação, sob chefia do Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira.

Durante a execução desse projeto, o grupo de pesquisa estabeleceu um novo protocolo para o isolamento de ilhotas, o qual está detalhadamente descrito nas considerações sobre metodologia (anexo 4). O protocolo anteriormente utilizado era baseado em um isolamento com diferentes densidades de ficoll. Tal protocolo era mais oneroso e trabalhoso, pois cada reagente devia ser preparado e sua densidade cuidadosamente ajustada e conferida. Com o novo protocolo, obteve-se uma melhora do processo, otimizando tempo e verba empregada.

A mestranda apresentou seu projeto de pesquisa na II Mostra de Pesquisa da Pós-Graduação da PUCRS, na forma de pôster, em 26 de outubro de 2007.

Foram realizados e nessa dissertação apresentado dois artigos. O primeiro trata-se de um artigo de revisão sobre intitulado "ISOLAMENTO DE ILHOTAS PANCREÁTICAS E ALTERNATIVA DE USO DA FRUTOSE-1,6-BISFOSFATO", onde aborda uma possibilidade de uso da FBP em isolamento de ilhotas. Esse artigo foi submetido à revista *Scientia Medica*. O segundo é o artigo original intitulado "FRUCTOSE-1,6-BISPHOSPHATE AS AN ALTERNATIVE IN ISLET PANCREATIC ISOLATION", apresentando os resultados obtidos nessa dissertação e foi submetido à revista *Nephrology Dialysis Transplantation*.

2. Artigo de Revisão

[Sc Med] Agradecimento pela Submissão

De: **Prof^a. Eleonor Gastal Lago** (scientiamedica@puccrs.br)
Enviada: sábado, 20 de dezembro de 2008 16:37:00
Para: Carmen Silvana Araujo Oliveira (sil_aryl@hotmail.com)

Carmen Silvana Araujo Oliveira,

Agradecemos a submissão do seu manuscrito "Isolamento de Ilhotas Pancreáticas e a Alternativa de Uso da Frutose-1,6-Bisfosfato" para Scientia Medica. Através da interface de administração do sistema, utilizado para a submissão, será possível acompanhar o progresso do documento dentro do processo editorial, bastando logar no sistema localizado em:

URL do Manuscrito:

<http://revistaseletronicas.puccrs.br/scientiamedica/ojs/index.php/scientiamedica/author/submission/4659>

Login: sil_aryl

Em caso de dúvidas, envie suas questões para este email. Agradecemos mais uma vez considerar nossa revista como meio de transmitir ao público seu trabalho.

Prof^a. Eleonor Gastal Lago
Scientia Medica

Scientia Medica
Fone: (51) 3320-3304
E-mail: scientiamedica@puccrs.br

Isolamento de Ilhotas Pancreáticas e a Alternativa de Uso da Frutose-1,6-Bisfosfato
Pancreatic Islet Isolation and the alternative of Use Fructose-1,6-Bisphosphate

Carmen Silvana Araujo de Oliveira* , Patrícia Sesterheim* , Jarbas Rodrigues de Oliveira** ,
David Saitovitch*

* Laboratório de Nefrologia, Instituto de Pesquisas Biomédicas, PUCRS

** Laboratório de Pesquisa em Biofísica Celular e Inflamação, Faculdade de Biociências,
PUCRS

Endereço para correspondência:

Carmen Silvana Araujo de Oliveira

Laboratório de Nefrologia, Instituto de Pesquisas Biomédicas

Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Av. Ipiranga, 6690, 2º andar. Porto Alegre, RS, Brasil. CEP: 90610-000

Tel: (51) 3320-3500 – R: 3340

E-mail: sil_arol@hotmail.com

Resumo

Objetivos: Revisar dados da literatura sobre isolamento de ilhotas pancreáticas para transplante e sobre frutose-1,6-bisfosfato.

Fontes de dados: Revisão de artigos especializados nos assuntos publicados em bancos de dados nacionais e internacionais (SCIELO, LILACS, PUBMED).

Síntese dos dados: O transplante de ilhotas surge como uma alternativa para o tratamento do diabetes mellitus tipo 1. Entretanto, durante o processo de isolamento, há grande perda celular, principalmente na periferia da ilhota pancreática. As espécies reativas de oxigênio (ROS) contribuem significativamente neste processo afetando a viabilidade destas células para transplante. Vários esforços estão sendo feitos na tentativa de minimizar os danos causados pela liberação e produção de ROS. Apresentando importante papel de citoproteção e redução da formação e liberação de radicais livres, a frutose-1,6-bisfosfato é um regulador metabólico que estimula as reações catabólicas da glicólise, contribuindo para melhora da preservação do tecido frente à isquemia em órgãos como coração, fígado e rins. Diante destas características, a frutose-1,6-bisfosfato pode representar uma alternativa de uso no isolamento de ilhotas na tentativa de promover proteção celular.

Descritores: Diabetes mellitus tipo 1, frutose-1,6-bisfosfato, transplantes de ilhotas pancreáticas.

Abstract

Aims: To review the literature data about pancreatic islet isolation and fructose-1,6-bisphosphato.

Source of data: Review of specific articles on the issue published in national and internacional databases (SCIELO, LILACS, PUBMED).

Summary of the findings: Islets transplantation is an alternative for the treatment of type 1 diabetes mellitus. However, during the process of isolation, cell loss, mainly on the periphery of the pancreatic islet, ensues. Reactive oxygen species (ROS) seem to contribute significantly in this process, affecting the viability of these cells . Various efforts are being made in an attempt to minimize the damage caused by the release and production of ROS. Presenting important role in cytoprotection, mainly by reducing the production and release of free radicals, fructose-1,6-bisphosphate is a metabolic regulator that stimulates the catabolic reactions of glycolysis, contributing to improved preservation of the tissues submitted to ischemia such as hearts, livers and kidneys. Based on these characteristics, fructose-1,6-bisphosphate may represent an alternative for the promotion of cellular protection in islet isolation.

Keywords: Type 1 diabetes, fructose-1,6-bisphosphate, transplants of pancreatic islets.

Introdução

O Diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é uma síndrome auto-imune órgão-específica caracterizada pela destruição seletiva de células β produtoras de insulina das ilhotas pancreáticas^{1,2}.

Acomete 0,3% da população geral com idade igual ou inferior a 20 anos e 0,5 a 1% se for considerada todas as faixas etárias³. A incidência do DM1 está aumentando em nível mundial, tanto em populações com incidência baixa ou elevada. Estima-se que até o ano de 2010, em muitas populações a incidência irá exceder 30 pacientes por 100.000 habitantes ao ano⁴.

As complicações secundárias microvasculares (retinopatia, neuropatia e nefropatia), e macrovasculares (doenças cardiovasculares e vascular periférica), que decorrem de anormalidades metabólicas, predominantemente da exposição crônica do organismo a níveis elevados de glicemia, tornam-se uma preocupação cada vez maior, uma vez que levam a uma perda da qualidade de vida do doente diabético, sendo importantes causas de morbidade e mortalidade⁵.

Como alternativa para pacientes diabéticos não-urêmicos hiperlábeis, com diabetes de difícil controle, principalmente quando acometidos por crises de hipoglicemia assintomática (casos muitas vezes associados a complicações secundárias), está o transplante de pâncreas^{6,7}.

Embora seja uma terapia bem estabelecida e que possa trazer benefícios como a melhora da qualidade de vida (liberdade dietética, parada de uso da insulina exógena e da monitorização glicêmica periódica) e a interrupção da progressão de complicações secundárias⁸, trata-se de procedimento cirúrgico de médio para grande porte, o que pode ter implicações diretas para os pacientes em termos de morbidade e até mortalidade^{9,10}.

Ainda, como ocorre com qualquer tipo de transplante de órgão sólido, o tratamento imunossupressor deve ser feito permanentemente, para evitar-se a rejeição ao enxerto. Os riscos infecciosos e neoplásicos trazidos por esse tratamento desautorizam o emprego do transplante pancreático nas fases iniciais do diabetes, a título de profilaxia das complicações secundárias. Além disso, os efeitos colaterais pelo uso de drogas imunossupressoras muitas vezes devem ser tratados recorrendo a internações hospitalares⁶. A mortalidade geral dos pacientes submetidos ao transplante é de cerca de 7% após 3 anos de alta hospitalar⁸.

O transplante de ilhotas pancreáticas surge como uma alternativa a essas desvantagens. Embora também exija terapia imunossupressora, dados da literatura especializada sugerem que doses menores de imunossupressão sejam suficientes¹¹. A principal vantagem, entretanto, seria a não necessidade de procedimento cirúrgico, pois esta depende de apenas uma infusão intravenosa de células em veia porta^{11,12}.

Entretanto, o transplante de ilhotas torna-se mais limitado que o pancreático, não só porque as ilhotas representam apenas 1 a 2% da massa celular do pâncreas, mas também pela baixa eficiência no seu isolamento devido a significativas perdas celulares por morte após a efetiva separação das ilhotas do tecido exócrino¹³.

Portanto, ainda que o transplante de pâncreas seja um procedimento invasivo, atualmente é o único tratamento que consegue restaurar e manter com alta taxa de sucesso e por tempo prolongado a normoglicemia em portadores de DM1¹⁰.

Ilhotas Pancreáticas

O transplante de ilhotas pancreáticas, embora ainda em caráter experimental, é um método de reposição de células beta através do isolamento e infusão de ilhotas de Langerhans¹¹.

Uma vez que pacientes diabéticos não necessitam de reposição de tecido exócrino, o transplante de ilhotas torna-se uma opção terapêutica atraente⁸. Esse tipo de transplante é principalmente oferecido a pacientes com diabetes do tipo 1 com insuficiência renal avançada, com o objetivo de alcançar o controle do metabolismo da glicose e a insulino-independência¹⁴.

Apesar do grande interesse de emprego desse método, o transplante de ilhotas ainda é prejudicado pelo baixo rendimento obtido durante o isolamento das ilhotas. O estresse oxidativo, a produção de citocinas pró-inflamatórias e o próprio trauma físico e mecânico decorrente da técnica de isolamento acabam culminando, de forma variável, com a perda de massa de ilhotas pancreáticas^{9,15}.

Produtos de macrófagos (tais como IL-1, IL-6, TNF- α e óxido nítrico), são os primeiros mediadores da disfunção das ilhotas transplantadas. Citocinas (IL-1, INF- α , INF- γ , TNF- α) são liberadas por leucócitos passageiros e células de Kupffer no fígado durante o processo de implantação das ilhotas. Essas citocinas são deletérias, seja direta ou indiretamente para a função e na enxertia^{9,16}. A secreção local de citocinas pró-inflamatórias por infiltração de linfócitos pode contribuir na perda de ilhotas.

A expressão e liberação de fator tecidual em ilhotas isoladas podem também influenciar negativamente no sucesso do enxerto de ilhotas através da ativação de plaquetas, formação de coágulo e recrutamento de linfócitos^{17,18}.

Além disso, a liberação de TNF- α está associada com a inflamação e rejeição, além de potencializar a ação de outras citocinas contribuindo com a citotoxicidade das ilhotas⁹.

Isolamento de ilhotas Pancreáticas

Embora exista aproximadamente 1 milhão de ilhotas por pâncreas, as técnicas atuais de preservação do órgão, assim como de isolamento de ilhotas permitem recuperar freqüentemente menos que a metade do número dessas, sendo que muitas sofrem traumatismos^{9,11}.

Métodos recentes têm aumentado a eficiência do processo de isolamento, apresentando aumento da qualidade da purificação das ilhotas e conseqüentemente maior impacto na enxertia¹⁹.

A separação das ilhotas do tecido exócrino baseia-se na diferença de densidade das ilhotas e do tecido exócrino. O gradiente de densidade por centrifugação para a purificação das ilhotas envolve a utilização de Ficoll (marca registrada de propriedade da GE Healthcare Bio-Sciences). Em 1989, Lake et al. introduziram a técnica de purificação de ilhotas em larga escala utilizando um processador de células Cobe 2991, que reduz o tempo necessário para o isolamento e o risco de contaminação por aumentar a esterilização do procedimento²⁰.

As preparações usadas para o transplante clínico de ilhotas contêm, em adição às ilhotas, consideráveis quantidades de células pancreáticas contaminantes, fato que ainda é estudado para analisar a evolução de cada componente celular no enxerto de ilhotas e o papel dessas diferentes células no microambiente após o isolamento e transplante. Blinman et al. reportaram que células pancreáticas acinares podem amplificar a resposta inflamatória, devido à capacidade do tecido exócrino em produzir e liberar citocinas em resposta ao estresse celular durante o isolamento²¹.

Estresse Oxidativo e Ilhotas Pancreáticas

O estresse oxidativo que é gerado durante a captação do pâncreas, parece ser diretamente proporcional ao tempo de preservação do órgão. A qualidade do isolamento das ilhotas pancreáticas parece depender do controle adequado destas variáveis^{15, 22}.

Sabe-se que durante o processo de isolamento, ocorre grande perda de ilhotas. A biofísica não fisiológica e as condições bioquímicas ambientais presentes durante a captação do órgão e o isolamento das ilhotas requerem uma abrupta adaptação metabólica, a qual pode resultar no sofrimento e eventual morte celular^{23,24}.

Recentemente, linhas de estudos em roedores e humanos têm indicado que o estresse oxidativo possui um papel importante no gatilho de morte das ilhotas e no tecido exócrino circundante. Em condições de extremo estresse, as defesas antioxidantes das ilhotas podem ficar sobrecarregadas, gerando um estado de desequilíbrio redox e produzindo espécies reativas de oxigênio (ROS). Um dos mecanismos já conhecidos de lesão celular é a liberação de radicais livres^{25,26}.

Quando comparadas a outros tipos de células, as ilhotas pancreáticas são particularmente susceptíveis à destruição causada por ROS^{27,28}. Estudos recentes têm demonstrado que o estresse gerado pelo isolamento aumenta a expressão de genes de citocinas e quimiocinas em ilhotas humanas²⁹. Um potencial alvo das ROS é a o NF- κ B, que é um fator de transcrição envolvido na regulação de citocinas pró-inflamatórias, assim como quimiocinas, moléculas de adesão e enzimas inflamatórias¹⁵.

Alguns grupos têm testado diversas moléculas que inibem a geração e/ou o dano mediado por espécies reativas de oxigênio (ROS), incluindo a glutathione peroxidase, superóxido dismutase e a heme oxigenase-1^{30, 31,32,33}.

Bottino et al. observaram que o isolamento de ilhotas produz e libera citocinas e quimiocinas como IL-6, IL-8 e proteína quimioatrativa de monócitos-1 (ou macrófago MCP-1), moléculas envolvidas na resposta ao estresse celular. MCP-1 e IL-8 podem

comprometer a função das ilhotas após o transplante, por aumentar o recrutamento e ativação de grande número de macrófagos e leucócitos para o sítio de implante. Os achados desse estudo demonstraram que houve uma inibição de NF-KB com o tratamento de ilhotas com antioxidantes. Também foi observada menor concentração IL-6 e MPC-1 no meio de cultura, quando as ilhotas foram mantidas com antioxidantes. Entretanto a secreção de IL-8 não foi relacionada com a ativação de NF-KB e nem foi reduzida com o tratamento com antioxidantes¹⁵. Esses achados podem implicar com uma relação do tempo de vida das ilhotas .

Danos diretos provocados por citocinas e liberação de óxido nítrico por ativação de células de Kupffer em resposta à implantação de ilhotas têm sido claramente demonstrados^{34, 35}. Em modelos de estudo envolvendo ratos, o enxerto é destruído por altos níveis de óxido nítrico (NO) liberados por macrófagos alogênicos ou singênicos^{36,37}.

Frutose-1,6-Bisfosfato

A frutose-1,6-bisfosfato (FBP) é um regulador metabólico que estimula as reações catabólicas da glicólise, melhorando a preservação do tecido frente à isquemia em órgãos como coração, fígado e rins^{38,39,40}. Apresenta-se como um monossacarídeo bisfosforilado, sendo componente da via glicolítica e neoglicogênese.

Wu et al. demonstraram que a administração oral em ratos de FBP 10 dias antes e 10 dias após o transplante diminuiu a apoptose e aumentou o índice proliferativo de células de mucosa. Esse grupo cita que, além do mecanismo envolvendo o efeito antiapoptose da FBP, a prevenção da depleção de ATP, além de ação quelante de cálcio extracelular e estabilizadora de membrana, podem ser propostas⁴¹.

Em estudo, realizado por Nunes et al., foi demonstrado que concentrações de FBP entre 1,2 e 10mM diminuem os níveis do receptor de interleucina solúvel (sIL-2R) em cultura de linfócitos, sugerindo assim, um possível efeito imunomodulador da FBP⁴². Tais

autores postularam que à interação da FBP com a membrana celular, onde ocorreria modificação da permeabilidade iônica⁴³.

Em outro estudo, o grupo de Nunes realizou uma análise fisiopatológica, comparando ratos sépticos tratados com FBP com ratos sépticos sem tratamento. Demonstrou-se uma mortalidade de 100% no grupo séptico não tratado em 15 horas. No grupo tratado com FBP, entretanto, a mortalidade foi de apenas 20%. Além disso, as alterações hematológicas normalmente observadas na sepse, não foram encontradas no grupo tratado⁴⁴.

Moresco et al. relataram que a FBP parece proteger o fígado de danos causados por radicais livres, quando o tempo de preservação é menor que 18 horas⁴⁵.

A FBP parece também reduzir a formação e liberação de radicais livres, devido à incorporação de substrato energético, levando a um aumento dos níveis de ATP intracelular e prevenção de alterações críticas na função da membrana celular⁴⁶.

Schinetti e Lazzarino demonstraram que a FBP limita a produção de superóxido e peróxido de hidrogênio por ativação de neutrófilo, impedindo o metabolismo oxidativo desses e inibindo a liberação de histamina por mastócitos⁴⁷.

Um estudo sobre a ação da FBP sobre o isolamento de ilhotas pancreáticas, realizado pelo nosso grupo, não demonstrou efeito do uso da mesma, em diferentes doses, frente ao grupo controle, não havendo diferença estatística na contagem, viabilidade celular e dosagem de radicais livres (manuscrito em preparação).

Contudo, acredita-se que estudos mais aprofundados devem ser realizados objetivando o encontro de uma dose ideal e uma metodologia mais apropriada para o uso dessa substância em isolamento de ilhotas.

Conclusão

O transplante de ilhotas pancreáticas é uma alternativa para a reposição do tecido endócrino em pacientes com diabetes mellitus tipo 1. Entretanto a perda de células durante o processo de isolamento reduz o número de ilhotas necessário à promoção da normoglicemia.

Devido às características de citoproteção e redução da formação e liberação de radicais livres, a frutose-1,6-bisfosfato pode apresentar uma possibilidade potencialmente atraente na proteção do tecido pancreático exposto a diversas condições prejudiciais às células durante o processo de isolamento.

Referências

1. Liu E, Eisenbarth GS. Type 1A diabetes mellitus associated autoimmunity. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2002;31:391-410.
2. Sesterheim P, Saitovitch D, Staub, HL. Diabetes mellitus tipo 1: multifatores que conferem suscetibilidade à patogénia auto-imune. *Scientia Medica*, 2007 v. 17, n. 4, p. 212-217.
3. Rewers M, Norris J, Dabelea D. Epidemiology of type mellitus. *Adv Exp Med Biol.* 2004;552:219-46.
4. Onkamo P, Väänänen S, Karvonem M, et al. Worldwide increase in incidence of type I diabetes – The analysis of data on published incidence trends. *Diabetologia.* 1999;42:1395-1403.
5. Nathan DM. Long-term complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1993; 328(23):1676- 85.
6. Sutherland DE, Gores PF, Farbey AC, et al. Evolution of kidney, pancreas and islet transplantation for patients with diabetes at the University of Minnesota. *AM J Surg.* 1993;166(5):456-91.

7. Moudry-Munss KC, Gruessner A, Sutherland DE. International pancreas transplant registry report 1993. *Transplant proc.* 1994;26:407-11.
8. Robertson RP, Davis C, Larsen J, et al. Pâncreas and islet transplantation for patients with diabetes. *Diabetes Care* 2000; 23(1):112-16.
9. Stevens RB, Matsumoto S, Marsh CL. Is islet transplantation a realistic therapy for the treatment of type 1 diabetes in the near future? *Clinical Diabetes.* 2001;19:51-60.
10. De Sá JR, Gonzalez AM, Melaragno CS, et al. Transplante de Pâncreas e Ilhotas em Portadores de Diabetes Melito. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2008;52:2.
11. Robertson RP. Islet transplantation as a treatment for diabetes – A work in progress. *N Engl J Med.* 2004;350:694-705.
12. Ren J, Jin P, Wang E, et al. Pancreatic islet cell therapy for type 1 diabetes: understanding the effects of glucose stimulation on islet in order to produce better islet for transplantation. *J Transl Med.* 2007;3:1-15
13. Rosenberg L, Wang R, Paraskevas S, et al. Structural and functional changes resulting from islet isolation lead to islet cell death. *Surgery.* 1999;126(2):393-8
14. Berney T, Bühler L, Caulfield A, et al. Transplantation of islet of Langerhans: new developments. *Swiss Med Wkly.* 2001;131(47-48):671-80.
15. Bottino R, Balamurugan NA, Tse H, et al. Response of human islet to isolation stress and the effect of antioxidant treatment. *Diabetes.* 2004;53(10):2559-68.
16. Emamaullee JA, Shapiro AMJ. Interventional strategies to prevent β -cell apoptosis in islet transplantation. *Diabetes.* 2006;5:1907-14.
17. Moberg L, Johansson H, Lukinius A, et al. Production of tissue factor by pancreatic islet cells as a trigger of detrimental thrombotic reactions in clinic islet transplantation. *Lancet.* 2002;360:2039-45.

18. Ozmen L, Ekdahl KN, Elgue G, et al. Inhibition of thrombin abrogates the instant blood-mediated inflammatory reaction triggered by isolated human islet: possible application of the thrombin inhibitor melagatran in clinic transplantation. *Diabetes*. 2002;51:1779-84.
19. Shapiro AM, Ryan EA, Lakey JR. Pancreatic islet transplantation in the treatment of diabetes mellitus. *Best Pract Res clin endocrinol metabol*. 2001;15(2):241-64.
20. Lake SP, Bassett PD, Larkins A, et al. Large-scale purification of human islets utilizing discontinuous albumin gradient on IBM 2991 cell separator. *Diabetes*. 1989;28(1):143-45.
21. Blinman TA, Gukovsky I, Mouria M, et al. Activation of pancreatic acinar cells on isolation from tissue: cytokine upregulation via p38 MAP kinase. *Am J Physiol Cell Physiol*. 200;279 (6):1993-03.
22. Tsujimura T, Kuroda Y, Klin T, et al. Human islet transplantation from pancreases with prolonged cold ischemia additional preservation by the two-layer (UW solution/perfluorochemical) cold-storage method. *Transplantation*. 2002;74:1687-1691.
23. Ricordi C, Fraker C, Szust J, et al. Improved human islet isolation outcome from marginal donors following addition of oxygenated perfluorocarbon to the cold-storage solution. *Transplantation*. 2003;75:1524-1527.
24. Hering BJ, Matsumoto I, Sawada T, et al. Impact of two-layer pancreas preservation on islet isolation and transplantation. *Transplantation*. 2002;74:1813-1816.
25. Azevedo-Martins AK, Lortz S, Lenzen S, et al. Improvement of the mitochondrial antioxidant defense status prevents cytokine-induced nuclear factor-kb activation in insulin-producing cells. *Diabetes*. 2003;52:93-101.
26. Piganelli JD, Flores SC, Cruz C, et al. A metalloporphyrin based superoxid dismutase mimic inhibits adoptive transfer of auto-immune diabetes by a diabetogenic T-cell clone. *Diabetes*. 2002;51:347-355.

27. Eizirik DL, Pipeleers DG, Ling Z, et al. Major species differences between humans and rodents in the susceptibility to pancreatic beta-cell injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(20):9253-6.
28. Lenzen S, Drinkgern J, Tiedge M. Low antioxidants enzyme gene expression in pancreatic islet compares with various other mouse tissues. *Free Radic Biol Med*. 1996; 20(3):463.
29. Johansson U, Olsson A, Gabrielsson S, et al. Inflammatory mediators expressed in human islet of Langerhans: implication for islet transplantation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;308(3):474-9.
30. Moriscot C, Pattou F, Kerr-Conte J, et al. Contribution of adenoviral-mediated superoxide dismutase gene transfer to the reduction in nitric oxide-induced cytotoxicity on human islet and INS-1 insulin-secreting cells. *Diabetologia*. 2000; 43(5):625-31.
31. Tobiasch E, Günther L, Bach FH. Heme oxygenase-1 protects pancreatic beta cell from apoptosis caused by various stimuli. *J Investig Med*. 2001;49(6):566-71.
32. Pileggi A, Molano RD, Berney T, et al. Heme oxygenase-1 induction in islet cells results in protection from apoptosis and improved in vivo function after transplantation. *Diabetes*. 2001;50(9):1983-91.
33. Lepore DA, Shinkel TA, Fiscaro N, et al. Enhanced expression of glutathione peroxidase protects islet beta cells from hypoxia-reoxygenation. *Xenotransplantation*. 2004;11(1):53-9.
34. Kaufman DB, Platt JL, Dunn DL, et al. Differential role of MAC-1+ cells, and CD4+ and CD8+ T lymphocytes in primary nonfunction and classic rejection of islet allografts. *J Exp Med*. 1990;172(1):291-02.
35. Berney T, Molano RD, Cattani P, et al. Endotoxin-mediated delayed islet graft function is associated with increased intra-islet cytokine production and islet cell apoptosis. *Transplantation*. 2001;71(1):125-32.

36. Marquet RL, Bonthuis F, Van IJken M, et al. Primary nonfunction of islet xenografts: the role of macrophages. *Transpl Int.* 1994;7(1):660-62.
37. Kröncke Kd, Rdrigues ML, Kolb H, et al. Cytotoxicity of activated rat macrophages against syngeneic cells is arginine-dependent, correlated with citrulline and nitrite concentrations and is identical to lysis by the nitric oxide donor nitroprusside. *Diabetologia.* 1993;36(1):17-24.
38. Niu W, Zhang F, Ehringer W, et al. Enhancement of hypothermic heart preservation with fructose 1,6-diphosphate. *J surg Res.* 1999;85(1):120-29.
39. Torras J, Borobia FG, Herrero I, et al. Hepatic preservation with a cold-storage solution containing fructose-1,4-diphosphate and mannitol: evaluation with the isolated perfused rat liver and comparison with University of Wisconsin solution. *Transplant proc.* 1995;27(4):2379-81.
40. Herrero I, Torras J, Carrera M, et al. Evaluation of a preservation solution containing fructose-1,6-diphosphate and mannitol using the isolated perfused rat kidney. Comparison with Euro-Collins and University of Wisconsin solutions. *Nephrol Dial Transplant.* 1995;10(4):519-26.
41. Wu XT, Lis JS, Zhao XF, et al. Effects of n-3 fatty acid, fructose-1,6-diphosphate and glutamine on mucosal cell proliferation and apoptosis of small bowel graft after transplantation in rats. *World J gastroenterol.* 2003;9(6):1323-6.
42. Bordignon Nunes F, Meier Graziottin C, Alves filho JC, et al. Immunomodulatory effect of fructose-1,6-bisphosphate on T-lymphocytes. *Int immunopharmacol.* 2003;3(2):267-72.
43. Nunes FB, Alves-Filho JC, Alves Bastos CM, et al. Effects of the chlorpropamide and fructose-1,6-bisphosphate of soluble TNF receptor II levels. *Pharmacol Res.* 2004;49(5):449-53.

44. Nunes FB, Simões Pires MG, Alves Filho JC, et al. Physiopathological studies in septic rats and the use of fructose 1,6-bisphosphate as cellular protection. *Crit Care med.* 2002;30(9):2069-74.
45. Moresco RN, Santos RC, Alves filho JC, et al. Protective effects of fructose-1,6-bisphosphate in the cold storage solution for liver preservations in rat hepatic transplantations. *Transplat Proc.* 2004;36(5):1261-64.
46. Gámez A, Alva N, Roig T, et al. Beneficial effects of fructose 1,6-bisphosphate on hypothermia-induced reactive oxygen species injury in rats. *Eur j pharmacol.* 2008; 590(1-3):115-19.
47. Schinetti ML, Lazzarino G. Inhibition of phorbol ester-stimulated chemiluminescence and superoxide production in human neutrophils by fructose 1,6-diphosphate. *Biochem Pharmacol.* 1986;35(10):176

3.OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar a ação citoprotetora da FBP sobre ilhotas pancreáticas durante o processo de isolamento, assim como o seu papel sobre a formação e liberação de radicais livres.

2. Objetivos específicos

Avaliar o efeito da FBP sobre:

- a) o número de ilhotas obtido após o processo de isolamento;
- b) a viabilidade das ilhotas isoladas;
- c) a produção de radicais livres após digestão pancreática e ao final do processo de isolamento.

4. Artigo Original

FRUCTOSE-1,6-BISPHOSPHATE AS AN ALTERNATIVE IN ISLET PANCREATIC ISOLATION

De: **onbehalfof@scholarone.com** em nome de **isabel.vandorpe@ugent.be**

Enviada:terça-feira, 23 de dezembro de 2008 4:19:08

Para: sil_arol@hotmail.com

Dear Miss Oliveira,

Thank you for submitting the above manuscript to NDT.

It will be considered for review by external reviewers and by the Editorial Board of our journal.

Your manuscript number is NDT-02011-2008. Please note this number down and make sure you mention it in all future correspondence.

In order to validate the email addresses of all co-authors, you will all receive an email confirming this manuscript ID.

As corresponding author you can keep track of your manuscript by logging on periodically to Nephrology Dialysis Transplantation Manuscript Central web site (<http://mc.manuscriptcentral.com/ndt>), where the status will be displayed in your Author Center.

OPTIONAL OPEN ACCESS - Please note that if your manuscript is accepted for publication in NDT, you will have the option, at an additional charge, to make your paper freely available online immediately upon publication, under the Oxford Open initiative (see <http://www.oxfordjournals.org/oxfordopen/>). Selecting this option in no way influences the review process of your paper.

Yours sincerely,

Prof. dr. N. Lameire
Editor-in-Chief, Nephrology Dialysis Transplantation
isabel.vandorpe@ugent.be

FRUCTOSE-1,6-BISPHOSPHATE AS AN ALTERNATIVE IN ISLET PANCREATIC ISOLATION

Carmen Silvana Araujo de Oliveira^{*}, Patrícia Sesterheim^{*}, Robson Henrich Amaral^{**}
Luiz Buaes^{**}, Jarbas Rodrigues de Oliveira^{**}, David Saitovitch^{*}

^{*} Laboratório de Nefrologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil

^{**} Laboratório de Pesquisa em Biofísica da Inflamação, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil

Corresponding author:

Carmen Silvana Araujo de Oliveira
Laboratório de Nefrologia, Instituto de Pesquisas Biomédicas
Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
Av. Ipiranga, 6690, 2º andar. Porto Alegre, RS, Brasil. CEP: 90610-000
Tel: +55 51 3320-3500 – R: 3340
E-mail: sil_arol@hotmail.com

Abstract

Introduction. Type 1 diabetes (DM1) is a multifactor disease occurring after the auto-immune destruction of beta cells. Islets transplantation is a method for replacement of these cells, and its success is achieved after implantation of a mass of islets in therapeutic level. However, during the isolation process, there is a great islet cell damage. Fructose-1,6-bisphosphate is a metabolic regulator with cytoprotector effect and presents an important action in reducing the formation and release of free radicals.

Methods. Isolated islets were resuspended in media containing or not varying concentration of fructose-1,6-bisphosphate at doses of 1.25, 2.5, 5.0 and 10 mM/L. Counting and viability of islets were carried out with dithizone and trypan blue use, respectively. Free radicals measurement was accomplished in the supernatant collected after pancreatic digest and after the last phase of isolation.

Results. There was no statistically significant difference observed in islets counting, neither in its viability. And the average of free radicals reduction did not have a statistically significant difference when compared in its two stages of the process.

Conclusion. Fructose-1,6-bisphosphate have not had a beneficial effect at tested doses, neither in the islets number nor in their viability. At the same time, there is not an influence upon the free radicals quantity produced by the isolated pancreatic islets.

Keywords: Diabetes mellitus type 1, Islet pancreatic isolation, Fructose-1,6-bisphosphate.

Introduction

The Type 1 diabetes (DM1) is multifactor disease, caused by the destruction of beta cells, mediated by an auto-immune processes, culminating in a absolute insulin deficiency [1,2,3].

The pancreatic islets transplant is a method to replace beta cells, and do not require a surgery proceeding. Specialized literature suggests that lower doses of immunosuppression can be enough, it allows a reduction of immunosuppressant drugs prescription and consequently the opportunistic infections risk decreases [4].

One of the most decisive factors for the islets transplantation success is the infusion of therapeutic level of islet mass. The stress that is produced during pancreas caption, the organ time to preserve itself and the technique of islets isolation are factors that can induce the low quality and quantity of them [5,6].

Although there are approximately 1 million of islets in the pancreas, the present organ preservation and the isolation technique of islets allow to recover less than a half of them, and many islets suffer from trauma [7].

Among some determinants that culminate in damage of islets pancreatic mass, during the captivation, isolation and cell infusion process, there will be the oxidative stress, the pro-inflammatory cytokines expression, and the mechanical/physical trauma [8,9].

Recent methods have insinuated an efficacious increasing of isolation process, with a positive impact on grafting and increasing the quality of islets purification to the patients transplantation [8,9].

The fructose-1,6-bisphosphate (FBP) is a metabolic regulator that stimulates catabolic reactions of glycolysis, improving the tissue preservation in the presence of ischemia. It's described in the literature several benefic effects in pathological events. Its action as regulatory seems to be related to its ability to stimulate glucose and inhibit the gluconeogenesis. Moreover, it can also stimulate the formation of glycogen, at the same time that prevents its degradation [10,11,12]. Besides, the FBP shows an important action reducing the formation of free radicals and their liberation, due to the incorporation of energy substrate, increasing the level of intracellular ATP and prevention of critical changes in the membrane cells function [13]. The present study aimed to test the use of FBP in the efficiency of islet isolation.

Materials and methods

Forty-six isogenic line BALB / c mice with 8 to 12 weeks of age were used. The animals were killed by cervical dislocation, the pancreas were removed and submerged into a collagenase solution type IV in the control group (0,005g of collagenase in 7,5 mL HBSS solution) and collagenase enriched with FBP at doses 1.25, 2.5, 5.0, 10.0 mM/L (completing the final volume 7,5 mL of solution) solution for pancreatic digestion. During the isolation, it was used Ficoll histopaque density 1.077 (registered trademark owned by GE Healthcare Bio-Sciences). Dithizone and blue tripan were used for counting and viability of pancreatic islets, respectively. The free radicals mensuration followed the method described by Esterbauer and Cheeseman [14], being carried out in pos pancreatic digest supernatant and post-digestion process isolation. Statistical analysis was

performed using the Kruskal-Wallis test and the data shown are expressed as median. For statistical difference, was considered the value of $P < 0,05$.

Results

To measure the quantity of pancreatic islets obtained after the isolation in each experimental group, was performed conut to these cells with dithizone. FBP with the experimental groups showed no statistical difference in the counting of islets when compared to the control group and not to each other ($p = 0,529$), as chart shown in Figure 1. The cell viability was performed with the trypan blue dye, is counting dead cells (stained) and living cells (no color) and was expressed as a percentage. That analysis (Figure 2) also has not been demonstrated statistical difference ($p = 0,228$). It was conducted to compare the average reduction of free radicals among the measurement in supernatants collected after stage of digestion and after all the stages of isolation. Values measured after digestion and final stage of the process measurement of free radicals (figure 3) did not show any statistical difference in the experimental group performed ($n = 0,420$).

Discussion

The therapy with pancreatic islets transplantation appears to be an attractive alternative for the replacement of B cells in patients with type 1 diabetes complicated, even though it is still experimental. Nevertheless, the success of such transplant is the implantation of the islets mass in therapeutic level, to promote and

maintain normoglycemia. This fact has also been a limit to the use of this technique as an effective and established therapy for treatment.

During the isolation, there is a great damage of these cells. This provides a low income after the whole process and the necessity for more than one pancreas per receptor takes place. Facing the overall difficulty of obtaining organs and the growing list of patients waiting for transplants, the use of this technique is still limited.

In the process of islets isolation, many authors mention the loss occurrence of about 50% of these cells. Actions to prevent such damage during all stages are ways to optimize this process [15].

The use of FBP in pancreatic islets had not already been described in the literature. The choice of methodology for the use of this substance and doses to be studied in pancreatic islets, were established in accordance with previously published studies involving FBP and other cell lines, as lymphocytes [16].

In this study, the number of pancreatic islets, when compared between different experimental groups (Figure 1), demonstrated no statistically significant difference, but it was observed a lower number of islets in the group FBP 1.25 nmol compared to the control group. However, it has observed a progressive increase in the islets number in other doses, in which may have a dose-dependent relation with cytoprotection. It is possible that increase would become more clear if there were information of isolated islets counting at doses lower than 1.25 mM/L and higher than 10 mM/L.

The origin of a viscous material, from the use of collagenase (well reported in literature), can also interfere in the quality of pancreatic isolation. This formation

is exaggerated when occurs a decrease of calcium [17]. The preservation solution (HBSS) in which the islets are maintained throughout the isolation presents calcium chloride in its composition (1855 g / L). Nevertheless before the chelating action of calcium presented by the FBP, the removal of this ion may have occurred in the HBSS liquid, and may explain the low viability throughout the process of isolation (figure 2).

The control group had a low viability, demonstrating that there were technical problems in the experiments. The results of the experimental groups might be reflecting these problems, which must be refined and rectified to give the work continuity of islets isolation. The organs conditions are considered one of the problems. Although the animals have genetic quality, they are created and maintained in conventional environment with few sanitary barriers, which may have interfered on the quality of the health of mice.

The reduction average of free radicals when compared to the two previous analysis demonstrated no statistically significant difference. These data show that the FBP is not different from the control group even when increasing the c FBP concentrations (figure 3).

The choice of the technique for the use of FBP was done randomly, because there are not work similar to this.

Other alternative for FBP use could be implemented. The FBP could be infused in the pancreas by cannulation of pancreatic duct both before and after the organs removal. This methodological form of FBP use seems interesting, because in this way could practice their cytoprotectant and antioxidants properties in the original case, avoiding that during the organ abstraction the oxidative stress

process happens. Still, it is also necessary the use of FBP evaluation in isolation followed by the transplanting of these cells, whereas it have immunosuppressive properties [16], the FBP effects may be more visible in the monitoring post infusion of the islets mass by a decrease of pro-inflammatory cytokines and promoting the engraftment.

The FBP doses tested were chosen based in a study conducted by Nunes et al [16], performed with in cultivation of lymphocytes. As there were no previous studies to the best of knowledge of FBP in islet. However, it is noted that to take effect in pancreatic islets it may be necessary higher doses of FBP. Although it has not shown statistical significance in cell counting, the FBP increasing doses showed up closer to the control group, which could confirm the idea of using higher doses. In addition, the FBP in the study by Nunes et al, was maintained in cell culture, that prolongs the exposure time of the drug with the cells, a fact that did not occur to the islets. The FBP incubation time with the solution of collagenase and HBSS may also have been insufficient (25 minutes) being not sufficient to place the action. It is necessary a future study aiming to find the most appropriate dose and a longer exposure time of the islets with FBP.

Conclusion

Based on the present findings, FBP does not seem to exert a beneficial effect on either islet viability or count, when added to the digestion solution. Also, free radicals production does not seem to be affected by this therapy. Future studies should explore different FBP doses, as well as exposure time.

References

- [1] American diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus (position statements). *Diabetes Care*. 2005; 28(suppl1):S37-S42.
- [2] Trucco M. Regeneration of the pancreatic beta cell. *J Clin Invest*. 2005; 115:5-12.
- [3] Sesterheim P, Saitovitch D, Staub, HL. Diabetes mellitus tipo 1: multifatores que conferem suscetibilidade à patogenia auto-imune. *Scientia Medica*, 2007 v. 17, n. 4, p. 212-217.
- [4] Robertson RP. Islet transplantation as a treatment for diabetes – A work in progress. *N Engl J Med*. 2004; 350:694-705.
- [5] Bottino R, Balamurugan NA, Tse H, et al. Response of human islet to isolation stress and the effect of antioxidant treatment. *Diabetes*. 2004; 53(10): 2559-68.
- [6] Kneteman N, Lakey J, Kizikisik L, et al. Cadáver pancreas recovery technique: impact on islet recovery and in vitro function. *Transplantation*. 1994; 58:1114-1119.
- [7] Gores PF, Sutherland DE. Pancreatic islet transplnatation: is purification necessary? *Am J Surg*. 1993; 166: 538-42.
- [8] Stevens RB, Matsumoto S, Marsh CL. Is islet transplantation a realistic therapy for the treatment of type 1 diabetes in the near future? *Clinical Diabetes*. 2001; 19: 51-60.
- [9] Bottino R, Balamurugan NA, Tse H, et al. Response of human islet to isolation stress and the effect of antioxidant treatment. *Diabetes*. 2004; 53(10): 2559-68

- [10] Niu W, Zhang F, Ehringer W, et al. Enhancement of hypothermic heart preservation with fructose 1,6-diphosphate. *J surg Res.* 1999; 85 (1): 120-29.
- [11] Kirtley ME, McKay M. Fructose-1,6-diphosphate: a regulator of metabolism. *Mol Cell Bio Chem* 1977; 8 (2-3):141-149.
- [12] Chlouverakis, C. The lipolytic action of fructose-1,6-diphosphate. *Metabolism* 1968; 17:708-16.
- [13] Gámez A, Alva N, Roig T, et al. Beneficial effects of fructose 1,6-bisphosphate on hypothermia-induced reactive oxygen species injury in rats. *Eur j pharmacol.* 2008; 590 (1-3): 115-19.
- [14] Draper HH; Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990; 186:421-431.
- [15] Gores PF, Sutherland DE. Pancreatic islet transplantation: is purification necessary? *Am J Surg.* 1993;166:538-42.
- [16]] Bordignon Nunes F, Meier Graziottin C, Alves filho JC, Lunardelli A, Caberlon E, Peres A, et al. Immunomodulatory effect of fructose-1,6-bisphosphate on T-lymphocytes. *Int immunopharmacol.* 2003; 3 (2): 267-72
- [17] Amoli MM, Moosavizadeh R, Larijani B. Optimizing conditions for rat pancreatic islets isolation. *Cytotechnology.* 2005; 48: 75-78

Figure 1

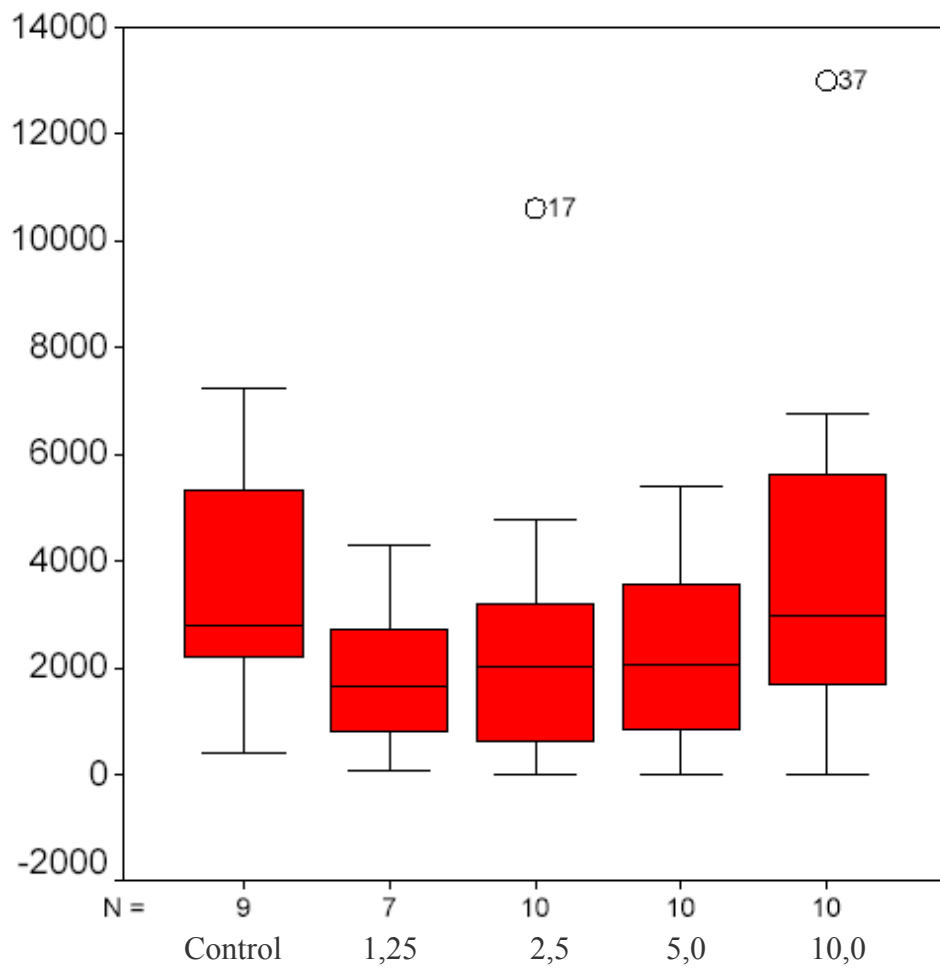


Figure 1 – Count of islet pancreatic in different group

Figure 2

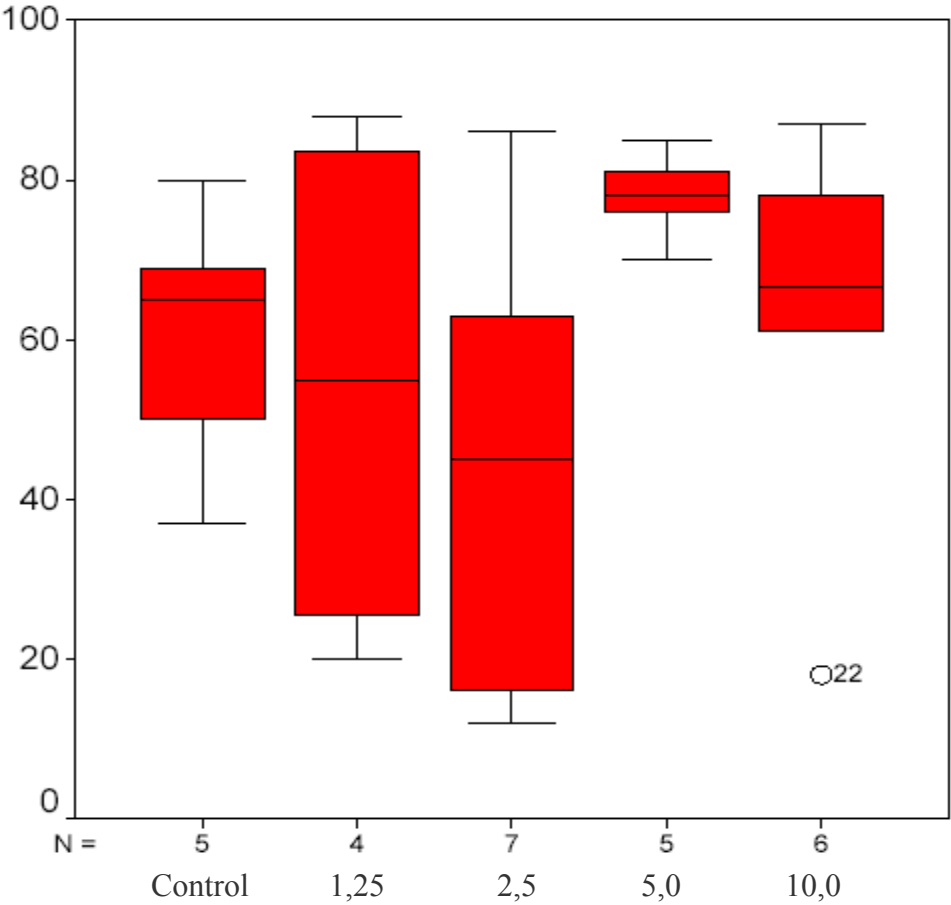


Figure 2 - cell viability (in percentage) in different groups

Figura 3

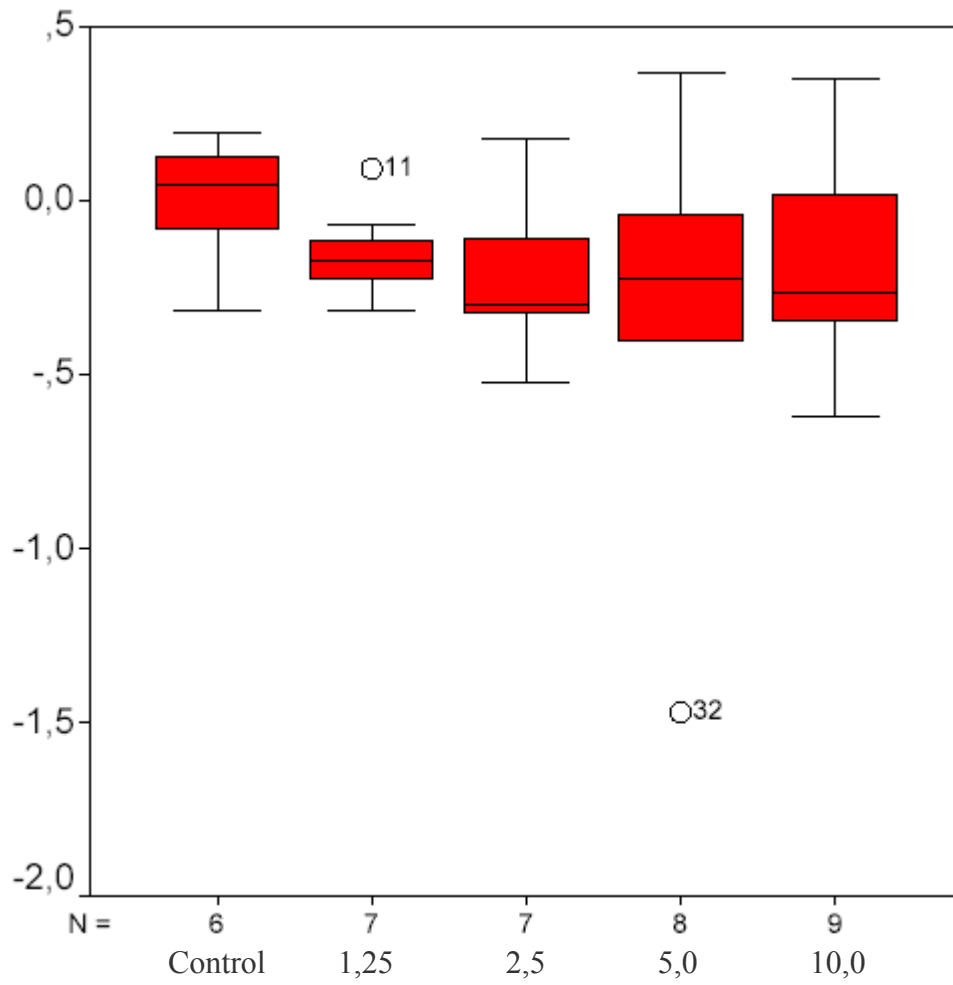


Figure 3 - Media-reducing free radicals when compared the values measured after digestion and final stage of isolation

5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados encontrados nesse trabalho, a FBP parece não exercer um efeito benéfico sobre a contagem e a viabilidade das ilhotas pancreáticas, quando adicionada à solução de preservação. Além disso, a produção de radicais livres parece não ser afetada por essa terapia.

Estudos futuros deverão explorar diferentes doses de FBP, bem como o tempo de exposição da FBP à droga.

6. Anexos

ANEXO 1 – CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO CIENTÍFICA



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

303/07-PG

Porto Alegre, 14 de agosto de 2007.

A Pós-Graduanda
Carmem Silvana Araújo de Oliveira
N/Faculdade

Prezada Pós-Graduanda:

Comunicamos que a proposta da dissertação intitulada "Uso da frutose-1, 6-bisfosfato em transplante de ilhotas pancreáticas mantidas em cultura celular" foi **aprovada** pela Comissão Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde.

A mesma deverá ser encaminhada ao Comitê de Ética em Pesquisa, através do CINAPE, 2º andar do Hospital São Lucas/PUCRS. Em anexo, cópia da avaliação.

Atenciosamente,

Profa. Dr. Magda Lahorgue Nunes
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
em Medicina e Ciências da Saúde

C/c Prof. Dr. David Saitovitch

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 – P. 60 – 3º andar – CEP 90610-000
Porto Alegre – RS – Brasil
Fone: (51) 3320-3318 – Fax (51) 3320-3316
E-mail: medicina-pg@pucrs.br
www.pucrs.br/famed/pos

ANEXO 2 – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS

1



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS



Ofício 016/08-CEUA

Porto Alegre, 13 de março de 2008.

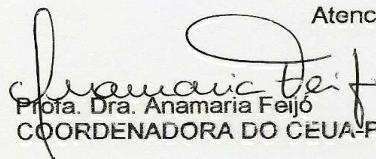
Senhor(a) Pesquisador(a):

O Comitê de Ética para o Uso de Animais apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa intitulado: **"Uso da frutose-1,6-bifosfato em transplante de ilhotas pancreáticas mantidas em cultura celular"**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Relatórios do andamento do projeto devem ser entregues a este Comitê.

Atenciosamente,


Prof. Dra. Anamaria Feijó
COORDENADORA DO CEUA-PUCRS

Ilmo(a) Sr(a)
Dr(a) David Sitovitch
N/Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 – 3º andar sala 314- CEP: 90610-000
Fone/Fax: (51) 3320-3345
E-mail: ceua@pucrs.br

ANEXO 3 – CERTIFICADO APRESENTAÇÃO AMOSTRA PÓS-GRADUAÇÃO


PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE EXTENSÃO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Certificamos que o trabalho

“USO DA FRUTOSE-1,6-BISFOSFATO EM TRANSPLANTE DE ILHOTAS PANCREÁTICAS MANTIDAS EM CULTURA CELULAR”

de autoria de CARMEN SILVANA ARAUJO DE OLIVEIRA
foi apresentado na **II MOSTRA DE PESQUISA DA PÓS-GRADUAÇÃO DA PUCRS**, realizada de 23 a 26 de
outubro de 2007 e registrado sob o nº. 7918-688.

Porto Alegre, 26 de outubro de 2007.


João Dornelles Júnior
Pró-Reitor de Extensão


Jorge Luiz Almeida-Abreu
Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação


Luiza Maria Martins Giraffa
Coordenadora

CERTIFICAÇÃO DIGITAL Nº 258151-962797

PUCRS

ANEXO 4 – CONSIDERAÇÕES SOBRE A METODOLOGIA

a) Animais

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados 46 camundongos isogênicos das linhagens Balb/C, criados sob condições de biotério convencional, na Coordenação de Produção e Experimentação Animal (CPEA) do Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT) da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) do Rio Grande do Sul.

Os animais tinham entre 8 e 12 semanas de idade. Antes dos experimentos, estes animais foram alimentados com ração balanceada padrão para roedores, receberão água *ad libitum* e foram mantidos em gaiolas individuais, devidamente identificadas sob fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro (06:00/18:00h).

Todos os procedimentos adotados, durante as técnicas, envolvendo os animais, seguiram o preconizado pela Sociedade Brasileira de Ciência em animais de Laboratório (SBCAL-COBEA), cumprimentando a Constituição do Estado Lei nº 11.915, artigo 82, inciso IV de 21 de maio de 2003 [1,2].

b) Delineamento Experimental

Os grupos experimentais utilizados no projeto foram:

- Controle (n= 9): Ilhotas pancreáticas isoladas pelo método convencional, sem adição de FBP.

- FBP 1,25 (n =7): ilhotas pancreáticas isoladas utilizando FBP na concentração de 1,25 nmol.
- FBP 2,5 (n=10): ilhotas pancreáticas isoladas utilizando FBP na concentração de 2,5 nmol.
- FBP 5,0 (n=10): ilhotas pancreáticas isoladas utilizando FBP na concentração de 5,0 nmol.
- FBP 10,0 (n=10): ilhotas pancreáticas isoladas utilizando FBP na concentração de 10,0 nmol.

c) Isolamento de ilhotas pancreáticas

Para captação dos órgãos, animais sadios (n=46) foram mortos por deslocamento cervical. Os pâncreas foram retirados por procedimento de laparotomia em U e submersos em solução de colagenase tipo IV ou, dependendo do grupo experimental, FBP em suas respectivas concentrações. O pâncreas ao ser colocado nessa solução, foi picotado com uma tesoura de ponta fina para aumentar a superfície de contato, facilitando a extração celular. Manteve-se a solução contendo o pâncreas picotado em temperatura ambiente por 25 minutos. Passado esse período, iniciou-se a atividade enzimática de digestão pancreática, incubando esses pâncreas com essa solução em banho-maria a 37°C por 15 minutos.

No término do tempo, os pâncreas foram retirados do banho-maria e todos seus sobrenadantes foram completamente coletados para posterior mensuração dos radicais livres. Imediatamente, foi adicionado 4 mL de solução de HBSS à 4°C

para cessar a atividade enzimática. Foram centrifugados por 2 minutos a 2000 rpm e o sobrenadante resultante dessa centrifugação foi desprezado. Esse procedimento de centrifugação foi realizado mais uma vez com o objetivo de descartar todos os resíduos de colagenase remanescentes que poderiam ainda estar ativando o processo de digestão pancreática.

Como o tecido acinar é mais denso, o isolamento e purificação das ilhotas é realizado por meio de gradiente de densidade com Ficoll histopaque. Desprezado o sobrenadante, o pelete formado foi resuspenso em solução de HBSS à 4°C e o pelete foi adicionado lentamente a outro tubo falcon contendo 4 mL de ficoll histopaque e foi centrifugado por 15 minutos a 2000 rpm em centrifuga com *break* e aceleração. Terminada a centrifugação, foi observada a formação de uma nuvem de aglomerado celular, onde encontravam-se as ilhotas pancreáticas. Essa nuvem foi coletada com pipeta Pasteur para outro tubo falcon, onde imediatamente iniciou-se a lavagem dessas células com 4 mL solução à 4°C de HBSS para completa remoção do ficoll. Esse processo de lavagem foi repetido por 3 vezes, sendo que na última lavagem o sobrenadante foi novamente coletado para a mensuração de radicais livres. O pelete resultante foi resuspenso em 1 mL de HBSS para a determinação da contagem e da viabilidade celular.

d) Contagem de ilhotas

Após o isolamento, o pelete resuspenso com 1 mL de HBSS foi devidamente homogenizado e uma amostra de 200µL da suspensão foi coletada para realizar a contagem celular. Em um microtubo, foi adicionado a essa amostra da suspensão de

ilhas 20 μ L de corante ditizona. A contagem foi realizada em placa de petri gradeada em microscópio óptico em aumento de 20 vezes. O valor encontrado foi corrigido para o volume.

e) Ensaio de Viabilidade

A viabilidade celular foi avaliada por coloração das células com o corante azul tripano, que por não ser lipofílico, não penetra nas células vivas, fato que passa a ocorrer no caso de ruptura da membrana plasmática, colorindo de azul essas células e indicando a morte celular. A contagem total foi realizada a partir de uma diluição em azul tripan (1:1). O diferencial das células foi realizado em microscópio óptico com aumento de 20 vezes, iniciando pelas células viáveis e então não viáveis. O resultado encontrado foi corrigido para 1 ml e a viabilidade expressa em porcentagem.

f) Dosagem de Radicais Livres

As amostras foram coletadas para mensuração dos radicais livres em dois momentos do processo de isolamento das ilhotas: pós processo de digestivo do pâncreas e o final de todo o processo de isolamento das ilhotas. O sobrenadante da coletados foram armazenados em microtubo, sendo estocados em freezer – 20°C até o momento da dosagem.

A determinação da produção de radicais livres seguiu o método descrito por Esterbauer e Cheeseman [4], que se baseia na determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Aldeídos sempre são produzidos em processos de peroxidação lipídica, sendo o malondialdeído (MDA) o mais abundante. A medida do

MDA, um dos bem conhecidos produtos da lipoperoxidação, vem sendo utilizado como uma medida indireta da produção de radicais livres e um marcador da condição oxidativa. Para isso, foram utilizados 125 µL de sobrenadante que foi aquecido com ácido tiobarbitúrico 0,67% e ácido tricloroacético (TCA) 10% por 15 minutos em banho-maria fervente. O produto corado foi extraído com n-butanol e centrifugado por 15 minutos a 5000 rpm. Após, aspirou-se à fase superior, ou seja, o sobrenadante e realizou-se a leitura no espectrofotômetro em 535nm. Devido à ocorrência de desproteinização das amostras durante as dosagens, a correção por grama de proteína foi realizada. A determinação das proteínas totais foi realizada através de kit comercial da Labtest Diagnóstica. As proteínas totais foram determinadas através de sistema colorimétrico de reação de ponto final, onde os íons cobre em meio alcalino (reagente de biureto) reagem com as ligações peptídicas das proteínas séricas formando um produto corado medido por espectrofotometria em 545nm, e o resultado encontrado utilizado para a correção.

[1] COBEA. *Colégio Brasileiro de Experimentação Animal: Legislação e Ética*. São Paulo. Disponível em: <<http://www.cobea.org.br>> Acesso em: 20 mar. 2002.

[2] Rio Grande do Sul. Lei 11.915, de 21 de maio de 2003. Institui o Código Estadual de Proteção aos Animais. *Constituição do Estado*, art.82 inc IV, 29 mai. 2003.

[3] BRASIL. Lei 714, de 20 de junho de 2002. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais, e dá outras providências. *Conselho Federal de Medicina Veterinária*, art 16, 20 jun. 2002.

[4] Draper HH; Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990; 186:421-431.

ANEXO 5 – RESULTADOS ADICIONAIS

a) Contagem de Ilhotas Pancreáticas

Para mensurar a quantidade de ilhotas pancreáticas obtidas após o isolamento em cada grupo experimental, foi realizado a contagem dessas células com ditizona. A contagem foi realizada em 20 microlitros e o número de ilhotas encontradas foi calculada para o total de 1 ml de suspensão obtido no isolamento.

As contagens de ilhotas realizadas em cada grupo estão apresentadas na tabela 1.

<i>Experimento</i>	<i>Controle</i>	<i>1,25</i>	<i>2,5</i>	<i>5</i>	<i>10</i>
1	6100	1650	10600	4050	13000
2	7250	4300	1800	2800	6750
3	2200	50	2800	850	5600
4	400	2700	2250	1100	300
5	2800	400	4750	1300	1800
6	3200	1200	0	0	2800
7	2300	2700	550	300	0
8	1750	-	600	3550	1700
9	5300	-	1150	2950	3100
10	-	-	3200	5400	3350

Tabela 1 – Contagem de ilhotas pancreáticas coradas com ditizona

b) Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi realizada com o corante azul tripan, contando-se células mortas (coradas) e células vivas (sem coloração). Novamente, a contagem foi realizada em 20 microlitros e o número de ilhotas encontradas foi calculada para o total de 1 ml de suspensão obtido no isolamento.

A viabilidade foi expressa em porcentagem (%).

<i>Experimentos</i>	<i>Controle</i>	<i>1,25</i>	<i>2,5</i>	<i>5</i>	<i>10</i>
1	80	79	59	70	18
2	69	20	86	78	62
3	65	31	67	81	61
4	50	88	12	85	78
5	37	-	20	76	87
6	-	-	12	-	71
7	-	-	45	-	-

Tabela 2 Viabilidade de ilhotas pancreáticas (%) nos grupos experimentais

c) Dosagem de Radicais Livres

Os resultados obtidos na dosagem dos radicais livres dos sobrenadante coletado logo após o processo de digestão pancreática, foi analisada entre os grupos.

<i>Experimento</i>	<i>Controle</i>	<i>1,25</i>	<i>2,5</i>	<i>5</i>	<i>10</i>
1	0,1405	0,2113	0,1266	0,4444	0,1636
2	0,1923	0,5892	0,3643	1,9003	0,2833
3	0,2977	0,1947	0,6478	0,1256	1,2444
4	0,5466	0,4288	0,476	0,5281	0,4873
5	0,6952	0,4171	0,4538	0,5426	0,589
6	0,2569	-	0,2189	0,3905	0,3426
7	0,4805	-	0,0978	0,4054	0,2936
8	0,3059	-	0,1789	0,2898	0,2694
9	0,5428	0,5715	0,5277	0,5277	0,4236
10	-	0,4473	0,4877	0,5476	0,2471

Tabela 3 – Mensuração dos radicais livres (nmol/g de proteína) em sobrenadante coletado após etapa de digestão pancreática.

Os resultados obtidos na dosagem dos radicais livres dos sobrenadante coletado logo após o final do processo de isolamento das ilhotas pancreáticas estão apresentados na tabela abaixo.

<i>Experimento</i>	<i>Controle</i>	<i>1,25</i>	<i>2,5</i>	<i>5</i>	<i>10</i>
1	0,2658	0,3016	0,3016	0,3232	0,4298
2	0,3854	0,3306	0,3306	0,4298	0,6334
3	0,2715	0,1234	0,1234	0,4902	0,6221
4	0,4648	0,2643	0,1507	0,1275	0,143
5	0,8116	0,2446	0,2637	0,215	0,153
6	-	-	-	-	0,07552
7	-	-	-	0,4405	0,3083
8	-	-	-	0,1737	-
9	0,2242	0,2574	0,2106	-	0,1081
10	-	0,2527	0,1882	0,1438	0,1373

Tabela 4 - Mensuração dos radicais livres (nmol/g de proteína) em sobrenadante após o final do processo de isolamento das ilhotas pancreáticas

ANEXO 6 – ARTIGO ORIGINAL (VERSÃO PORTUGUÊS)

USO DA FRUTOSE-1,6-BISFOSFATO NO ISOLAMENTO DE ILHOTAS PANCREÁTICAS PARA TRANSPLANTE

Carmen Silvana Araujo de Oliveira^{*}, Patrícia Sesterheim^{*}, Robson Henrich
Amaral^{**}
Luiz Buaes^{**}, Jarbas Rodrigues de Oliveira^{**}, David Saitovitch^{*}

^{*} Laboratório de Nefrologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil

^{**} Laboratório de Pesquisa em Biofísica da Inflamação, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil

Endereço para correspondência:
Carmen Silvana Araujo de Oliveira
Laboratório de Nefrologia, Instituto de Pesquisas Biomédicas
Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
Av. Ipiranga, 6690, 2º andar. Porto Alegre, RS, Brasil. CEP: 90610-000
Tel: (51) 3320-3500 – R: 3340
E-mail: sil_arol@hotmail.com

Resumo

Introdução. O Diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é uma doença multifatorial onde ocorre à destruição auto-imune de células beta. O transplante de ilhotas é um método de reposição dessas células, tendo sucesso quando é realizado o implante de uma massa de ilhotas em nível terapêutico. Entretanto, durante processo de isolamento ocorre uma grande perda dessas. A frutose-1,6-bisfosfato (FBP) é um regulador metabólico com efeito citoprotetor e apresenta uma importante ação sobre a redução da formação e liberação de radicais livres.

Métodos. Realizou-se isolamento de ilhotas em grupo frutose-1,6-bisfosfato nas concentrações de 1,25; 2,5; 5,0 e 10 mM/L. Contagem e viabilidade das ilhotas foram realizadas com ditizona e azul tripan, respectivamente. A Mensuração de radicais livres foi realizada em sobrenadante coletado após digestão pancreática e após a última fase do isolamento.

Resultados. Não foi observado diferença estatística significativa na contagem das ilhotas, assim como na viabilidade, entre os grupos. A média de redução dos radicais livres quando comparada à análise das duas etapas do processo não demonstrou diferença estatística significativa.

Conclusão. Nas doses testadas, a frutose-1,6-bisfosfato não pareceu ter efeito benéfico, seja no número ou na viabilidade das ilhotas. Da mesma forma, não há influência sobre a quantidade de radicais livres produzidos pelas ilhotas isoladas.

Palavras chaves: Diabetes mellitus tipo 1, Isolamento de ilhotas pancreáticas, Frutose-1,6-bisfosfato

Introdução

O Diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é uma doença multifatorial, causada pela destruição das células beta, mediada por processos auto-imunes, culminando com deficiência absoluta de insulina [1,2,3].

O transplante de ilhotas pancreáticas é um método de reposição de células beta, que não exige procedimento cirúrgico. Dados da literatura especializada sugerem que doses menores de imunossupressão possam ser suficientes, permitindo um menor risco infecções oportunistas [4].

Um dos fatores determinantes do sucesso do transplante de ilhotas é a infusão de uma massa de ilhotas em nível terapêutico. O estresse que é gerado durante a captação do pâncreas, o tempo de preservação do órgão e a técnica de isolamento das ilhotas são fatores que podem influenciar na baixa qualidade e quantidade das mesmas [5,6].

Embora existam aproximadamente 1 milhão de ilhotas por pâncreas, a atual preservação do órgão e a técnica de isolamento permitem recuperar menos que a metade deste número [7].

Entre alguns determinantes que culminam com a perda de massa de ilhotas pancreáticas, durante os processos de captação, isolamento e infusão celular, estão o estresse oxidativo, a expressão de citocinas pró-inflamatórias e o próprio trauma físico [8,9].

Métodos recentes têm sugerido o aumento da eficiência do processo de isolamento, com impacto positivo na enxertia e aumento da qualidade da purificação das ilhotas para transplante em pacientes [8,9].

A frutose-1,6-bisfosfato (FBP) é um regulador metabólico que estimula as reações catabólicas da glicólise, melhorando a preservação do tecido frente à isquemia, sendo descritos na literatura diversos efeitos benéficos em eventos patológicos. Sua ação como reguladora parece estar ligada à sua capacidade de estimular a glicose e inibir a gliconeogênese. Além disso, pode também estimular a formação de glicogênio e ao mesmo tempo impedir a sua degradação [10,11,12]. Ainda, a FBP apresenta uma importante ação sobre a redução da formação e liberação de radicais livres, devido à incorporação de substrato energético, levando a um aumento dos níveis de ATP intracelular e prevenção de alterações críticas na função da membrana das células [13]. O presente estudo objetivou testar o emprego da FBP na eficiência do processo de isolamento de ilhotas pancreáticas.

Materiais e Métodos

Foram utilizados 46 camundongos isogênicos da linhagem BALB/c com 8 a 12 semanas de idade. Os animais foram mortos por deslocamento cervical, os pâncreas foram retirados e submersos em uma solução de colagenase tipo IV (0,005g de colagenase em 7,5 mL de HBSS) no grupo controle e colagenase enriquecida com FBP nas doses 1,25; 2,5; 5,0; 10,0 mM/L (completando o volume final de 7,5 mL de solução), para digestão pancreática. Durante o isolamento, utilizou-se Ficoll histopaque de densidade 1.077 (marca registrada de propriedade da GE Healthcare Bio-Sciences). Ditzona e azul de tripan foram utilizados para contagem e viabilidade das ilhotas pancreáticas, respectivamente. A mensuração

dos radicais livres seguiu o método descrito por Esterbauer e Cheeseman [14], sendo realizada em sobrenadante pós-digestão pancreática e pós processo de isolamento. A análise estatística foi realizada com o teste Kruskal-Wallis e os dados demonstrados estão expressos em mediana. Para diferença estatística, o considerou-se um valor de $P < 0,05$.

Resultados

Para mensurar a quantidade de ilhotas pancreáticas obtidas após o isolamento em cada grupo experimental, foi realizada a contagem dessas células com ditizona. Os grupos experimentais com FBP não demonstraram diferença estatística na contagem de ilhotas, quando comparados ao grupo controle e nem entre si ($p=0,529$), conforme gráfico demonstrado na figura 1. A viabilidade celular foi observada com o corante azul tripan, contando-se células mortas (coradas) e células vivas (sem coloração) e foi expressa em porcentagem. Essa análise (figura 2) também não demonstrou diferença estatística ($p=0,228$). Foi realizada a comparação da média de redução dos radicais livres entre os sobrenadantes coletados após a etapa de digestão e após todo as etapas do isolamento. Os valores mensurados após a etapa de digestão e final do processo mensuração de radicais livres (figura 3) não diferiram estatisticamente em nenhum grupo experimental realizado ($n= 0,420$).

Discussão

A terapia com transplante de ilhotas pancreáticas parece ser uma alternativa atraente para a reposição de células β em paciente com DM1 complicado, embora ainda em caráter experimental. Entretanto, o sucesso desse tipo de transplante depende criticamente do implante de uma massa de ilhotas em nível terapêutico, para promover e manter a normoglicemia. Esse fato ainda acaba sendo um limitante para o emprego dessa técnica como uma terapia efetiva e estabelecida de tratamento.

Durante o isolamento, ocorre grande perda dessas células, o que resulta em um baixo rendimento após todo processo e a necessidade de mais de um pâncreas por receptor. Frente à dificuldade global de obtenção de órgãos e a crescente lista de pacientes em espera para transplante, o emprego dessa técnica ainda é limitado.

No decorrer do processo de isolamento das ilhotas, muitos autores citam a ocorrência de perda de cerca de 50% dessas células [15]. Medidas que evitem essa perda durante todas as etapas se fazem necessárias, de forma a otimizar esse processo.

O uso de FBP em ilhotas pancreáticas ainda não havia sido descrito na literatura. A escolha da metodologia de uso dessa substância e as doses a serem estudadas em ilhotas pancreáticas, foram estabelecidas de acordo com trabalhos já publicados anteriormente envolvendo FBP e outras linhagens celulares, como linfócitos [16].

Nesse estudo, o número de ilhotas pancreáticas, quando comparado entre os diferentes grupos experimentais (figura 1), não demonstrou diferença estatística significativa, mas observou-se um número inferior de ilhotas no grupo FBP 1,25mM/ L frente ao grupo controle. Da mesma forma, observou-se um aumento progressivo do número de ilhotas nas demais doses, o qual pode ter uma relação dose-dependente, em relação a citoproteção. É possível que esse aumento se tornasse mais nítido, caso houvesse dados de contagem de ilhotas isoladas com concentrações inferiores a 1,25mM/L e superiores a 10 mM/L.

A formação de um material viscoso, decorrente do uso da colagenase, já bastante mencionado na literatura, pode também interferir na qualidade do isolamento pancreático. Tal formação é exarcebada quando ocorre a diminuição de cálcio do meio [17]. O meio de preservação (HBSS) em que as ilhotas são mantidas durante todo o isolamento apresenta cloreto de cálcio em sua composição (1855 g/L). Porém, diante da ação quelante de cálcio apresentada pela FBP, o seqüestro desse íon pode ter ocorrido no meio de HBSS, podendo explicar o prejuízo sobre a viabilidade das células durante todo o processo de isolamento (figura2).

O grupo controle apresentou uma baixa viabilidade, demonstrando que ocorreram problemas técnicos nos experimentos. Os resultados dos grupos experimentais podem estar refletindo tais problemas, os quais devem ser apurados e retificados para a continuidade dos trabalhos de isolamento de ilhotas. Considera-se um desses problemas às condições dos órgãos utilizados. Embora os animais possuam qualidade genética, os mesmos são criados e mantidos em

ambiente convencional com poucas barreiras sanitárias, o que pode ter interferido na qualidade sanitária dos camundongos.

A média de redução dos radicais livres quando comparadas as duas análises anteriores não demonstrou diferença estatística. Esses dados demonstram que a FBP não é diferente do grupo controle mesmo quando ocorre o aumento da concentração de FBP (figura3).

A escolha da técnica para o uso de FBP foi realizada aleatoriamente, pois não existem trabalhos semelhantes ao realizado.

Outra alternativa para uso da FBP poderia ser a infusão infundida no pâncreas por canulação do ducto pancreático, tanto antes como após a retirada do órgão. Essa forma metodológica de uso da FBP parece ser interessante, pois assim poderia exercer suas propriedades citoprotetora e antioxidantes no processo inicial, evitando que durante a captação do órgão o processo de estresse oxidativo seja deflagrado. Ainda, é necessária também a avaliação do uso da FBP em isolamento seguido de transplante dessas células, pois por apresentar propriedades imunomoduladoras [16], efeitos da FBP podem ser mais visíveis no acompanhamento pós infusão da massa de ilhotas por diminuição de citocinas pró-inflamatórias e promovendo a enxertia.

As doses testadas de FBP foram escolhidas com em um estudo de Nunes et al. [16], realizado em cultura de linfócitos. Isso porque não existiam trabalhos anteriores empregando FBP em ilhotas pancreáticas, optou-se por usar-se as doses desse trabalho. Entretanto, cabe salientar que para ter efeito em ilhotas pancreáticas pode ser necessária doses maiores de FBP. Embora não tenha apresentado significância estatística na contagem celular, o aumento das doses

de FBP aproximou os grupos experimentais do grupo controle. Além disso, a FBP no estudo de Nunes et al, foi mantida em cultura celular, o que prolonga o tempo de exposição das células à droga, fato que não ocorreu com as ilhotas. O tempo de incubação da FBP junto com a solução de colagenase e HBSS pode também ter sido insuficiente (25 minutos), não sendo suficiente para ocorrer à ação. Cabe a necessidade de estudo futuros objetivando o encontro da dose mais apropriada, além de exposição das ilhotas a FBP por um tempo mais longo.

Conclusão

Com base nos resultados encontrados nesse trabalho, a FBP parece não exercer um efeito benéfico sobre a contagem e a viabilidade das ilhotas pancreáticas, quando adicionada à solução de preservação. Além disso, a produção de radicais livres parece não ser afetada por essa terapia.

Estudos futuros deverão explorar diferentes doses de FBP, bem como o tempo de exposição da FBP à droga.

Referências

- [1] American diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus (position statements). Diabetes Care. 2005; 28(suppl1):S37-S42.
- [2] Trucco M. Regeneration of the pancreatic beta cell. J Clin Invest. 2005; 115:5-12.

- [3] Sesterheim P, Saitovitch D, Staub, HL. Diabetes mellitus tipo 1: multifatores que conferem suscetibilidade à patogenia auto-imune. *Scientia Medica*, 2007 v. 17, n. 4, p. 212-217.
- [4] Robertson RP. Islet transplantation as a treatment for diabetes – A work in progress. *N Engl J Med*. 2004; 350:694-705.
- [5] Bottino R, Balamurugan NA, Tse H, Thirunavukarasu C, Ge X, profozich J, et al. Response of human islet to isolation stress and the effect of antioxidant treatment. *Diabetes*. 2004; 53(10): 2559-68.
- [6] Kneteman N, Lakey J, Kizikisik L, Ao Z, Warnock G, Rajotte R. Cadáver pancreas recovery technique: impact on islet recovery and in vitro function. *Transplantation*. 1994; 58:1114-1119.
- [7] Gores PF, Sutherland DE. Pancreatic islet transplnatation: is purification necessary? *Am J Surg*. 1993; 166: 538-42.
- [8] Stevens RB, Matsumoto S, Marsh CL. Is islet transplantation a realistic therapy for the treatment of type 1 diabetes in the near future? *Clinical Diabetes*. 2001; 19: 51-60.
- [9] Bottino R, Balamurugan NA, Tse H, Thirunavukkarasu C, Ge X, profozich J, et al. Response of human islet to isolation stress and the effect of antioxidant treatment. *Diabetes*. 2004; 53(10): 2559-68
- [10] Niu W, Zhang F, Ehringer W, Tseng M, Gray L, Chien S. Enhancemnet of hypothermic heart preservation with fructose 1,6-diphosphate. *J surg Res*. 1999; 85 (1): 120-29.
- [11] Kirtley ME, McKay M. Fructose-1,6-diphosphate: a regulator of metabolism. *Mol Cell Bio Chem* 1977; 8 (2-3):141-149.

- [12] Chlouverakis, C. The lipolytic action of fructose-1,6-diphosphate. *Metabolism* 1968; 17:708-16.
- [13] Gámez A, Alva N, Roig T, Bermúdez J, Carbonell T. Beneficial effects of fructose 1,6-bisphosphate on hypothermia-induced reactive oxygen species injury in rats. *Eur j pharmacol.* 2008; 590 (1-3): 115-19.
- [14] Draper HH; Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990; 186:421-431.
- [15] Gores PF, Sutherland DE. Pancreatic islet transplantation: is purification necessary? *Am J Surg.* 1993;166:538-42.
- [16] Bordignon Nunes F, Meier Graziottin C, Alves filho JC, Lunardelli A, Caberlon E, Peres A, et al. Immunomodulatory effect of fructose-1,6-bisphosphate on T-lymphocytes. *Int immunopharmacol.* 2003; 3 (2): 267-72
- [17] Amoli MM, Moosavizadeh R, Larijani B. Optimizing conditions for rat pancreatic islets isolation. *Cytotechnology.* 2005; 48: 75-78

Figura 1

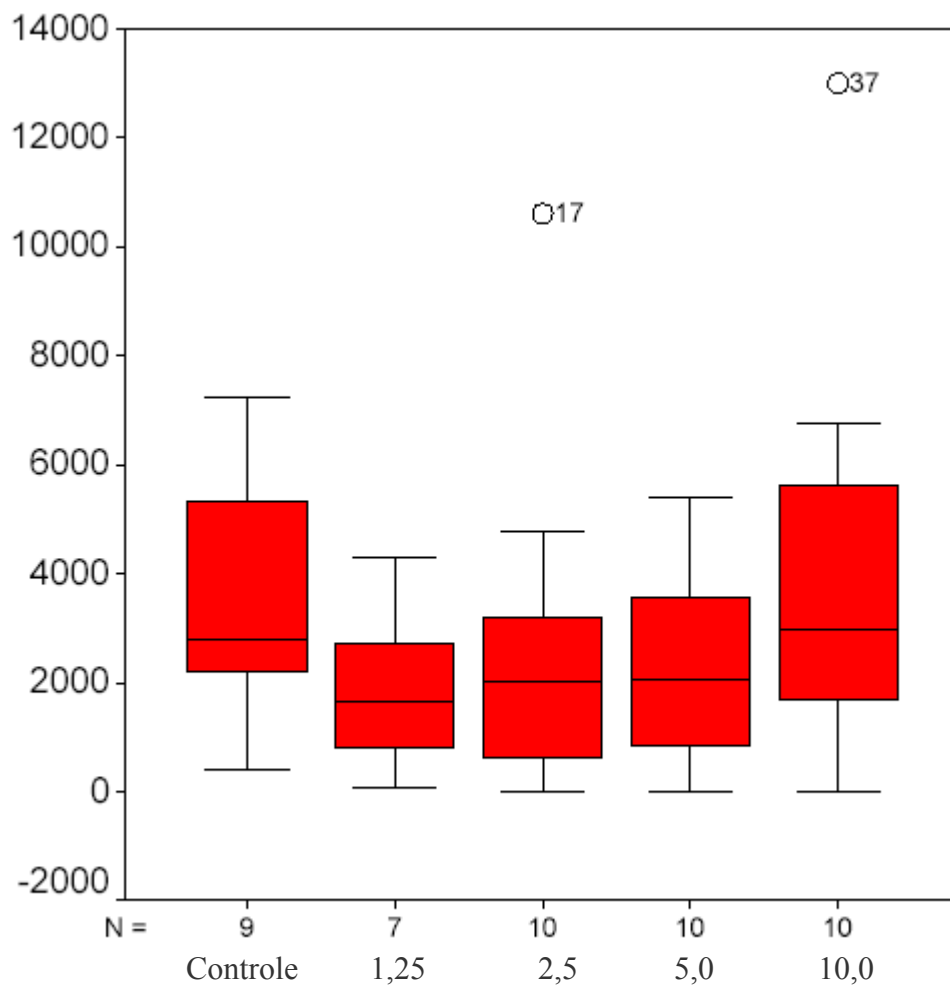


Figura 1 – Gráfico da contagem de ilhotas pancreáticas nos diferentes grupos.

Figura 2

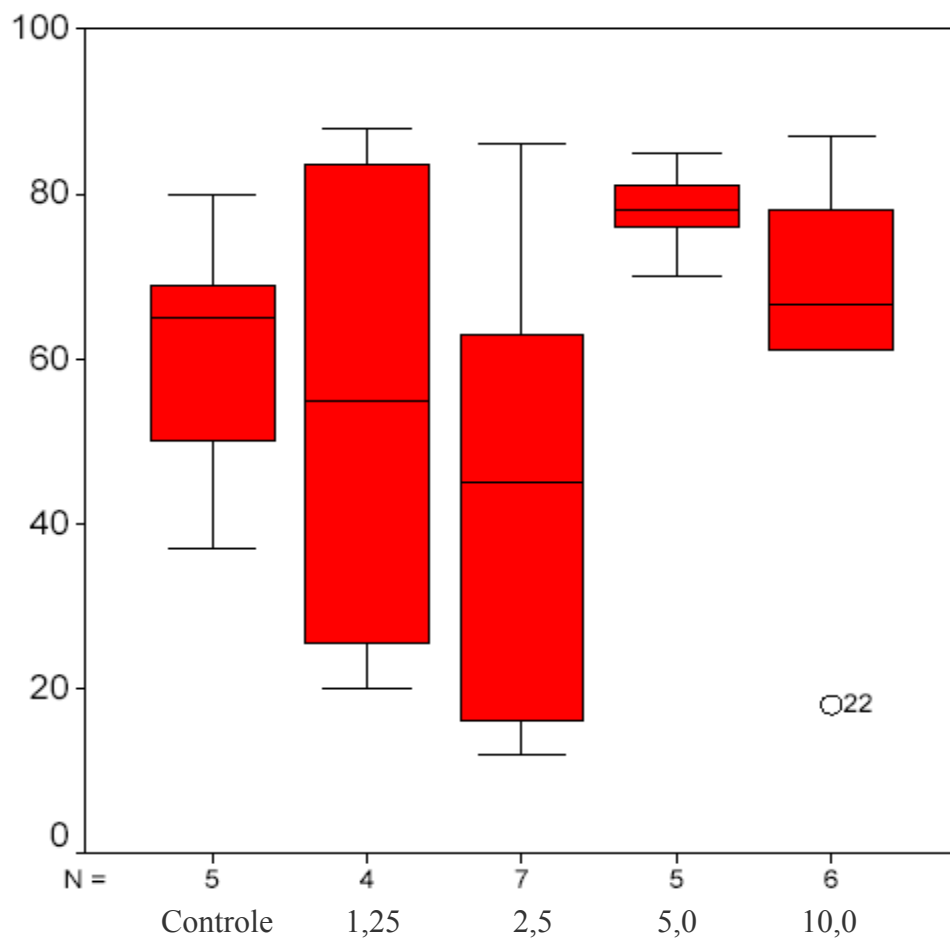


Figura 2 - Gráfico da viabilidade celular (em porcentagem) nos diferentes grupos.

Figura 3

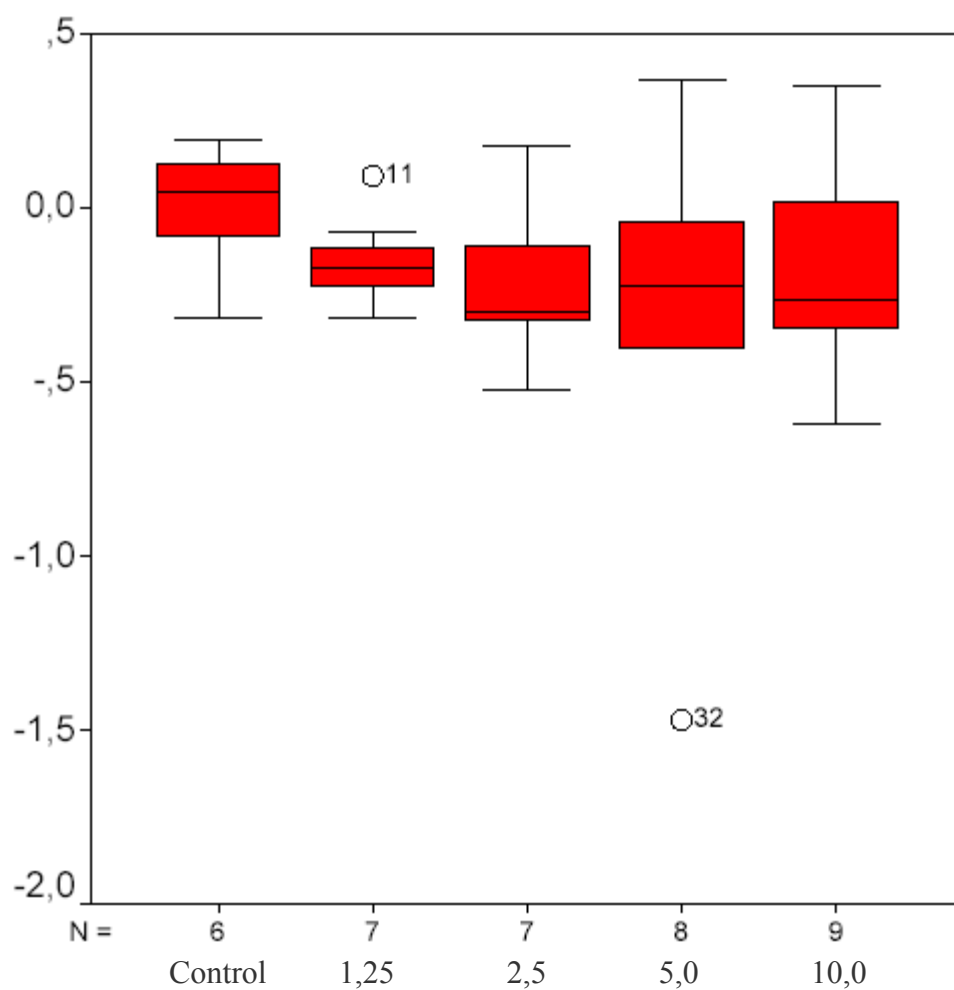


Figura 3 – Gráfico da media de redução de radicais livres quando comparado os valores mensurados após a etapa de digestão e final no final do isolamento