

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

USO DA FRUTOSE-1,6-BISFOSFATO EM ILHOTAS PANCREÁTICAS MANTIDAS
EM CULTURA CELULAR

LUCAS KICH GRUN

PORTO ALEGRE

2012

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, ICBS – UFRGS

USO DA FRUTOSE-1,6-BISFOSFATO EM ILHOTAS PANCREÁTICAS MANTIDAS
EM CULTURA CELULAR

Monografia apresentada à Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito essencial para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dra. Florencia María Barbé-Tuana
Co-orientadora: Dra. Fátima C. Rodrigues Guma

PORTO ALEGRE

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

USO DA FRUTOSE-1,6-BISFOSFATO EM ILHOTAS PANCREÁTICAS MANTIDAS
EM CULTURA CELULAR

LUCAS KICH GRUN

Monografia aprovada em ____/____/____ para obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas.

BANCA EXAMINADORA:

Dra. Florencia María Barbé-Tuana

Dra. Leticia Ferreira Pettenuzzo

Dra. Patrícia Sesterheim

AGRADECIMENTOS

Meus pais que sempre me incentivaram, e estiveram sempre ao meu lado apoiando meus sonhos e lutando junto comigo pra que eles se realizassem.

A minha família que sempre esteve presente durante todo o período da faculdade. Em especial a minha prima Kesiane que é meu exemplo profissional e meu espelho de pessoa.

Aos meus amigos imortais da babilônia que nunca deixaram de sair do meu lado em qualquer circunstância.

Aos amigos que conheci na faculdade, em especial a minha madrinha Valentina, que fizeram a diferença durante todo o curso e que merecem um agradecimento especial.

A todos do Lab 21 da bioquímica, em especial à Silvia – que me ensinou como trabalhar em um laboratório e pelos sábios conselhos – e a Babi – que me ajudou sempre que eu precisei durante todo TCC.

A Universidade pela qualidade de ensino, estrutura na formação acadêmica.

Ao CNPq pelo apoio financeiro durante o período do estágio no departamento de bioquímica.

As professoras Leticia Pettenuzzo e Patrícia Sesterheim por aceitarem o convite para compor minha banca examinadora.

A minha co-orientadora do TCC, professora Fátima por me aceitar e auxiliar durante os 2 anos de estágio no Lab 21, e pelos ensinamentos em bioquímica.

Em especial, agradeço a minha brilhante orientadora, professora Florencia, por aceitar me orientar no meu trabalho de conclusão e por auxiliar a concluir essa importante etapa da minha vida. Muito obrigado professora, tua orientação foi fundamental durante a realização desse projeto.

“Qualquer um que pretenda ter mais que uma compreensão extremamente superficial da vida, em todas suas diversas manifestações, necessita da bioquímica.”

Hans A. Krebs

RESUMO

O diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é uma síndrome autoimune órgão-específica caracterizada pela destruição seletiva de células β nas ilhotas pancreáticas. Dentre as estratégias de tratamento disponíveis estão a insulino-terapia, o transplante de pâncreas, e, ainda em caráter experimental, o transplante de ilhotas pancreáticas. O transplante de ilhotas oferece vantagens por ser um procedimento pouco invasivo. O principal fator envolvido no sucesso do transplante de ilhotas é a necessidade de um número mínimo de ilhotas viáveis e funcionais a ser transplantado. Tentando minimizar a perda associada ao procedimento de isolamento/purificação de ilhotas pancreáticas, uma das estratégias é incubar as ilhotas com diferentes moléculas citoprotetoras. Dentre delas, tem sido demonstrada a ação protetora da frutose-1,6-bisfosfato (FBP) associada a um efeito antiinflamatório, estimulando a glicólise e impedindo a formação de radicais livres. Neste trabalho, nosso objetivo foi avaliar a ação citoprotetora da FBP sobre ilhotas pancreáticas murinas mantidas em cultura celular. Foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6. Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e submetidos à tricotomia e laparotomia abdominal em U. O pâncreas foi distendido com uma solução de collagenase tipo V e posteriormente removido. O tecido digerido foi filtrado e as ilhotas obtidas foram separadas por centrifugação isopícnica em gradiente de ficoll (Cellgro). As células isoladas foram mantidas em cultura por 24h com meio CMRL suplementado com 10% de soro fetal bovino e diferentes concentrações de FBP. A viabilidade foi determinada pela marcação das células com diacetato de fluoresceína (FDA) e iodeto de propídeo (PI). As imagens das ilhotas coradas com FDA/PI foram adquiridas em um Microscópio Confocal FV1000 (Olympus). O percentual de viabilidade foi calculado pela quantificação da área positiva para PI em relação à área total da ilhota, e as diferenças entre os grupos foram determinadas por ANOVA de uma via seguido pelo teste de *post-hoc* de Duncan. A análise estatística demonstrou que a incubação das ilhotas pancreáticas em altas concentrações de FBP (1,25mM; 2,5mM e 5mM) reduz a morte celular das ilhotas pancreáticas quando comparadas ao grupo controle ($P < 0,05$), comprovando a hipótese da ação citoprotetora da FBP. A descoberta de moléculas citoprotetoras que possam aumentar ou preservar as culturas *in vitro* de ilhotas pancreáticas por diferentes períodos é de vital importância no auxílio do transplante dessas células.

ABSTRACT

Diabetes mellitus type 1 (DM1) is an autoimmune syndrome characterized by organ-specific selective destruction of β -cells in the pancreatic islets. Among the strategies available for treatment we found insulinotherapy, pancreas transplantation, and transplantation of pancreatic islets, in experimental. The islet transplantation offers advantages because it is less invasive. The principal factor involved in the success of islet transplantation is the need for a minimum number of viable, functional islets to be transplanted. Trying to minimize the loss associated with the procedure of isolation/purification of pancreatic islets, one of the strategies is incubating the islets with different cytoprotective molecules. It has been verified the protective action of fructose-1,6-bisphosphate (FBP) metabolism associated with an antiinflammatory effect, stimulating glycolysis and preventing the formation of free radicals. In this work, our objective was to evaluate the cytoprotective effect of FBP on murine pancreatic islets maintained in cell culture. We used isogenic lineage C57BL/6. The animals were euthanatized by cervical dislocation and submitted to trichotomy and abdominal laparotomy in U. The pancreas was distended with collagenase type V and subsequently removed. The digested tissue was filtered and the collected islets were separated by isopycnic centrifugation in Ficoll gradient (Cellgro). The isolated cells were maintained in culture for 24h with CMRL supplemented with 10% fetal bovine serum and different FBP concentrations. Viability was determined by staining the cells with fluorescein diacetate (FDA) and propidium iodide (PI). The images of islets stained with FDA / PI were acquired with FV1000 Confocal Microscope (Olympus). The viability was calculated by quantifying the positive PI area in relation to the total area of the islet, and the differences among groups were determined by one-way ANOVA test followed by *post-hoc* Duncan. Statistical analysis showed that incubation of pancreatic islets in high concentrations of FBP (1.25 mM, 2.5 mM, 5 mM) preserves the viability of pancreatic islets compared with the control group ($P < 0.05$), confirming the hypothesis of cytoprotective action of FBP. The discovery of cytoprotective molecules that can enhance or preserve pancreatic islets cultures *in vitro* for different periods is vital in helping the transplantation of these cells.

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
1. INTRODUÇÃO	8
1.1 DIABETES MELLITUS TIPO 1	8
1.1.1 Prevalência no Brasil e no mundo	9
1.1.2 Tratamentos para DM1	10
1.1.2.1 Insulinoterapia	10
1.1.2.2 Transplante de pâncreas	10
1.1.2.3 Ilhotas pancreáticas	11
1.1.2.3.1 Transplante de ilhotas pancreáticas	13
1.1.2.3.2 Viabilidade das ilhotas pancreáticas	14
1.1.2.3.2.1 Efeitos citoprotetores nas ilhotas pancreáticas	15
1.1.2.3.2.1.1 Frutose-1,6-bisfosfato	16
2. JUSTIFICATIVA	18
3. OBJETIVOS	18
3.1 OBJETIVOS GERAIS	18
4. METODOLOGIA	19
4.1 ANIMAIS	19
4.1.1 Cálculo da amostra	19
4.2 ILHOTAS PANCREÁTICAS	20
4.2.1 Isolamento e purificação	20
4.2.1.1 Determinação da densidade de ilhotas pancreáticas isoladas	21
4.2.2 Cultura de ilhotas pancreáticas com FBP	22
4.2.3 Viabilidade celular	22
4.3 AQUISIÇÃO DE IMAGENS	23
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
4.5 ÉTICA	23
4.6 TRATAMENTO DE RESÍDUOS	24
5 RESULTADOS	24
6 DISCUSSÃO	28
7 CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS	32

1. INTRODUÇÃO

1.1 DIABETES MELLITUS TIPO 1

O diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é uma doença autoimune caracterizada pela destruição crônica e seletiva das células β -pancreáticas produtoras de insulina.

O DM1 compreende um grupo clínica e geneticamente heterogêneo de doenças que apresentam, como característica comum, glicemia elevada e distúrbios no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas devido a uma produção ou ação deficiente da insulina no organismo.

Sintomas característicos do DM1 são sede excessiva e micção frequente (poliúria), levando a uma grande ingestão de líquido (polidipsia). Esses sinais devem-se a excreção de grandes quantidades de glicose na urina – fenômeno conhecido como glicosúria (NELSON; COX, 2011). Além disso, a fadiga surge como um fator comum entre os pacientes. Dentre os efeitos secundários mais importantes nos indivíduos com DM1, destacam-se as complicações vasculares, que afetam mais de um terço dos portadores (38%), sendo mais comuns as microangiopatias (95%). Complicações macrovasculares como arteriopatias periféricas também ocorrem, porém em menor escala (CHILLARON *et al.*, 2012). Estudos indicam que a síndrome metabólica é comum, especialmente em pacientes com idade mais avançada, maior índice de massa corporal e pior controle metabólico, podendo estar associada a complicações microvasculares. (CHILLARON *et al.*, 2010)

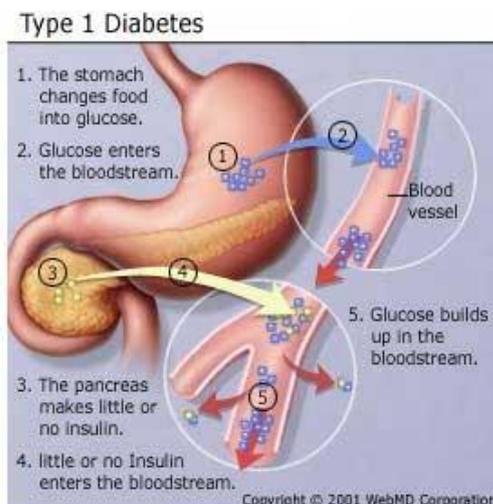


Figura 1. A glicose – principal fonte de energia celular – é armazenada dentro das células e é transportada por difusão facilitada através de proteínas transportadoras dependentes de insulina. Pessoas com DM1 produzem pouca ou nenhuma quantidade de insulina. Dessa forma, a glicose não entra eficientemente nas células, permanecendo em níveis elevados no sangue (NAZARIO, 2005).

1.1.1 Prevalência no Brasil e no mundo

Considerada uma das doenças crônicas mais comuns em quase todos os países, sua prevalência, embora variável entre as regiões, continua aumentando (World Health Organization – WHO, 2012). A alteração de estilo de vida caracterizado pela redução da atividade física e o aumento da obesidade, principalmente na faixa etária das crianças, são fatores de risco que contribuem para o aumento da incidência do DM1.

Em 2011, a Federação Internacional de Diabetes relatou que 371 milhões de portadores de diabetes entre 20 e 79 anos, em escala global. Além disso, estima que em 2030 o número de diabéticos esteja em torno de 552 milhões de pessoas. (International Diabetes Federation – IDF, 2011) Hoje, no Brasil, os números apontam em torno de 13,4 milhões de diabéticos. (International Diabetes Federation – IDF, 2011) Além do mais, um grande número de afetados desconhece o fato de estar doente, bem como os casos de diagnóstico tardio, principalmente em crianças e adolescentes (MALUCELLI, 2012).

No Brasil, o DM1 responde por 10% a 20% da incidência de todos os casos, com incidência anual de 8,4/100.000 habitantes (ANDRADE; ALVES, 2012 *apud* ALVES; SOUZA; CHAVES, 2006). É uma doença que se desenvolve em diversas faixas etárias, sendo mais frequente antes dos 20 anos de idade. A instalação clínica é abrupta.

A incidência de DM1 foi estimada em 40% mais elevada em 2010, em comparação ao ano de 1997. Um estudo realizado em centros europeus indica um aumento na incidência de DM1 a uma taxa de 3% a 4% por ano, com algumas regiões relatando taxas de crescimento ainda mais elevadas (International Diabetes Federation – IDF, 2010). Além disso, o aumento de 6,3% de crianças com DM1 com até 4 anos de idade, suporta a tendência para um início mais precoce da doença (SWITZER *et al*, 2012).

1.1.2 Tratamentos para DM1

Tanto os pacientes com DM1 como os não dependentes de insulina ou tipo 2 (DM2), são vulneráveis às complicações características específicas da doença, que incluem retinopatias, nefropatias, neuropatias e vasculopatias (NATHAN, 1993). Os objetivos principais da terapia para o diabetes são 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.

1.1.2.1 Insulinoterapia

O principal tratamento para corrigir a falta de insulina no organismo é a administração de insulina recombinante. Atualmente prioriza-se o tratamento com insulinas de menor variabilidade, por meio do esquema basal/bolo ou ainda por meio de bombas de infusão contínua de insulina subcutânea, com o objetivo de mimetizar a liberação fisiológica de insulina pelas células β (PIRES; CHACRA, 2007). Embora esse tratamento resulte na diminuição da incidência e na progressão das complicações associadas à doença, ele não representa a cura, uma vez que a ocorrência de episódios hipoglicêmicos graves estão frequentemente vinculados ao excessivo aumento dos níveis de insulina circulante devido ao tratamento (PILEGGI *et al*, 2001). Além disso, em longo prazo, tais complicações podem causar a falência de diversos órgãos.

1.1.2.2 Transplante de pâncreas

Uma alternativa eficiente ao uso contínuo de insulina exógena para o DM1 é a reposição das ilhotas pancreáticas (ilhotas de Langerhans) por meio do transplante vascularizado do pâncreas. Esse melhora a qualidade de vida do paciente e estabiliza, reverte ou melhora as complicações secundárias decorrentes do diabetes (PEARCE *et al*, 2000). Representa uma terapia eficiente capaz de determinar um estado normoglicêmico constante em pacientes com DM1. Sua indicação é

geralmente integrada ao transplante renal de forma simultânea, devido à nefropatias associadas ao DM1. O transplante de pâncreas após rim constitui outra forma de tratamento, e é realizado quando o paciente previamente submetido ao transplante renal, está sob uso de drogas imunossupressoras. Finalmente, o transplante de pâncreas isolado é uma alternativa para portadores de DM1 com função renal preservada ou para pacientes instáveis devido a variações repetidas na taxa de glicemia corporal, habituados a terapia intensiva com insulina (PEROSA *et al*, 1999). Recentemente Maffi *et al* demonstraram em seu estudo que um ano após o transplante de pâncreas isolado, 75% dos pacientes alcançaram a independência de insulina, utilizando um tratamento com imunossupressores (MAFFI *et al*, 2011). Dessa forma, os autores sugerem que o transplante de pâncreas isolado torna-se uma importante alternativa para pacientes que apresentam uma rápida progressão do quadro crônico do diabetes, uma vez que a massa e a função das células β é rapidamente reestabelecida.

Porém há um preço a ser pago. Drogas imunossupressoras devem ser empregadas de forma contínua para evitar a rejeição do enxerto, o que aumenta os riscos associados ao surgimento de infecções causadas por microorganismos oportunistas e diferentes formas de cânceres. Por tal motivo, a realização do transplante pancreático nas fases iniciais do diabetes, a título de profilaxia das complicações secundárias, é geralmente contraindicado. Além disso, a taxa de mortalidade geral dos pacientes submetidos a transplante pancreáticos é de cerca de 7% após 3 anos de alta hospitalar (DE OLIVEIRA *et al*, 2009 *apud* ROBERTSON *et al*, 2000).

1.1.2.3 Ilhotas pancreáticas

O pâncreas é uma glândula mista capaz de produzir enzimas digestivas e hormônios. As enzimas são armazenadas e secretadas por meio do arranjo em ácinos. Já os hormônios são sintetizados em grupamentos de células epiteliais denominadas ilhotas pancreáticas (de Langerhans). As ilhotas de Langerhans são microórgãos endócrinos com tamanho heterogêneo entre 50-500 μ m. Estima-se que a população de ilhotas no pâncreas humano ultrapasse 1 milhão, representando de

1 a 2% da massa celular total do pâncreas, onde a população distribui-se de forma assimétrica, concentrando um maior número de células na cauda pancreática.

As ilhotas são constituídas por células poligonais dispostas em cordões cercadas por uma rede de capilares com células endoteliais fenestradas. Os tipos celulares encontrados nas ilhotas de Langerhans apresentam-se em quantidades assimétricas. Em camundongos, as células α , produtoras de glucagon, localizam-se principalmente na periferia das ilhotas, e sua população representa em torno de 20% das células da ilhota. As células β , produtoras de insulina, representam o tipo celular mais abundante (em torno de 70%) e localizam-se preferencialmente na região central da ilhota. As células δ , produtoras de somatostatina e as células PP representam menos de 5% da população da ilhota (CABRERA *et al*, 2006).

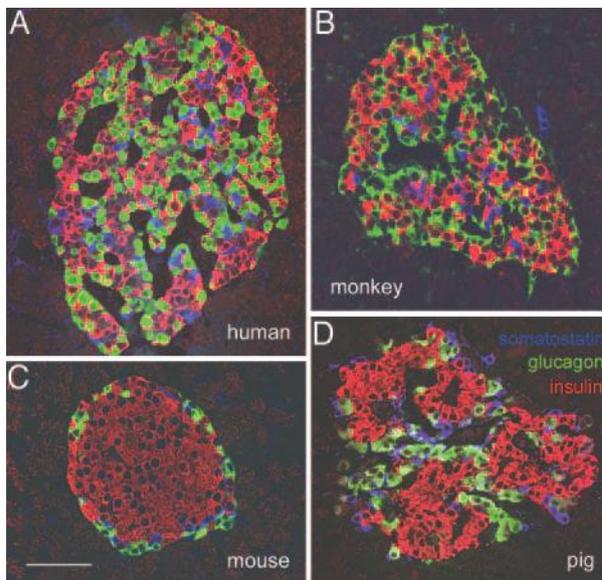


Figura 2. Micrografia confocal ilustrando a diferença do fenótipo na composição das ilhotas de Langerhans de diferentes espécies (A-D). Secções de células pancreáticas coradas, contendo ilhotas de Langerhans. (A) humano; (B) macaco; (C) rato; (D) porco. A figura demonstra regiões coradas em vermelho (insulina), coradas em verde (glucagon), coradas em azul (somatostatina). Escala: 50 μ m (CABRERA *et al*, 2006).

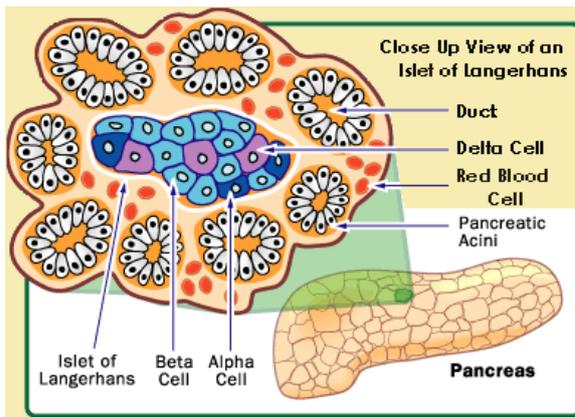


Figura 3. Esquema demonstrando a estrutura e localização de uma ilhota de Langerhans no pâncreas humano. Identifica-se a presença de ácinos pancreáticos, caracterizando a porção exócrina do órgão. No centro da região destacada observa-se a presença de uma ilhota pancreática e sua população de células distribuídas de forma assimétrica (FREUDENRICH, 2001).

1.1.2.3.1 Transplante de ilhotas pancreáticas

Alguns centros transplantadores têm iniciado uma nova era de transplante clínico em humanos, transplantando agora somente as ilhotas pancreáticas. Esta opção terapêutica para pacientes portadores de DM1 é indicado em casos extremos onde não existe um controle glicêmico adequado (15% da população de pacientes com DM1) (SHAPIRO, 2011) e propõe agora o isolamento e posterior transplante das ilhotas pancreáticas no receptor. Este tem a vantagem de ser um procedimento mais simples, rápido e minimamente invasivo, onde as ilhotas pancreáticas são infundidas via percutânea pela veia porta ao fígado. Além disso, o procedimento permite – se necessário – a manipulação das ilhotas antes de ser realizado o transplante, além de requerer uma dose menor de drogas imunossupressoras.

Nos últimos 10 anos têm sido realizados mais de 750 transplantes em mais de 30 centros ao redor do mundo. Contudo o procedimento ainda é considerado experimental pela *Food and Drug Administration*, pois não existe um teste padrão, que identifique de forma rápida e simples, um ensaio de potencialidade ou funcionalidade preditivo confiável a fim de determinar quais ilhotas terão sucesso no enxerto.

Assim, a variabilidade de doadores, tamanho, idade e gênero, além dos procedimentos de isolamento e preservação do pâncreas, são as causas mais importantes associadas à perda da biomassa de células obtidas nos isolamentos de ilhotas pancreáticas humanas. Por tais motivos, há a necessidade da infusão

sequencial de ilhotas isoladas de diferentes pacientes (de 1 a 4 infusões), uma vez que em um único isolamento, dificilmente obtém-se o número ideal de células a serem transplantadas (HERING *et al*, 2005).

Não obstante, a variabilidade associada aos processos de isolamento e a experiência na prática clínica do transplante surge como um fator que afeta e, por conseguinte diminui o rendimento do isolamento. Kim *et al* obtiveram, em seu estudo, um maior rendimento de ilhotas de Langherans provenientes de doadores do sexo masculino, resultado também observado em outros trabalhos. (KIM *et al*, 2005). Ihm *et al* sugeriram em seu trabalho que a regulação de secreção de insulina pela glicose se deteriora com a idade avançada, e o consequente envelhecimento das células β . Além disso, os resultados do estudo indicaram que as preparações de ilhotas de doadores mais jovens podem melhorar a taxa de sucesso do transplante. Sendo assim, quanto mais avançada é a idade do doador, maior a massa de ilhotas necessária para restaurar a independência da insulina pós-transplante. (IHM *et al*, 2006).

1.1.2.3.2 Viabilidade das ilhotas pancreáticas

As ilhotas pancreáticas são extremamente vulneráveis a mudanças no seu microambiente. Sua viabilidade é altamente afetada durante o processo enzimático/mecânico de isolamento. Mais ainda, elas podem ser destruídas após o transplante por eventos inflamatórios não específicos, majoritariamente mediados por células do sistema imune do receptor. O quadro inflamatório, além de afetar a funcionalidade das ilhotas transplantadas, pode ainda reduzir drasticamente a massa de ilhotas funcionais implantadas no receptor (PILEGGI *et al*, 2001). Citocinas próinflamatórias, incluindo IL-1 β , IFN- γ e TNF α – classificadas como importantes efetores solúveis da disfunção do enxerto após o transplante de ilhotas, são produzidas por células inflamatórias infiltrantes. A secreção de tais citocinas depende, em parte, da ativação intracelular do fator nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) e consequentemente estimulam a produção de óxido nítrico (NO) por parte das células β . O complexo formado pela citocina e o respectivo receptor regula positivamente a produção de radicais livres dependentes de NF- $\kappa\beta$. Por sua vez, os radicais livres possuem efeitos nocivos nas ilhotas pancreáticas, pois inibem a liberação de

insulina estimulada por glicose e estimula apoptose (BAKER *et al*, 2003). Outras moléculas próinflamatórias induzidas, como receptores semelhantes à Toll e lipopolissacarídeo, proteína quimioatraente de macrófagos-1 (MCP-1) e proteína induzida por interferon (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).

1.1.2.3.2.1 Efeitos citoprotetores nas ilhotas pancreáticas

Inibir a expressão e a atividade das citocinas próinflamatórias envolvidas na resposta ao transplante assim como a atividade dos macrófagos recrutados ao local da inflamação podem contribuir para a melhora da função das ilhotas transplantadas. Dessa forma, preservar a viabilidade celular das ilhotas pancreáticas prévia ao transplante, reduzir a apoptose, minimizar a inflamação no local de transplante após o enxerto, são estratégias fundamentais para ajudar a prolongar a independência da insulina.

Nesse sentido Cornu e Thorens descreveram um mecanismo regulado pelo hormônio glicoincretino (GLP-1), que aumenta a expressão e a sinalização do receptor de fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1R). Assim é capaz de se ligar a receptores específicos acoplados a proteína G (ativação via cAMP/PKA), protegendo as células β produtoras de insulina contra a apoptose induzida por citocinas ou glicolipotoxicidade (CORNU; THORENS, 2009).

Já Yamamoto *et al* observaram em um estudo que a cultura de ilhotas pancreáticas suplementada com prolactina recombinante por 48h garantiu a viabilidade de células β *in vitro* e *in vivo* (YAMAMOTO *et al*, 2008). Por outro lado Zhang *et al* demonstraram em um estudo a evidência de que o Kaempferol, um flavonoide presente em algumas bagas comestíveis, pode proteger e inibir a apoptose induzida por palmitato em células β pancreáticas. Esse flavonoide modula a expressão do fator de transcrição PDX-1 e restaura as variáveis associadas com a sobrevivência de células β , incluindo a sinalização de cAMP e a expressão de proteínas antiapoptóticas, inibindo a atividade da caspase-3. (ZHANG *et al*, 2012).

Além disso, alguns estudos ainda sugerem outras moléculas com ação citoprotetora nas ilhotas pancreáticas. Lv *et al* sugerem que a gugalsterona, esteroide isolado da resina de uma planta usado em doenças como artrite e obesidade, previne a indução de citocinas inflamatórias, produção de NO e ativação de NF- κ β , sugerindo que essa molécula poderia preservar a massa funcional de células β (LV *et al*, 2008). Por outro lado, Su *et al* também indicam as propriedades citoprotetoras da Angiopietina-1 (proteína de importante papel no desenvolvimento vascular) em ilhotas já transplantadas, devido suas ações antiapoptóticas e pró-angiogênicas, podendo promover a revascularização do tecido transplantado. (SU *et al*, 2007).

Também tem sido demonstrado que células tronco mesenquimais humanas (MSCs) podem secretar fatores de crescimento que melhoram a sobrevivência dos tecidos, e ainda estimular a angiogênese do tecido transplantado. Estudos *in vitro* indicam que o cotransplante de ilhotas com as MSCs pode controlar a inflamação do enxerto, impedindo a apoptose das células β produtoras de insulina. A avaliação dos fatores secretados a partir de MSCs demonstrou que o fator de crescimento de hepatócitos e a atividade de certas metaloproteases de matriz (HGF, MMP-2 e MMP-9, respectivamente) são possíveis fatores secretados que medeiam a citoproteção (PHINNEY; PROCKOP, 2007).

1.1.2.3.2.1.1 Frutose-1,6-bisfosfato

A frutose-1,6-bisfosfato (FBP) é um açúcar bifosforilado, que apresenta duas estruturas anoméricas denominadas α e β furanose. É um intermediário endógeno que estimula as reações catabólicas da via da glicólise, sendo capaz de preservar o tecido frente à isquemia em órgãos como coração, fígado e rins. (DE OLIVEIRA *et al*, 2009 *apud* HERRERO *et al*, 1995).

Além disso, a FBP apresenta um importante papel antiinflamatório, podendo ser utilizada no tratamento em uma ampla gama de patologias.

De Fraga *et al* demonstraram em seu estudo que a FBP, utilizada como suplemento no líquido de reperfusão, é capaz de proteger o fígado durante a isquemia, sugerindo um efeito protetor na preservação do órgão (DE FRAGA *et al*, 2011).

Também foram realizados estudos *in vitro* e *ex vivo*, identificando potentes ações protetoras da FBP na inibição da agregação de plaquetas. De Oliveira *et al* demonstraram em seu estudo que a FBP pode ser um importante mecanismo protetor no tratamento contra a sepse, devido suas propriedades na alteração da coagulação sanguínea (DE OLIVEIRA *et al*, 2010). Em outro estudo, Santos *et al* demonstraram prevenção, promovida pela administração de FBP, na queda do número de plaquetas durante a infecção de *C. albicans* na corrente sanguínea. Os autores sugeriram que a resposta protetora de FBP foi devido à inibição da agregação das plaquetas, e não através de ação antimicrobiana (SANTOS *et al*, 2012).

Já Wu *et al* demonstraram que a administração oral de FBP em ratos durante um período de 10 dias, antes e após o transplante de células da mucosa intestinal, diminuiu a atividade apoptótica e ainda aumentou a taxa de proliferação celular. Sugere-se que além da prevenção da depleção de ATP, ocorra a ativação das enzimas piruvato-quinase e fosfofrutoquinase-1 (pFK-1) em situações de estresse, promovendo assim, o metabolismo dos carboidratos. Além disso, a FBP parece ser quelante de cálcio extracelular, estabilizando assim a membrana plasmática. (WU *et al*, 2003).

A formação de espécies reativas do oxigênio (EROs) na perfusão pós-isquêmica ou por substâncias tóxicas é um mecanismo importante no desenvolvimento de lesão celular. Estudos demonstram que a utilização de superóxido dismutase e vitamina E tem apresentado êxito clínico no combate as lesões mediadas por radicais livres. Entre os mecanismos propostos para a ação das EROs na lesão celular, está o fato que o ATP possa ser o regulador fisiológico da atividade catalítica da enzima NADP oxidase, responsável pela produção de radicais superóxidos. O mecanismo de ação da FBP sobre a formação desses radicais pode se dever a um aumento nos níveis de ATP intracelular, provocando a inibição da produção desses radicais. Estudos ainda demonstram que a FBP também é capaz de impedir o metabolismo oxidativo de neutrófilos e inibir a liberação de histamina por mastócitos, contribuindo para a evidência de seu efeito antiinflamatório (NUNES, 2003).

Finalmente, Nunes *et al* demonstraram que em culturas de linfócitos suplementadas com concentrações de FBP entre 1,2 mM e 10 mM, há a diminuição

dos níveis do receptor de interleucina solúvel, sugerindo assim um possível efeito imunomodulador da FBP (NUNES *et al*, 2004).

2. JUSTIFICATIVA

Além de representar relevância socioeconômica, o DM1 é uma importante doença crônica infantil. Anualmente, milhares de pessoas são afetadas pela doença na atualidade.

Contudo, a experiência recolhida até hoje tem demonstrado que para atingir a insulinoindpendência, é necessário transplantar um número suficiente de ilhotas, superior a 10.000 IEQ/kg do receptor (equivalentes de ilhotas/quilograma) para normalizar o metabolismo de carboidratos sem a necessidade de administração de insulina exógena.

A FBP já demonstrou algumas ações importantes em diversas patologias, tendo ação citoprotetora e antiinflamatória. Além disso, apresenta um papel importante na diminuição da formação e liberação de radicais livres, atuando como uma molécula antioxidante.

Devido a essas características, a FBP poderia preservar e diminuir o estresse oxidativo das ilhotas mantidas em cultura, reduzindo assim a mortalidade dessas células.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Diante desta grande limitação do transplante de ilhotas pancreáticas, esse projeto teve como objetivo principal avaliar a ação citoprotetora da frutose-1,6-bisfosfato sobre as ilhotas pancreáticas murinas mantidas em cultura celular.

4. METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos isogênicos da linhagem C57BL/6 provenientes de biotério convencional da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) de idade entre 10 a 12 semanas de vida. Durante a fase experimental, os animais permaneceram no Alojamento Transitório para Animais do biotério convencional do Departamento de Bioquímica da UFRGS. Os animais foram mantidos com água e ração *ad libitum*, a temperatura de 25°C e fotoperíodo 12h/12h (claro/escuro).

4.1.1 Cálculo da amostra

O rendimento do processo de purificação das ilhotas é extremamente baixo (purificação menor a 10% do total das ilhotas pancreáticas presentes no pâncreas) com alta variabilidade (ao redor de 30%), purificando-se em torno de 250 ± 100 IEQ/camundongo. Escolhemos realizar uma curva de dose resposta, utilizando as concentrações de FBP de 0mM, 0,312mM, 0,625mM, 1,25mM, 2,5mM e 5mM, durante 24h. Em cada poço colocamos 100 IEQ/poço (em triplicata). Calculamos que, para o tempo estipulado de 24h, precisaríamos no total de 3 camundongos. Tivemos um total de 6 grupos (6 concentrações x 1 tempo de 24h). Para determinar as diferenças na viabilidade celular dependentes de FBP através da marcação com FDA/PI, com poder de 80%, diferença entre os grupos de 40% e desvio de 15%, utilizamos 3 camundongos por grupo (Programa Minitab®-16 (EUA), com poder real de 82%). Sendo assim, o número de animais necessários para realizar a cultura de ilhotas pancreáticas suplementada com FBP – num total de 6 grupos – foi = $3 (n) \times 6$ (grupos) = 18 camundongos.

4.2 ILHOTAS PANCREÁTICAS

4.2.1 Isolamento e purificação

Após a eutanásia por deslocamento cervical dos animais isogênicos (doadores saudáveis), foi realizada a tricotomia e a laparotomia abdominal em “U” com exposição do fígado e da vesícula biliar. O ducto biliar comum foi canulado com agulha 30G e 4 mL da solução de colagenase tipo V (0,3mg/mL, Sigma EUA) foram infundidos (figura 4). O pâncreas distendido (figura 5) foi removido do animal e incubado em banho de água a 37°C por no máximo 10 minutos. Uma vez digerido o tecido, a ação da enzima foi inibida por dois métodos, mediante a adição de meio de cultura RPMI 1640 (Gibco, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Gibco, EUA) e também pelo resfriamento do extrato de tecido a 4°C. O tecido digerido foi aspirado com seringa com agulha 14G, centrifugado e passado através de peneira de 450µm. A suspensão celular foi novamente centrifugada e finalmente as ilhotas pancreáticas foram separadas por centrifugação isopícnica utilizando diferentes gradientes de polissacarose. Utilizamos soluções de diferentes densidades 1,110; 1,096; 1,069 e 1,037g/ml (CellGro, EUA). Separamos as ilhotas pancreáticas presentes na interfase 1,096/1,069, ressuspendemos o *pellet* em Ficoll 1,132 g/mL e purificamos novamente a nuvem celular separada na interfase Ficoll/HBSS (figura 6). Essas ilhotas foram utilizadas nos experimentos.

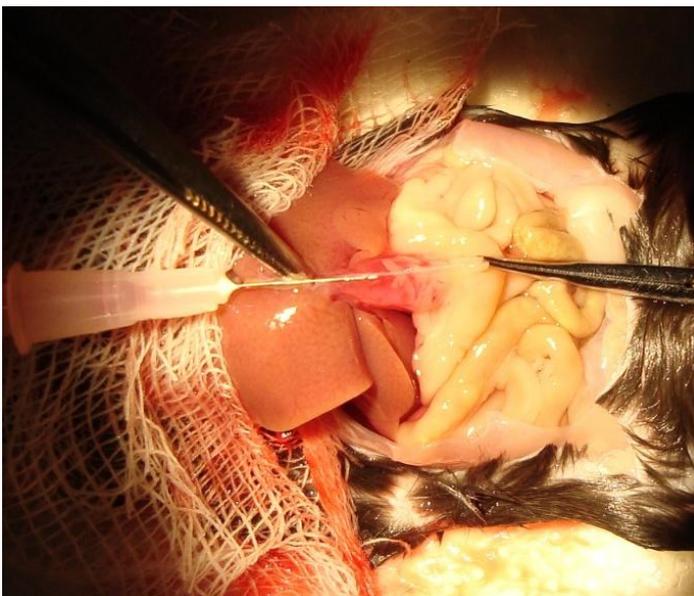


Figura 4. Infusão de colagenase tipo V no ducto biliar após sua canulação, a fim de distender o pâncreas do animal. Aumento 5x.



Figura 5. Grau de distensão do pâncreas observado após a ação da enzima colagenase tipo V. Aumento original.

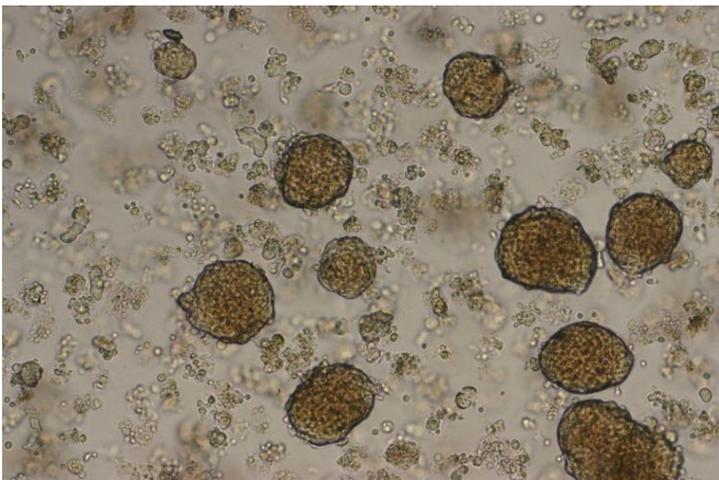


Figura 6. Ilhotas pancreáticas obtidas após a digestão do pâncreas observada em microscópio de fase. O tamanho das ilhotas de Langerhans varia em torno de 50-500 μ m. Aumento original de 400x.

4.2.1.1 Determinação da densidade de ilhotas pancreáticas isoladas

A quantificação do número total de ilhotas isoladas/purificadas é fundamental, uma vez que a contagem das células determina a dose a ser transplantada no receptor (PAPAS; SUSZYNSKI; COLTON, 2010). O método utilizado em nosso trabalho foi a contagem manual visual de IEQ em um microscópio de luz com a coloração com ditizona (DTZ). A DTZ é um corante que se liga às moléculas de zinco nos grânulos de secreção de insulina. Dessa forma é possível a visualização e diferenciação das ilhotas de Langerhans, que adquirem cor avermelhada.

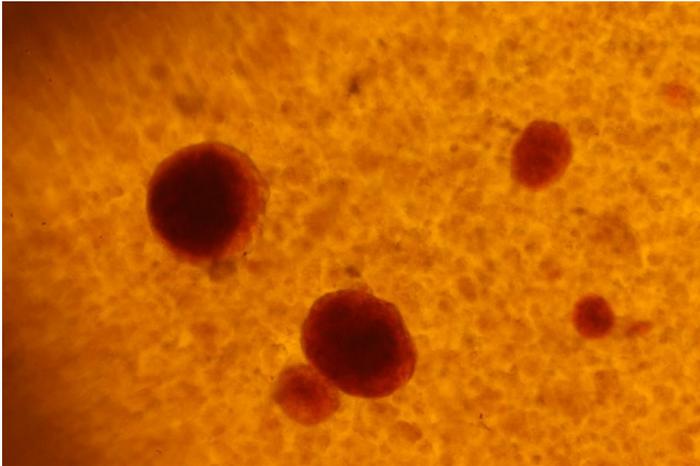


Figura 7. Ilhotas pancreáticas coradas com Ditzona após o processo de purificação, observada em microscópio de fase. Aumento de 400x.

4.2.2 Cultura de ilhotas pancreáticas com FBP

Após o isolamento, as ilhotas foram cultivadas em placas de 24 poços (BD bioscience, USA) em meio de cultura CMRL 1066 (Invitrogen, USA) suplementados com 10% de soro fetal bovino. Para ser definida a concentração máxima eficaz de FBP que não apresentava toxicidade nem perda de função das ilhotas, foram realizados ensaios de viabilidade através da curva dose-resposta. As ilhotas pancreáticas (100 IEQ/poço) foram suplementadas com diferentes concentrações de FBP (0,312mM, 0,625mM, 1,25mM, 2,5mM e 5mM), dependendo do grupo experimental. As ilhotas pancreáticas foram incubadas em estufa umidificada com 5% de CO₂ a 37°C por 24 horas.

4.2.3 Viabilidade celular

A detecção da viabilidade foi realizada pela marcação das células com diacetato de fluoresceína (FDA) e iodeto de propídeo (PI). Prévia à aquisição das imagens, as células foram incubadas com FDA 10 µM e PI 0.1µg/mL. A leitura foi realizada a temperatura ambiente, entre 10 e 60 minutos após a coloração. Para estimar a viabilidade celular foi realizada a contagem e o cálculo do percentual da área marcada em vermelho (positiva para PI) em relação à área total da ilhota com o

programa de computação ImageJ (versão 1.46r). A concentração não tóxica no tempo escolhido foi utilizada como referência para os ensaios de funcionalidade.

4.3 AQUISIÇÃO DE IMAGENS

As imagens das ilhotas coradas com FDA/PI flutuando livremente foram adquiridas em um Microscópio Confocal FV1000 (Olympus, Alemanha). A fluorescência verde foi observada sob a excitação do filtro FITC (excitação BP465-495, DM505, emissão BP515-555) e a fluorescência vermelha sob a excitação do filtro de rodamina (excitação BP528-553, DM565, emissão 590LP).

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para comparar as taxas de viabilidade celular por FDA/PI, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via com localização das diferenças pelo teste de post-hoc de Duncan. Além disso, realizamos a análise de regressão linear a fim de relacionar os tratamentos com as diferentes doses de FBP e a viabilidade celular das ilhotas pancreáticas.

4.5 ÉTICA

Todos os estudos deste projeto foram realizados sob normas de ética para pesquisa em modelos animais (SBCAL. Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório. Disponível em: <<http://www.cobea.org.br>> Acesso em: 24 jun. 2012. e COBEA. Manual para técnicos em bioterismo. São Paulo: Winner, 1996:3. Rio Grande do Sul. Lei 11.915, de 21 de maio de 2003. Código Estadual de Proteção aos Animais. Constituição do Estado, art.82 inc IV, 29 mai. 2003). Este projeto é parte do projeto nº 20472 aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS.

4.6 TRATAMENTO DE RESÍDUOS

A carcaça dos animais foi congelada a -20°C até o recolhimento, que foi realizado pela empresa Aborgama do Brasil, mediante convênio estabelecido entre a empresa e a UFRGS. Luvas e demais materiais que continham resíduos biológicos, bem como materiais perfurocortantes, foram devidamente separados, embalados, identificados e recolhidos pela empresa Aborgama do Brasil, mediante convênio firmado entre a empresa e a UFRGS. O descarte dos reagentes químicos foi realizado no Departamento de Bioquímica e recolhido pelo Departamento de Química para inativação e destino apropriado.

5 RESULTADOS

Para a determinação do percentual de morte celular das ilhotas coradas com FDA/PI, desenhamos uma região de interesse (ROI) nas imagens obtidas das ilhotas pancreáticas a fim de padronizar um sistema de contagem de áreas marcadas em vermelho, indicando morte celular. A partir da ROI estabelecida e definida como uma área, realizamos a quantificação do número de áreas – de cada tratamento – com o programa ImageJ.

As análises das imagens das ilhotas coradas com FDA/PI sugerem uma diminuição da morte celular quando incubadas com altas doses de FBP (figura 9). As áreas marcadas em vermelho (positivas para PI) indicam morte celular. As áreas verdes (positivas para FDA) indicam células vivas.

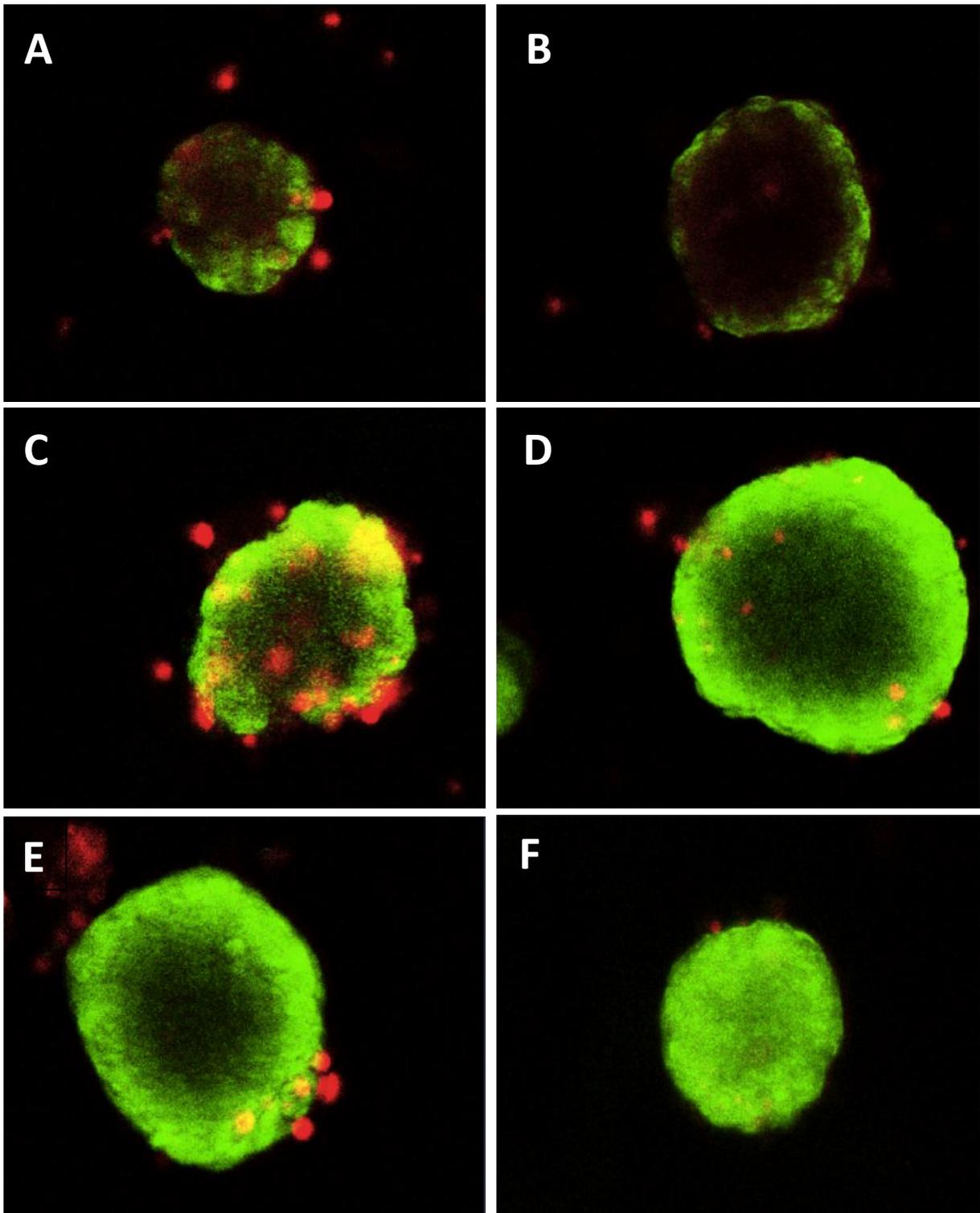


Figura 8. Ilhotas pancreáticas mantidas em cultura em diferentes concentrações de FBP marcadas com FDA/PI. **A)** controle; **B)** 0,312mM de FBP; **C)** 0,625mM de FBP; **D)** 1,25mM de FBP; **E)** 2,5mM de FBP; **F)** 5mM de FBP. Aumento original 400x. As imagens foram adquiridas em um Microscópio Confocal FV1000 (Olympus, Alemanha).

As figuras 9A (controle) e 9B (ilhotas incubadas com 0,312mM de FBP) apresentaram grande parte de sua área marcada em vermelho (positivas para PI), indicando um grande número de células mortas após 24h em cultura. Já os tratamentos com concentrações maiores de FBP (1,25mM; 2,5mM; 5mM) mostrados na figura 9D-F demonstram uma diminuição significativa das regiões marcadas em vermelho e, por conseguinte, de morte celular.

A tabela 1 mostra a quantificação da área total das ilhotas marcadas com PI. O tratamento das células incubadas com 5mM de FBP mantidas em cultura por 24h demonstrou a menor porcentagem (média = 4,00%) de área vermelha – células marcadas com PI –, indicando a diminuição da morte celular nas ilhotas pancreáticas. O grupo controle (média = 45,39%) e o tratamento das células incubadas com 0,312mM de FBP (média = 47,06%) indicaram a menor proteção celular dentre os tratamentos observados, uma vez que apresentaram grande parte da área da ilhota marcada em vermelho, positiva para PI.

Tabela 1. Contagem (ROI) e porcentagem da área das ilhotas pancreáticas marcadas com PI nas diferentes incubações com FBP mantidas em cultura por 24h.

Tratamentos (mM)	Área total marcada com PI		
	Área (pixels), Média	Área (%), Média ± DP	Contagem de áreas (ROI), Média ± DP
0,000	39798	45,39 ± 10,71	25 ± 4,77
0,312	45583	47,06 ± 2,36	23 ± 0,58
0,625	29449	27,24 ± 5,82	16 ± 6,51
1,250	14226	13,45 ± 6,36	7 ± 3,11
2,500	12195	11,85 ± 10,6	8 ± 6,51
5,000	2445	4,0 ± 1,24	2 ± 1,22

A análise de variância de uma via demonstrou diferença significativa ($P < 0,0001$) entre os diferentes tratamentos com FBP. A análise estatística ainda evidenciou uma diminuição significativa ($P < 0,05$) da morte celular das ilhotas pancreáticas quando incubadas com altas doses de FBP e mantidas em cultura por 24h (figura 10). Os tratamentos com 1,25mM; 2,5mM; 5mM apresentaram diminuição significativa na porcentagem de células mortas após a incubação de FBP por 24h, quando comparadas ao grupo controle (teste *post-hoc* de Duncan).

Realizamos uma análise de regressão linear a fim de estimar a relação entre os tratamentos das ilhotas incubadas com FBP e a contagem das áreas positivas para PI, indicando morte celular. Os tratamentos com FBP mostraram-se

inversamente proporcionais à incidência de morte celular nas ilhotas. A análise estatística evidenciou que a dose máxima no tratamento com FBP esteve significativamente relacionada com a diminuição de áreas positivas para PI nas ilhotas pancreáticas ($P < 0,05$).

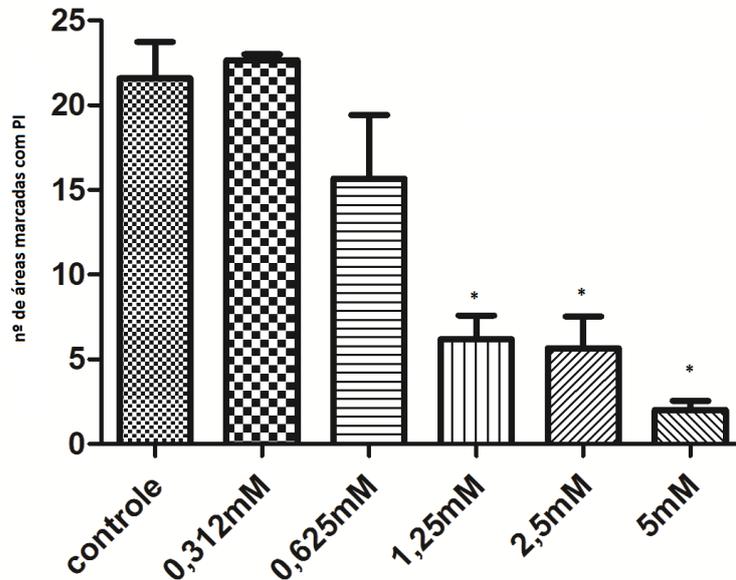


Figura 9. Análise da morte celular das ilhotas pancreáticas incubadas em diferentes concentrações de FBP. A incubação com altas doses de FBP por 24h aumentou significativamente a viabilidade das ilhotas pancreáticas. (ANOVA de uma via, seguida pelo teste de *post-hoc* de Duncan ($P < 0,05$)). (*) indicam diferenças estatísticas significantes em comparação ao grupo controle.

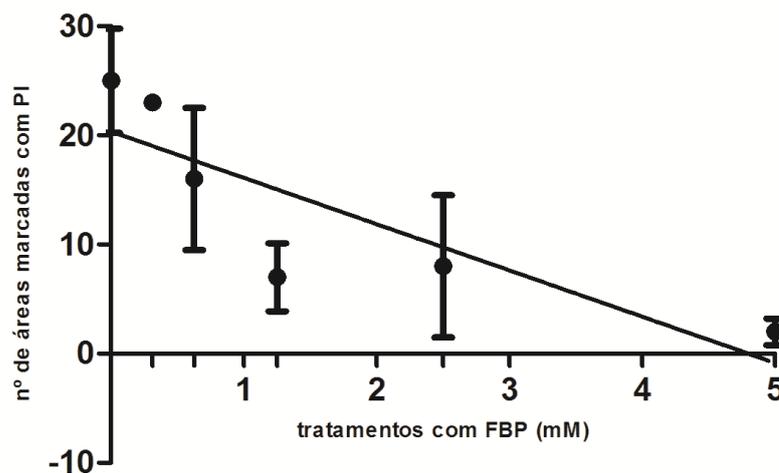


Figura 10. Análise de regressão linear indicando a relação inversa entre o tratamento com doses crescentes de FBP com a diminuição de áreas marcadas em vermelho nas ilhotas pancreáticas (positivas para PI), indicando morte celular ($P < 0,05$). A análise estatística sugere que o tratamento é dose-dependente, na sobrevivência celular. $R^2 = 0,7318$.

6 DISCUSSÃO

A DM1 é uma doença metabólica que surge como consequência da destruição imunológica seletiva, induzida por proteínas específicas, capazes de gerar resposta autoimune, presentes nas células β produtoras de insulina nas ilhotas de Langerhans. (SKYLER; RICORDI, 2011 *apud* EISENBARTH, 2010) Esse distúrbio ocorre em indivíduos nos quais há maior susceptibilidade genética e é provavelmente estimulada por fatores epigenéticos distintos. Esse cenário induz uma insuficiência funcional progressiva e aparente declínio na massa e função das células β .

Em pacientes com DM1, o controle glicêmico pode ser alcançado através da insulinoterapia intensiva. Porém em certas ocasiões, quando a terapia com insulina exógena (utilizada como mecanismo de reposição) não é capaz de normalizar os valores da hemoglobina glicosilada e ainda pode causar hipoglicemia grave, os pacientes podem ainda realizar o transplante do pâncreas vascularizado (JOSE *et al*, 2009 *apud* THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP, 1997). O transplante de pâncreas isolado pode ser considerado uma importante alternativa para pacientes portadores de DM1 que têm um risco elevado de complicações diabéticas secundárias. (WISEMAN, 2010 *apud* GRUENNER AC; SUTHERLAND; GRUENNER RW, 2010). Além disso, estudos recentes demonstraram que a sobrevivência dos pacientes após 5 anos do transplante de pâncreas isolado é de 90% (GRUENNER *et al*, 2008).

Entretanto, existe uma percentagem de pacientes que não podem ser submetidos a uma cirurgia de grande porte. Para esses pacientes, atualmente existe a possibilidade de realizar – ainda de forma experimental – um processo menos invasivo, o transplante de ilhotas pancreáticas, cuja taxa de sobrevida do enxerto (garantindo a insulino independência) nos primeiros 5 anos de vida é de 15% (RYAN *et al*, 2005).

Com o intuito de melhorar a taxa de enxerto no transplante de ilhotas, diversos grupos de pesquisadores estão optando por manter as ilhotas em cultura celular por um curto período, prévio ao transplante (FROUD *et al*, 2005). Esse procedimento parece ser vantajoso por eliminar ilhotas com menor viabilidade (como aquelas decorrentes do trauma enzimático e mecânico do processo de isolamento) e também por diminuir a imunogenicidade devida à ativação de moléculas co-

estimulatórias durante o processo de isolamento (YAMAMOTO *et al*, 2010). Além disso, a cultura das ilhotas elimina parte do componente acinar, que não resiste à cultura. A redução do componente acinar também reduz a produção de citocinas, que também podem gerar a morte das ilhotas por ser extremamente próinflamatório. Com isso, o volume de tecido infundido é reduzido o que diminui também a pressão da veia porta durante o procedimento de implante.

Além de desempenhar um importante papel na citoproteção e na redução da formação e liberação de radicais livres, a FBP age como um regulador metabólico que estimula as reações catabólicas da glicólise, podendo contribuir para a preservação tecidual de diversos órgãos em situações de estresse (DE OLIVEIRA *et al*, 2009).

Devido às suas propriedades citoprotetoras e na redução na formação e liberação de radicais livres já descritas, a ação da FBP surge como uma alternativa interessante durante o processo de isolamento das ilhotas de Langerhans. Seus efeitos poderiam viabilizar o isolamento de forma a aumentar o número de células viáveis, diminuindo a perda da massa de ilhotas durante o processo de isolamento. Além disso, ainda auxiliaria na diminuição da liberação de citocinas pró-inflamatórias.

Muitos grupos de pesquisa estão empenhados em aumentar a eficácia dos transplantes para que um número maior de pacientes alcance a independência da insulina. O primeiro estudo com resultados satisfatórios foi realizado por um grupo canadense da Universidade de Alberta, em Edmonton. Sete pacientes com DM1 que apresentavam hipoglicemia severa e instabilidade metabólica – em decorrência do aumento excessivo dos níveis de insulina causados pela administração de insulina exógena – foram submetidos ao transplante de ilhotas pancreáticas. Todos os pacientes alcançaram a independência de insulina em um ano, mostrando uma alta taxa de sucesso quando imunossupressores não glicocorticóides foram empregados e um número adequado de ilhotas foi infundido (ELIASCHEWITZ *et al*, 2009 *apud* SHAPIRO *et al*, 2000). Com a aplicação desse protocolo, denominado “Protocolo de Edmonton”, a porcentagem de pacientes alcançando independência de insulina aumentou para 50-80% no primeiro ano de vida.

O protocolo de Edmonton sugere que a massa crítica de ilhotas transplantadas seja cerca de 9.000 IEQ/kg do peso corporal do receptor,

necessitando dois ou três processos de infusão de ilhotas distintos, utilizando de dois a quatro doadores cadavéricos. (RYAN *et al*, 2001).

Markmann *et al* comprovaram a eficácia do protocolo de Edmonton, utilizando o regime de imunossupressores, para o transplante de ilhotas pancreáticas humanas. Além disso, demonstraram em seu estudo que a insulinoindpendência pode ser alcançada com infusões individuais de um único doador, ou preparações combinadas de dois doadores (MARKMANN *et al*, 2003). Esses resultados sugerem a possibilidade do desenvolvimento de técnicas utilizando preparações *in vitro*, quando não há a imediata disponibilidade de um segundo doador.

O mecanismo responsável pelos efeitos de FBP ainda é incerto. A importância do conhecimento dos mecanismos de sinalização intracelular é de suma importância, e foi evidenciada *in vivo* por Matsuda *et al*. Neste trabalho a cultura de ilhotas pancreáticas na presença de bloqueadores de uma via de secreção de citocinas próinflamatórias dependentes de LPS, melhorou a função do enxerto em camundongos diabéticos (MATSUDA *et al*, 2005).

Os resultados demonstrados no nosso estudo comprovam a ação citoprotetora da FBP em ilhotas pancreáticas murinas mantidas em cultura por 24h. Em doses basais de FBP (figura 9B-C), as ilhotas de Langerhans não apresentaram uma diminuição na morte celular devido ao efeito citoprotetor da FBP, assim como observado no grupo controle (figura 9A). Porém, em doses mais altas de FBP (figura 9D-F), observou-se a diminuição significativa de regiões coradas com PI, indicando uma diminuição da morte celular presente nas ilhotas de Langherans. A incubação das ilhotas pancreáticas com 5mM de FBP apresentou menos de 5% da região total da ilhota marcada com PI (tabela 1).

Os dados sugerem que as ilhotas de Langerhans sofrem grande estresse durante o seu isolamento, provocando perda de função e morte da população celular da ilhota. A incubação com altas doses confirmou o efeito citoprotetor da FBP, diminuindo a morte celular das ilhotas pancreáticas. Sendo assim, o tratamento de ilhotas pancreáticas com moléculas citoprotetoras torna-se indispensável para a obtenção da massa de ilhotas mínima ideal a ser utilizada para um transplante, visando a insulinoindpendência. Em paralelo, o número de doadores necessários para o sucesso do transplante diminuiria, favorecendo um maior número de pacientes.

O sucesso do transplante de ilhotas pancreáticas e, conseqüentemente a transformação do procedimento experimental em processo clínico, dependerá do aprimoramento de vários fatores. Dentre eles, a inibição da morte celular mediante o uso de moléculas citoprotetoras e a expansão das ilhotas na cultura, somados a técnicas alternativas de cocultura com células mesenquimais, e ainda, a associação dos mecanismos de indução de tolerância, prevenção da destruição das ilhotas por autoimunidade ou mecanismos de rejeição aloimune, pode contribuir para o desenvolvimento e a instalação do procedimento clínico.

7 CONCLUSÃO

O estabelecimento dos procedimentos envolvidos no isolamento das ilhotas pancreáticas, bem como a cultura com moléculas citoprotetoras, evidenciadas em experimentos *ex vivo* é de fundamental importância para o desenvolvimento de terapias eficazes capaz de reverter o quadro patológico que afeta um grande número de portadores de DM1 em todo o mundo.

Esse estudo demonstrou que foi possível, através de cultura *ex vivo*, demonstrar a ação citoprotetora da FBP em ilhotas pancreáticas murinas mantidas em cultura.

Os resultados demonstraram que a diminuição na taxa de morte celular obtida com a incubação com FBP torna-se indispensável para a obtenção de um número crítico mínimo de ilhotas, necessária em um transplante de ilhotas de Langerhans.

REFERÊNCIAS

ALVES, C.; SOUZA; CHAVES, 2006 C. Metformina como tratamento coadjuvante à Insulina em adolescentes com diabetes mellitus tipo 1. **Rev. Bras. Med.**, Rio de Janeiro, v. 63, n. 10, p. 539-543. 2006.

BAKER, M. S. et al. Proinflammatory cytokines induce NF-kappaB-dependent/NO-independent chemokine gene expression in MIN6 beta cells. **J Surg Res**, v. 110, n. 1, p. 295-303, Mar 2003. ISSN 0022-4804 (Print)
0022-4804 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12697414> >.

BARBÉ-TUANA, F. M. **Papel pró-inflamatório do receptor CD40 em ilhotas pancreáticas**. 2006. 275f. Dissertação (Doutorado em Ciências Médicas - Nefrologia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Porto Alegre, 2006.

CABRERA, O. et al. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 7, p. 2334-9, Feb 14 2006. ISSN 0027-8424 (Print)
0027-8424 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16461897> >.

CHILLARON, J. J. et al. [Metabolic syndrome and type-1 diabetes mellitus: prevalence and associated factors]. **Rev Esp Cardiol**, v. 63, n. 4, p. 423-9, Apr 2010. ISSN 1579-2242 (Electronic)
0300-8932 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20334808> >.

CHILLARON, J. J. et al. [Chronic complications in type 1 diabetes mellitus. Analysis of a cohort of 291 patients with a mean evolution time of 15 years]. **Rev Clin Esp**, v. 212, n. 8, p. 375-82, Sep 2012. ISSN 1578-1860 (Electronic)
0014-2565 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22765958> >.

COBEA. Manual para técnicos em bioterismo. São Paulo: Winner, 1996:3. Rio Grande do Sul. Lei 11.915, de 21 de maio de 2003. Código Estadual de Proteção aos Animais. Constituição do Estado, art.82 inc IV, 29 mai. 2003.

CORNU, M.; THORENS, B. GLP-1 protects beta-cells against apoptosis by enhancing the activity of an IGF-2/IGF1-receptor autocrine loop. **Islets**, v. 1, n. 3, p. 280-2, Nov-Dec 2009. ISSN 1938-2022 (Electronic). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21099285> >.

DE FRAGA, R. S. et al. Fructose 1-6 biphosphate versus University of Wisconsin solution for rat liver preservation: does FBP prevent early mitochondrial injury? **Transplant Proc**, v. 43, n. 5, p. 1468-73, Jun 2011. ISSN 1873-2623 (Electronic) 0041-1345 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21693219>>.

DE OLIVEIRA, C. S. A. 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. 2009. Disponível em: <<http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/scientiamedica/article/viewDownloadInterstitial/4659/7804>>.

DE OLIVEIRA, L. M. et al. Fructose-1,6-bisphosphate inhibits in vitro and ex vivo platelet aggregation induced by ADP and ameliorates coagulation alterations in experimental sepsis in rats. **J Thromb Thrombolysis**, v. 29, n. 4, p. 387-94, May 2010. ISSN 1573-742X (Electronic) 0929-5305 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19705256>>.

DREWS, G.; KRIPPEIT-DREWS, P.; DUFER, M. Oxidative stress and beta-cell dysfunction. **Pflugers Arch**, v. 460, n. 4, p. 703-18, Sep 2010. ISSN 1432-2013 (Electronic) 0031-6768 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20652307>>.

EFRAT, S. Generation of insulin-producing cells from stem cells for cell replacement therapy of type 1 diabetes. **Isr Med Assoc J**, v. 6, n. 5, p. 265-7, May 2004. ISSN 1565-1088 (Print). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15151363>>.

ELIASCHEWITZ F. G. et al. Islet transplantation as a clinical tool: present state and future perspectives. **Arq Bras Endocrinol Metab**. vol.53 no.1 São Paulo Feb. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0004-27302009000100004&script=sci_arttext>.

EISENBARTH, G. S. Banting Lecture 2009: An unfinished journey: molecular pathogenesis to prevention of type 1A diabetes. **Diabetes**, v. 59, n. 4, p. 759-74, Apr 2010. ISSN 1939-327X (Electronic) 0012-1797 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20350969>>.

FALCO, A. et al. Increased soluble CD40 ligand levels in cystic fibrosis. **J Thromb Haemost**, v. 2, n. 4, p. 557-60, Apr 2004. ISSN 1538-7933 (Print) 1538-7836 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15102009>>.

FROUD, T. et al. Islet transplantation in type 1 diabetes mellitus using cultured islets and steroid-free immunosuppression: Miami experience. **Am J Transplant**, v. 5, n. 8, p. 2037-46, Aug 2005. ISSN 1600-6135 (Print)
1600-6135 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15996257> >.

GRUESSNER, A. C.; SUTHERLAND, D. E.; GRUESSNER, R. W. Pancreas transplantation in the United States: a review. **Curr Opin Organ Transplant**, v. 15, n. 1, p. 93-101, Feb 2010. ISSN 1531-7013 (Electronic)
1087-2418 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20009932> >.

GRUESSNER, R. W. et al. Over 500 solitary pancreas transplants in nonuremic patients with brittle diabetes mellitus. **Transplantation**, v. 85, n. 1, p. 42-7, Jan 15 2008. ISSN 0041-1337 (Print)
0041-1337 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18192910> >.

HERING, B. J. et al. Single-donor, marginal-dose islet transplantation in patients with type 1 diabetes. **JAMA**, v. 293, n. 7, p. 830-5, Feb 16 2005. ISSN 1538-3598 (Electronic)
0098-7484 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15713772> >.

HERRERO, I. 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**, v. 10, n. 4, p. 519-26, 1995. ISSN 0931-0509 (Print)
0931-0509 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7623995> >.

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**, v. 74, n. 6, p. 779-83, Sep 27 2002. ISSN 0041-1337 (Print)
0041-1337 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12364855> >.

HYPOGLYCEMIA in the Diabetes Control and Complications Trial. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. **Diabetes**, v. 46, n. 2, p. 271-86, Feb 1997. ISSN 0012-1797 (Print)
0012-1797 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9000705> >.

IHM, S. H. et al. Effect of donor age on function of isolated human islets. **Diabetes**, v. 55, n. 5, p. 1361-8, May 2006. ISSN 0012-1797 (Print)
0012-1797 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16644693> >.

INTERNATIONAL Diabetes Federation. **Diabetes Atlas**. 5th edition. Brussels (Belgium): International diabetes federation; 2011. Disponível em: <<http://eatlas.idf.org>. Accessed November 11, 2011 >.

JOHNSON, J. D. et al. RyR2 and calpain-10 delineate a novel apoptosis pathway in pancreatic islets. **J Biol Chem**, v. 279, n. 23, p. 24794-802, Jun 4 2004. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15044459> >.

JOSE, L. P. S. et al. Perfil clínico e laboratorial de pacientes pediátricos e adolescentes com diabetes tipo 1. **J. Pediatr.** vol.85 no.6 Porto Alegre Nov./Dec. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0021-75572009000600004 >.

KAJIMOTO, Y.; KANETO, H. Role of oxidative stress in pancreatic beta-cell dysfunction. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1011, p. 168-76, Apr 2004. ISSN 0077-8923 (Print)
0077-8923 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15126294> >.

KIM, S. C. et al. Analysis on donor and isolation-related factors of successful isolation of human islet of Langerhans from human cadaveric donors. **Transplant Proc**, v. 37, n. 8, p. 3402-3, Oct 2005. ISSN 0041-1345 (Print)
0041-1345 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16298607> >.

LV, N. et al. Guggulsterone, a plant sterol, inhibits NF-kappaB activation and protects pancreatic beta cells from cytokine toxicity. **Mol Cell Endocrinol**, v. 289, n. 1-2, p. 49-59, Jul 16 2008. ISSN 0303-7207 (Print)
0303-7207 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18343024> >.

MAFFI, P. et al. Risks and benefits of transplantation in the cure of type 1 diabetes: whole pancreas versus islet transplantation. A single center study. **Rev Diabet Stud**, v. 8, n. 1, p. 44-50, Spring 2011. ISSN 1614-0575 (Electronic)
1613-6071 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21720672> >.

MALUCELLI, D. A. et al. Hearing loss prevalence in patients with diabetes mellitus type 1. **Braz J Otorhinolaryngol**, v. 78, n. 3, p. 105-15, Jun 2012. ISSN 1808-8686 (Electronic)
1808-8686 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22714855> >.

MARKMANN, J. F. et al. Insulin independence following isolated islet transplantation and single islet infusions. **Ann Surg**, v. 237, n. 6, p. 741-9; discussion 749-50, Jun 2003. ISSN 0003-4932 (Print)
0003-4932 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12796569> >.

MARKOV, A. K. et al. Fructose-1,6-diphosphate alone and in combination with cyclosporine potentiates rat cardiac allograft survival and inhibits lymphocyte proliferation and interleukin-2 expression. **Transplantation**, v. 74, n. 11, p. 1651-4, Dec 15 2002. ISSN 0041-1337 (Print)
0041-1337 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12490806> >.

MATSUDA, T. et al. Inhibition of p38 pathway suppresses human islet production of pro-inflammatory cytokines and improves islet graft function. **Am J Transplant**, v. 5, n. 3, p. 484-93, Mar 2005. ISSN 1600-6135 (Print)
1600-6135 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15707402> >.

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, Jun 2004. ISSN 0041-1345 (Print)
0041-1345 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15251307> >.

NATHAN, D. M. Long-term complications of diabetes mellitus. **N Engl J Med**, v. 328, n. 23, p. 1676-85, Jun 10 1993. ISSN 0028-4793 (Print)
0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8487827> >.

NAZARIO, Brunilda. Diabetes: Type 1 Diabetes. WebMD Medical Reference in collaboration with The Cleveland Clinic. Cleveland, Outubro de 2005. Acesso em 23 out. 2012 Disponível em: <<http://www.medicinenet.com> >.

NELSON, David L.; COX, Michal M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre : Artmed, 2011.

NUNES, F. B. et al. Effect of the chlorpropamide and fructose-1,6-bisphosphate of soluble TNF receptor II levels. **Pharmacol Res**, v. 49, n. 5, p. 449-53, May 2004. ISSN 1043-6618 (Print)
1043-6618 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14998554> >.

NUNES, F. B. **Estudo experimental para avaliar o mecanismo protetor da frutose 1,6 bisfosfato no tratamento da sepse**. 2003. 81f. Dissertação (Doutorado

em Medicina). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Porto Alegre, 2003.

PAPAS, K. K.; SUSZYNSKI, T. M.; COLTON, C. K. Islet assessment for transplantation. **Curr Opin Organ Transplant**, v. 14, n. 6, p. 674-82, Dec 2009. ISSN 1531-7013 (Electronic) 1087-2418 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19812494> >.

PEARCE, I. A. et al. Stabilisation of diabetic retinopathy following simultaneous pancreas and kidney transplant. **Br J Ophthalmol**, v. 84, n. 7, p. 736-40, Jul 2000. ISSN 0007-1161 (Print) 0007-1161 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10873985> >.

PEROSA, M. et al. Transplante de Pâncreas Isolado (órgão total) com Drenagem Vesical. Relato do Primeiro Caso do Brasil. **Arq Bras Endocrinol Metab**. vol.43 no.5 São Paulo Oct. 1999. Disponível em: <
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27301999000500013&nrm=iso&tlng=pt >.

PHINNEY, D. G.; PROCKOP, D. J. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. **Stem Cells**, v. 25, n. 11, p. 2896-902, Nov 2007. ISSN 1549-4918 (Electronic) 1066-5099 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17901396> >.

PILEGGI, A. et al. Heme oxygenase-1 induction in islet cells results in protection from apoptosis and improved in vivo function after transplantation. **Diabetes**, v. 50, n. 9, p. 1983-91, Sep 2001. ISSN 0012-1797 (Print) 0012-1797 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11522663> >.

PIRES, A. C.; CHACRA, A. R. [Insulin therapy for type 1 diabetes mellitus: past and present]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 52, n. 2, p. 268-78, Mar 2008. ISSN 1677-9487 (Electronic) 0004-2730 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18438537> >.

ROBERTSON, R. P. Islet transplantation as a treatment for diabetes - a work in progress. **N Engl J Med**, v. 350, n. 7, p. 694-705, Feb 12 2004. ISSN 1533-4406 (Electronic) Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14960745> >.

ROBERTSON, R. P. et al. Pancreas and islet transplantation for patients with diabetes. **Diabetes Care**. 2000; 23:112-6. Disponível em: <
<http://journal.diabetes.org/clinicaldiabetes/v18n42000/pg172.htm> >.

RYAN, E. A. et al. Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol. **Diabetes**, v. 50, n. 4, p. 710-9, Apr 2001. ISSN 0012-1797 (Print)

0012-1797 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11289033> >.

RYAN, E. A. et al. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. **Diabetes**, v. 54, n. 7, p. 2060-9, Jul 2005. ISSN 0012-1797 (Print)

0012-1797 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15983207> >.

SANTOS, R. C. et al. Fructose-1,6-bisphosphate reduces the mortality in *Candida albicans* bloodstream infection and prevents the septic-induced platelet decrease. **Inflammation**, v. 35, n. 4, p. 1256-61, Aug 2012. ISSN 1573-2576 (Electronic)

0360-3997 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22367598> >.

SBCAL. Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório. Disponível em: <<http://www.cobea.org.br>> Acesso em: 24 jun. 2012.

SHAPIRO, A. M. Strategies toward single-donor islets of Langerhans transplantation. **Curr Opin Organ Transplant**, v. 16, n. 6, p. 627-31, Dec 2011. ISSN 1531-7013 (Electronic)

1087-2418 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22068022> >.

SHAPIRO, A. M. et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. **N Engl J Med**, v. 343, n. 4, p. 230-8, Jul 27 2000. ISSN 0028-4793 (Print)

0028-4793 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10911004> >.

SKYLER, J. S.; RICORDI, C. Stopping type 1 diabetes: attempts to prevent or cure type 1 diabetes in man. **Diabetes**, v. 60, n. 1, p. 1-8, Jan 2011. ISSN 1939-327X (Electronic)

0012-1797 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21193733> >.

SU, D. et al. Angiopoietin-1 production in islets improves islet engraftment and protects islets from cytokine-induced apoptosis. **Diabetes**, v. 56, n. 9, p. 2274-83, Sep 2007. ISSN 1939-327X (Electronic)

0012-1797 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17596403> >.

SWITZER, S. M. et al. Intensive insulin therapy in patients with type 1 diabetes mellitus. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 41, n. 1, p. 89-104, Mar 2012. ISSN 1558-4410 (Electronic)

0889-8529 (Linking). Disponible em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22575408> >.

WISEMAN, A. C. The Role of Kidney-Pancreas Transplantation in Diabetic Kidney Disease. **Curr Diab Rep**. 2010 October; 10(5): 385–391. Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2922623/> >.

WHITE S. A; MANAS, D. W. Pancreas transplantation. **Ann R Coll Surg Engl**. 2008 July; 90(5): 368–370. Disponible em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2645734/> >.

WHO (World Health Organization). Prevalence of diabetes worldwide. **Country and regional data on diabetes**. 2012. Disponible em: <http://www.who.int/diabetes/facts/world_figures/en/ >.

WU, X. T. 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**, v. 9, n. 6, p. 1323-6, Jun 2003. ISSN 1007-9327 (Print) 1007-9327 (Linking). Disponible em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12800249> >.

YAMAMOTO, T. et al. Prolactin supplementation to culture medium improves beta-cell survival. **Transplantation**, v. 89, n. 11, p. 1328-35, Jun 15 2010. ISSN 1534-6080 (Electronic) 0041-1337 (Linking). Disponible em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20357700> >.

YAMAMOTO, T. et al. beta-Cell specific cytoprotection by prolactin on human islets. **Transplant Proc**, v. 40, n. 2, p. 382-3, Mar 2008. ISSN 0041-1345 (Print) 0041-1345 (Linking). Disponible em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18374075> >.

YEUNG, T. Y. et al. Human mesenchymal stem cells protect human islets from pro-inflammatory cytokines. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e38189, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponible em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22666480> >.

ZHANG, Y. et al. Small molecule kaempferol modulates PDX-1 protein expression and subsequently promotes pancreatic beta-cell survival and function via CREB. **J Nutr Biochem**, Jul 20 2012. ISSN 1873-4847 (Electronic) 0955-2863 (Linking). Disponible em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22819546> >.