

**1292**

**AValiação da produção de insulina por células murinas da linhagem MIN6 em alta passagem**

Ketlen da Silveira Moraes, Tatiana Guerra Amaral, Florencia Barbé-Tuana, Nance Beyer Nardi, Fátima Theresinha Costa Rodrigues Guma, Elvira Alicia Aparicio Cordero. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

**INTRODUÇÃO:** O Diabetes mellitus (DM) compreende um conjunto de doenças metabólicas caracterizadas por altos níveis de glicose sanguínea, causados pela não produção, produção insuficiente ou falta de resposta à insulina produzida pelas células  $\beta$ -pancreáticas. A linhagem celular murina MIN6 assemelha-se qualitativamente e quantitativamente as células pancreáticas. Então, esta linhagem apresenta resposta à glicose em baixas passagens (p1 – p40), podendo crescer em monocamada ou tridimensionalmente formando as “pseudo-ilhotas” (PIs). **OBJETIVO:** Avaliar a produção de insulina pelas células MIN6 em monocamadas e PIs em alta passagem (p47 – p52). **METODOLOGIA:** Utilizamos células MIN6 que variavam de p47 até p51 em monocamada ou em PIs. As células foram semeadas na densidade de  $2 \times 10^4$  cel/mL em garrafas de cultura (para monocada) e placas de petri (para formação de PIs), mantidas em estufa de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. A formação de PIs ocorre dentro de 6 a 8 dias. A produção de insulina por monocadas e PIs de MIN6 foi avaliada por: 1) Expressão do gene: após extração do RNA total pelo método do Trizol o cDNA foi sintetizado com a transcriptase reversa M-MLV e a síntese do mRNA avaliada por PCR, usando-se primers específicos; 2) Expressão da proteína: a síntese de insulina foi determinada por microscopia confocal. Monocamadas e PIs foram fixadas com paraformaldeído tamponado a 4%, os sítios inespecíficos bloqueados com albumina e a insulina imunodetectada com anticorpo específico e incubação com anticorpo secundário conjugado com Alexa Flúor 555. 3) Secreção de insulina e resposta à glicose: monocamadas e PIs foram mantidas em salina livre de glicose por 30min e depois incubadas com 2,8mM ou 28mM de glicose por 30min, a insulina presente no meio de cultura foi quantificada por ELISA. **RESULTADOS:** Por PCR, microscopia confocal e ELISA mostramos que monocamadas e PIs de MIN6 entre p47 – p51 sintetizam o mRNA, a proteína e secretam a insulina para o meio de cultura, respondendo a glicose. **CONCLUSÕES:** Nossos resultados mostram que diferente do descrito na literatura, células da linhagem MIN6 em passagens altas, tanto em monocamada como em crescimento tridimensional (PIs) continuam produzindo e secretando insulina em resposta a glicose. Projeto aprovado pelo CEP UFRGS. Palavra-chave: MIN6; pseudoilhotas; frutose.