

Isolamento de ilhotas pancreáticas e a alternativa de uso da frutose-1,6-bisfosfato

Pancreatic islet isolation and the alternative use of fructose-1,6-bisphosphate

CARMEN SILVANA ARAUJO DE OLIVEIRA¹
PATRÍCIA SESTERHEIM¹
JARBAS RODRIGUES DE OLIVEIRA²
DAVID SAITOVITCH¹

RESUMO

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

Fonte de dados: revisão de artigos publicados, a partir da pesquisa 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 contribuem significativamente nesse processo, afetando a viabilidade das células para transplante. Vários esforços estão sendo feitos na tentativa de minimizar os danos causados pela liberação e produção destes compostos químicos.

Conclusões: frente às importantes ações da frutose-1,6-bisfosfato descritas na literatura, seu emprego durante o processo de isolamento das ilhotas pancreáticas parece ser uma alternativa bastante atraente. O efeito da frutose-1,6-bisfosfato na redução da formação e liberação de radicais livres, assim como a sua ação citoprotetora, poderiam viabilizar um maior número de células, otimizando o processo de isolamento, além de auxiliar na enxertia, por diminuir a liberação de citocinas pró-inflamatórias.

DESCRIPTORIOS: TRANSPLANTE DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS; DIABETES MELLITUS TIPO 1; FRUTOSE BISFOSFATASE; ILHOTAS PANCREÁTICAS/crescimento & desenvolvimento.

ABSTRACT

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

Source of data: Review of specific articles on the issue published in national and international databases (SciELO, Lilacs, PubMed).

Summary of 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 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 reactive oxygen species.

Conclusions: Considering the important actions of fructose-1,6-bisphosphate which are described in the literature, its use in pancreatic islet isolation may represent an attractive alternative. The effect of fructose-1,6-bisphosphate in reducing the production and release of free radicals, as well as its role in cellular protection, could enable a greater number of viable cells, optimizing the isolation process, and also protecting the graft process, by reducing the release of proinflammatory cytokines.

KEY WORDS: ISLETS OF LANGERHANS TRANSPLANTATION; DIABETES MELLITUS, TYPE 1; FRUCTOSE-BISPHOSPHATASE; ISLETS OF LANGERHANS/growth & development.

¹ Laboratório de Nefrologia, Instituto de Pesquisas Biomédicas, PUCRS.

² Laboratório de Pesquisa de Biofísica da Inflamação, Faculdade de Biociências, PUCRS.

INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é uma síndrome autoimune órgão específica, caracterizada pela destruição seletiva de células β produtoras de insulina das ilhotas pancreáticas.^{1,2} Acomete 0,3% da população com idade igual ou inferior a 20 anos e 0,5 a 1% dos indivíduos se forem considerada todas as faixas etárias.³ A incidência do DM1 está aumentando em nível mundial. Estima-se que, até o ano de 2010, em muitas populações a incidência irá exceder 30 pacientes por 100.000 habitantes ao ano.⁴

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 mortalidade.⁵

Como alternativa para pacientes diabéticos tipo 1 complicados (hiperlâbeis, principalmente quando acometidos por crises de hipoglicemia assintomática, por vezes associadas a complicações secundárias), está o transplante de pâncreas.^{6,7} Embora esta seja uma terapia bem estabelecida e que pode trazer benefícios, como melhora da qualidade de vida (liberdade dietética, parada de uso da insulina exógena e da monitorização glicêmica periódica) e interrupção da progressão de complicações secundárias, trata-se de procedimento cirúrgico de médio a grande porte, o que pode ter implicações diretas para os pacientes, em termos de morbidade e até mortalidade.⁸⁻¹⁰

Ainda, como ocorre com qualquer tipo de transplante de órgão sólido, o tratamento imunossupressor deve ser feito permanentemente, para evitar 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, como nefro, mielo ou neurotoxicidade, não são desprezíveis.⁶ A mortalidade geral dos pacientes submetidos ao transplante é de cerca de 7% após 3 anos de alta hospitalar.⁸

O transplante de ilhotas pancreáticas, ou de Langerhans, surge como uma alternativa a essas desvantagens. Embora também exija terapia imunossupressora, dados da literatura sugerem

que doses menores de imunossupressão sejam suficientes.¹¹ A principal vantagem, entretanto, seria dispensar o procedimento cirúrgico, já que o transplante de ilhotas depende apenas de uma infusão de células em veia central.^{11,12}

Entretanto, o transplante de ilhotas é de certa forma mais limitado que o pancreático, não só porque as ilhotas representam apenas 1 a 2% da massa celular do pâncreas, mas também pela limitada eficiência no seu isolamento e significativas perdas por morte celular após a efetiva separação das ilhotas do tecido exócrino.¹³ 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 DM1.¹⁰

ILHOTAS PANCREÁTICAS

O transplante de ilhotas pancreáticas, embora ainda em caráter experimental, é um método promissor de reposição de células beta. É processado através do isolamento e infusão de ilhotas de Langerhans.¹¹ Apesar do grande interesse no emprego deste método, o mesmo ainda é prejudicado pelo baixo rendimento obtido durante o isolamento das ilhotas pancreáticas. O estresse oxidativo, a produção de citocinas proinflamatórias e o próprio trauma físico e mecânico decorrente da técnica de isolamento acabam culminando, de forma variável, com a perda de massa de ilhotas.^{9,14}

Produtos de macrófagos como interleucina-1, interleucina-6, fator de necrose tumoral- α e óxido nítrico, são os primeiros mediadores da disfunção das ilhotas transplantadas. Citocinas são liberadas também 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.^{9,15} A secreção local de citocinas proinflamatórias por infiltração de linfócitos também pode contribuir para a perda de ilhotas.

A expressão e liberação de fator tecidual em ilhotas isoladas também podem influenciar negativamente o enxerto de ilhotas de Langerhans, através da ativação de plaquetas, formação de coágulo e recrutamento de linfócitos.^{16,17} Além disso, a liberação de fator de necrose tumoral- α está associada com inflamação e rejeição e potencializa a ação de outras citocinas, contribuindo com a citotoxicidade das ilhotas.⁹

Isolamento de ilhotas pancreáticas

Embora existam aproximadamente um milhão de ilhotas por pâncreas, as técnicas atuais de preservação do órgão, assim como de isolamento de ilhotas, permitem uma recuperação de menos do que a metade do seu número, sendo que muitas das que permanecem mostram evidências de sofrimento celular. O potencial de recuperação destas permanece por ser demonstrado.^{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 enxertia.¹⁸

A dissociação das ilhotas pancreáticas do resto do tecido exócrino e ductal do pâncreas parece ser de extrema importância para a eficácia do processo.¹⁹ Esta separação inicia-se com um processo denominado digestão pancreática. Para isso, é utilizada uma enzima, a colagenase bacteriana (isolada do *Clostridium histolyticum*).²⁰

Diogo et al.²¹ realizaram um estudo testando a dissociação das ilhotas de Langerhans em soluções de 1 ou 2 mg/mL de colagenase à temperatura de 4°C por um período de 24 horas. Os dados obtidos demonstraram que a diferença de concentrações das soluções de colagenase não interferiu no resultado final, e que a imersão em colagenase por um período mais prolongado melhorou o processo de digestão e conseqüentemente o rendimento do isolamento das ilhotas pancreáticas. Embora exista a necessidade de temperatura de 37°C para conferir a atividade enzimática à colagenase, os autores especulam que o período mais prolongado de imersão em colagenase antes do aquecimento possivelmente tenha promovido uma maior difusão do tecido pancreático triturado, aumentando envolvimento da enzima nas ilhotas.²² Dessa forma, ocorreu uma melhor dissociação entre ácinos e ilhotas, facilitando o processo posterior de separação por gradiente com Ficoll.²¹

O isolamento 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 da GE Healthcare Bio-Sciences). Em 1989, Lake et al.²³ 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 procedimento.

As preparações usadas para o transplante clínico de ilhotas contêm, em adição às ilhotas, considerável quantidade 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. Contudo, Blinman et al.²⁴ 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 isolamento.

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.^{14, 25}

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.^{26,27}

O estresse oxidativo também está envolvido em todas as etapas do processo que envolve o transplante, tais como a morte encefálica, o manejo do doador na unidade de terapia intensiva, a perfusão e preservação do pâncreas, a resultante isquemia fria e, finalmente, todo o processo de isolamento das ilhotas pancreáticas.²⁸⁻³⁰

Recentemente, linhas de estudos em roedores e humanos têm indicado que o estresse oxidativo possui um papel importante na 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, *reactive oxygen species*). Um dos mecanismos já conhecidos de lesão celular é a liberação de radicais livres.^{31,32}

Quando comparadas a outros tipos de células, as ilhotas pancreáticas são particularmente susceptíveis à destruição causada por ROS.^{33,34} Estudos recentes têm demonstrado que o estresse gerado pelo isolamento aumenta a expressão de genes de citocinas e quimiocinas em ilhotas humanas.³⁵ Um potencial alvo das ROS é o fator de transcrição nuclear NF- κ B, que está envolvido na regulação de citocinas proinflamatórias, assim

como quimiocinas, moléculas de adesão e enzimas inflamatórias.¹⁴ Alguns pesquisadores têm testado diversas moléculas que inibem a geração e/ou o dano mediado pelas ROS, incluindo a glutathione peroxidase, superóxido dismutase e a heme oxigenase-1.^{3,37-39}

Bottino et al.¹⁴ observaram que o isolamento de ilhotas de Langerhans produz e libera citocinas e quimiocinas, como interleucinas 6 e 8 e também proteína quimioatrativa de monócitos-1 ou macrófago (MCP-1), moléculas envolvidas na resposta ao estresse celular. A MCP-1 e a interleucina-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 do NF- κ B com o tratamento de ilhotas com antioxidantes. Também foi observada menor concentração interleucina-6 e MPC-1 no meio de cultura, quando as ilhotas foram mantidas com antioxidantes. Entretanto a secreção de interleucina-8 não foi relacionada com a ativação de NF- κ B e nem foi reduzida com o tratamento com antioxidantes.¹⁴

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.^{40,41} Em modelos de estudo envolvendo ratos, o enxerto é destruído por altos níveis de óxido nítrico liberados por macrófagos alogênicos ou singênicos.^{42,43}

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.⁴⁴⁻⁴⁶

Wu et al.⁴⁷ demonstraram que a administração oral de FBP 10 dias antes e 10 dias após um transplante de células de mucosa intestinal em ratos diminuiu a apoptose e aumentou o índice proliferativo das células. Esses autores propõem, como possíveis explicações para este efeito, a prevenção da depleção de trifosfato de adenosina (ATP); a ativação da piruvato-quinase e da fosfofrutoquinase em situações de estresse, promovendo o metabolismo dos carboidratos e oferecendo uma fonte de energia; e a ação quelante de cálcio extracelular e estabilizadora de membrana.

Um estudo realizado por Nunes et al.⁴⁸ demonstrou que concentrações de FBP entre

1,2 e 10 mM diminuem os níveis do receptor de interleucina solúvel em cultura de linfócitos, sugerindo assim um possível efeito imunomodulador da FBP, que já havia sido observado anteriormente por Bordignon.⁴⁹ Esses autores postularam que há interação da FBP com a membrana celular, onde ocorreria modificação da permeabilidade iônica.⁴⁸

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 tratado. Os achados desse trabalho demonstram o papel da FBP como antiinflamatório e na manutenção dos níveis de energia celular.⁵⁰

Moresco et al.⁵¹ relataram que a FBP parece proteger o fígado de danos causados por radicais livres, quando o tempo de preservação é menor que 18 horas. 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 celular.⁵² Schinetti e Lazzarino⁵³ demonstraram que a FBP limita a produção de superóxido e peróxido de hidrogênio por ativação de neutrófilos, impedindo o metabolismo oxidativo destes e inibindo a liberação de histamina por mastócitos.

Um estudo sobre a ação da FBP sobre o isolamento de ilhotas pancreáticas, realizado por 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). Entretanto, como não existem até o momento referências na literatura sobre o emprego da FBP em isolamento de ilhotas, serão necessários mais estudos com diferentes metodologias e utilizando doses diferentes de FBP.

CONCLUSÕES

Apresentando importante papel de citoproteção e redução da formação e liberação de radicais livres, a FBP é um regulador metabólico que estimula as reações catabólicas da glicólise, contribuindo para a preservação tecidual em

situações de isquemia em órgãos como coração, fígado e rins. Frente a estas importantes ações descritas na literatura, o emprego da FBP durante o processo de isolamento das ilhotas pancreáticas parece ser uma alternativa bastante atraente. Seu efeito na redução da formação e liberação de radicais livres, assim como sua ação citoprotetora, poderiam viabilizar um maior número de células, otimizando o processo de isolamento, além de auxiliar na enxertia, por diminuir a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Ainda são necessários estudos para determinar a dose ideal e encontrar a metodologia mais apropriada para o uso da FBP no isolamento de ilhotas pancreáticas.

REFERÊNCIAS

- Liu E, Eisenbarth GS. Type 1A diabetes mellitus associated autoimmunity. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2002;31:391-410.
- Sesterheim P, Sitovitch D, Staub, HL. Diabetes mellitus tipo 1: multifatores que conferem suscetibilidade à patogénia auto-imune. *Sci Med.* 2007;17:212-17.
- Rewers M, Norris J, Dabelea D. Epidemiology of type mellitus. *Adv Exp Med Biol.* 2004;552:219-46.
- Onkamo P, Väänänen S, Karvonem M, et al. Worldwide increase in incidence of type I diabetes: the analysis of date on published incidence trends. *Diabetologia.* 1999;42:1395-403.
- Nathan DM. Long-term complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1993; 328:1676-85.
- 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;166:456-91.
- Moudry-Munss KC, Gruessner A, Sutherland DE. International pancreas transplant registry report 1993. *Transplant Proc.* 1994;26:407-11.
- Robertson RP, Davis C, Larsen J, et al. Pancreas and islet transplantation for patients with diabetes. *Diabetes Care.* 2000;23:112-6.
- Stevens RB, Matsumoto S, Marsh CL. Is islet transplantation a realistic therapy for the treatment of type 1 diabetes in the near future? *Clin Diabetes.* 2001;19:51-60.
- Sá JR, Gonzalez AM, Melaragno CS, et al. Transplante de pâncreas e Ilhotas em portadores de diabetes melito. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2008;52:355-66.
- Robertson RP. Islet transplantation as a treatment for diabetes: a work in progress. *N Engl J Med.* 2004;350:694-705.
- 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.
- Rosenberg L, Wang R, Paraskevas S, et al. Structural and functional changes resulting from islet isolation lead to islet cell death. *Surgery.* 1999;126:393-8.
- Bottino R, Balamurugan NA, Tse H, et al. Response of human islet to isolation stress and the effect of antioxidant treatment. *Diabetes.* 2004;53:2559-68.
- Emamaullee JA, Shapiro AMJ. Interventional strategies to prevent β -cell apoptosis in islet transplantation. *Diabetes.* 2006;55:1907-14.
- 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.
- 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.
- Shapiro AM, Ryan EA, Lakey JR. Pancreatic islet transplantation in the treatment of diabetes mellitus. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metabol.* 2001;15:241-64.
- Delfino VDA. Efeito da inclusão do rutênio vermelho em 3 soluções de preservação celular sobre a viabilidade de ilhotas pancreáticas murinas recém-isoladas e preservadas a frio por 24 e 48 horas [tese]. Campinas (SP): UNICAMP, 2000.
- Lacy PE, Kostianovsky M. Method for the isolation of intact islet of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes.* 1967;16:35-9.
- Diogo LP, Saitovitch D, Bahlis LF. Imersão do pâncreas por 24 horas em solução de colagenase a 4° C no isolamento de ilhotas de Langerhans. *Sci Med.* 2008;18:81-6.
- Dono K, Gotoh M, Mondem M, et al. Low temperature collagenase digestion for islet isolation from 48-hour cold-preserved rat pancreas. *Transplantation.* 1994;57:22-6.
- 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;28:143-5.
- 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.* 2000;279:C1993-2003.
- 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;74:1687-91.
- Ricordi C, Fraker C, Szust J, et al. Improved human islet isolation outcome from marginal donors following assition of oxygenated perfluorocarbon to the cold-storage solution. *Transplantation.* 2003;75:1524-7.
- Hering BJ, Matsumoto I, Sawada T, et al. Impact of two-layer pancreas preservation on islet isolation and transplantation. *Transplantation.* 2002;74:1813-6.
- Iasi M, Uvo RAB, Gregorio SS, et al. Transplante hepático: avaliação do estresse oxidativo e das alterações histopatológicas na detecção de lesão celular, em preservação de 24 horas (estudo experimental em cães). *J Biomolec Med Free Rad.* 1996;2:55-9.
- Greve MW, Zink BJ. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Mt Sinai J Med.* 2009;76:97-104.
- Miranda LEC, Viaro F, Ceneviva R, et al. As bases experimentais da lesão por isquemia e reperfusão do fígado. *Acta Cir Bras.* 2004;19:3-12.
- 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.

32. 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;51:347-5.
33. 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 USA*. 1994;91:9253-6.
34. 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; 20:463-6.
35. Johansson U, Olsson A, Gabrielsson S, et al. Inflammatory mediators expresser in human islet of Langerhans: implication for islet transplantation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;308(3):474-9.
36. 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*. 200;43:625-31.
37. Tobiasch E, Günther L, Bach FH. Heme oxygenase-1 protects pancreatic beta cell from apoptosis caused by various stimuli. *J Investig Med*. 2001;49:566-71.
38. 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;50:1983-91.
39. Lepore DA, Shinkel TA, Fusicaro N, et al. Enhanced expression of glutathione peroxidase protects islet beta cells from hypoxia-reoxygenation. *Xenotransplantation*. 2004;11:53-9.
40. 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;172:291-2.
41. 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;71:125-32.
42. Marquet RL, Bonthuis F, Van IJken M, et al. Primary nonfunction of islet xenografts: the role of macrophages. *Transpl Int*. 1994;7(suppl.1):s660-2.
43. 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: 17-24.
44. Niu W, Zhang F, Ehringer W, et al. Enhancement of hypothermic heart preservation with fructose-1,6-diphosphate. *J Surg Res*. 1999;85:120-9.
45. Torras J, Borobia FG, Herrero I, et al. Hepatic preservation with a col-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;27:2379-81.
46. 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;10:519-26.
47. 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;9:1323-6.
48. 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: 449-53.
49. Bordignon Nunes F, Meier Graziottin C, Alves Filho JC, et al. Immunomodulatory effect of fructose-1,6-bisphosphate on T-lymphocytes. *Int Immunopharmacol*. 2003;3:267-72.
50. 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;30:2069-74.
51. 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. *Transplant Proc*. 2004;36:1261-4.
52. 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;590:115-9.
53. Schinetti ML, Lazzarino G. Inhibition of phorbol ester-stimulated chemiluminescence and superoxide production in human neutrophils by fructose 1,6-diphosphate. *Biochem Pharmacol*. 1986;35:1762-4.

Endereço para correspondência:
 CARMEN SILVANA ARAUJO DE OLIVEIRA
 Laboratório de Nefrologia, Instituto de Pesquisas Biomédicas
 Hospital São Lucas da PUCRS
 Av. Ipiranga, 6690, 2º andar
 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil
 Fone: (51) 3320-3500 ramal 3340
 E-mail: sil_arol@hotmail.com