

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

GABRIELE CATYANA KRAUSE

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA FRUTOSE-1,6-BISFOSFATO NO
CRESCIMENTO CELULAR DE CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA
(HEPG2)**

Porto Alegre

2014

GABRIELE CATYANA KRAUSE

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA FRUTOSE-1,6-BISFOSFATO NO
CRESCIMENTO CELULAR DE HEPATOCARCINOMA (HEPG2)**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção de grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira

Porto Alegre

2014

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo quem busca e vence obstáculos no mínimo fará coisas admiráveis”

José de Alencar

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e minha irmã que sempre me apoiaram e incentivaram em tudo, por acreditarem na minha capacidade de ir cada vez mais longe.

A meu namorado pelo carinho, compreensão e apoio durante todo esse período, obrigada pelas palavras de conforto e otimismo.

Ao meu orientador, pela confiança e incentivo e por todos os momentos de sabedoria.

Ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular e a PUCRS pela bolsa de estudos que possibilitou a realização deste trabalho.

A todos os colegas e amigos do laboratório de Biofísica pelo companheirismo.

Aos estagiários da Biofísica pelo esforço, dedicação, perseverança e acima de tudo paciência.

Aos colegas de outros laboratórios que ajudaram de todas as formas possíveis.

A todos os meus amigos que compartilharam minhas tristezas e alegrias.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização dessa etapa. Muito obrigada a todos!

RESUMO

O hepatocarcinoma (HCC) é o tumor primário de fígado mais frequente, sendo atualmente uma das principais doenças neoplásicas, representando 85% dos tumores hepáticos primários e sendo a terceira maior causa de morte relacionada ao câncer. O desenvolvimento da maioria dos hepatocarcinomas relaciona-se com a presença de alguma doença decorrente do quadro de cirrose, como hepatite B e C. Sua incidência tem aumentado nos últimos anos devido ao número de pacientes com infecções por hepatite C. O objetivo deste estudo foi investigar, *in vitro*, o efeito da frutose-1,6-bisfosfato (FBP) sobre o crescimento das células HepG2, modelo utilizado como carcinoma hepatocelular. Os resultados demonstraram que a FBP diminuiu a proliferação celular em uma relação dose-dependente, não sendo essa proliferação ocasionada por parada no ciclo celular ou apoptose verificado pelos testes de citometria. Observou-se que em 72 h de tratamento a FBP diminuiu os níveis de Interleucina 8 (IL-8), sendo esta interleucina relacionada com a progressão tumoral e a geração de espécies reativas de oxigênio. Além disso, a FBP diminuiu o estresse oxidativo, aumentando os níveis de catalase e diminuindo a produção das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), sendo esse efeito antioxidante possivelmente ocasionado por conseqüente diminuição de IL-8. Estes resultados demonstraram que a FBP pode ser um agente antineoplásico em potencial para o tratamento de hepatocarcinoma.

Palavras-chave: Frutose-1,6-bisfosfato, HepG2, Carcinoma Hepatocelular, IL-8.

ABSTRACT

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most frequent primary tumor of the liver, and is currently one of the major neoplastic diseases, representing 85% of primary liver tumors and is the third leading cause of cancer-related death. The development of the majority of hepatocellular carcinomas related to the presence of a disease resulting from cirrhosis, such as hepatitis B and C. Its incidence has increased in recent years due to the number of patients with infections caused by hepatitis C. The aim of this study was to investigate the *in vitro* effect of fructose-1,6-bisphosphate (FBP) on the growth of HepG2 cells, used as a model for hepatocellular carcinoma. The results showed that FBP decreases cell proliferation in a dose-dependent manner, not being caused by cell cycle arrest or apoptosis verified by flow cytometry. It was observed that at 72 h of treatment FBP decreased levels of IL-8, which is closely related to tumor progression and the generation of reactive oxygen species. Moreover, FBP decreased oxidative stress by increasing the levels of catalase and decreasing TBARS, this effect is possibly caused by the result of low IL-8. These findings demonstrated that FBP may be a potential anticancer agent for the treatment of HCC.

Key-words: fructose-1,6-bisphosphate, HepG2, hepatocellular carcinoma, IL-8

LISTA DE ABREVIATURAS

FBP – Frutose-1,6-bisfosfato

HCC – Carcinoma Hepatocelular

HCV – Vírus da Hepatite C

HBV – Vírus da Hepatite B

OMS – Organização Mundial da Saúde

ATP – Adenosina trifosfato

NADP – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

EROs – Espécies reativas de oxigênio

COX -2 - Ciclooxigenase 2

TGF- β 1 – Fator de transformação do crescimento beta 1

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 Hepatocarcinoma	9
1.2 Inflamação, estresse oxidativo e câncer.....	9
1.3 Tratamentos para hepatocarcinoma	11
1.4 Células de hepatocarcinoma – HepG2	12
1.5 Frutose-1,6-bisfosfato	12
2. JUSTIFICATIVA	14
3. OBJETIVOS	15
3.1 Objetivo geral	15
3.2 Objetivos específicos	15
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	16
5. REFERENCIAS.....	18

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hepatocarcinoma

Aproximadamente 80% dos casos de HCC relacionam-se com complicações decorrentes de quadros de cirrose (caracterizada pela fibrose progressiva e a reorganização da microarquitetura vascular) e a presença de infecções pelo vírus da hepatite B (HBV) ou vírus da hepatite C (HCV). Há ainda outros fatores de risco como: obesidade, diabetes melitus tipo 2, doenças metabólicas hereditárias, aflatoxinas, uso de esteróides anabolizantes, entre outros (1, 2, 6).

Os tumores malignos do fígado podem ser divididos em dois tipos: primários (que tem origem no próprio órgão) e secundários ou metastáticos (originados em outros órgãos) (1). O câncer primário de fígado, hepatocarcinoma (HCC), é o quinto tipo de câncer mais comum em todo mundo, e a terceira maior causa de mortalidade relacionada ao câncer (2). No Brasil, em 2010, o número de mortes decorrentes do HCC foi 7.720, sendo 4.409 homens e 3.311 mulheres. Mundialmente ele é responsável por mais de 500 mil novos casos de câncer por ano (1, 3).

Devido ao rápido crescimento tumoral e a ausência de sintomas no início da doença, este tipo de neoplasia é de mau prognóstico (4). O hepatocarcinoma é uma neoplasia de evolução muito rápida, sendo que o tempo de duplicação do tamanho do tumor é de aproximadamente quatro meses. Devido a este fato, na maioria dos casos diagnosticados, os tumores já se encontram em estágios intermediários e avançados (1, 5).

1.2 Inflamação, estresse oxidativo e câncer

Estudos mostram que existe uma relação entre a inflamação e o câncer. Há evidências de que doenças inflamatórias aumentam o risco de desenvolver vários tipos de câncer, e também promovem a progressão do tumor (7). Estudos recentes desvendaram vias moleculares que ligam a inflamação ao câncer (8), sendo impulsionadas por condições genéticas ou condições

inflamatórias (7, 8). Essas vias moleculares ativam fatores de transcrição nas células tumorais que coordenam a produção de mediadores inflamatórios, como quimiocinas, citocinas e prostaglandinas. Decorrente desse estímulo ocorre o recrutamento de células inflamatórias e novamente ativação de fatores de transcrição gerando uma retroalimentação (7).

As principais características do câncer relacionadas à inflamação incluem a presença de mediadores inflamatórios no microambiente tumoral, como o fator de necrose tumoral (TNF α), interleucina 1 (IL-1), secretados por macrófagos, e prostaglandinas, remodelando o tecido e alterando a homeostase celular (7, 8).

Outro mecanismo envolvido na carcinogênese é a geração de estresse oxidativo, o organismo sofre ação constante de espécies reativas de oxigênio (EROs) que são geradas em processos inflamatórios, por alguma disfunção biológica. Se não ocorrer a compensação do organismo com substâncias antioxidantes, os radicais livres promovem reações com substratos biológicos podendo ocasionar danos as biomoléculas e, conseqüentemente, afetar a saúde humana. Dentre essas biomoléculas encontram-se, por exemplo, as que compõem a membrana celular, proteínas, DNA e RNA. As lesões por radicais livres podem também ser causados pela ciclooxigenase 2, COX-2, uma enzima pró-inflamatória, a qual leva a produção de altos níveis de peróxidos no interior das células (9). O estresse oxidativo ativa vias inflamatórias que levam a transformação de células normais a tumorais, auxiliando na sobrevivência celular e angiogênese (10).

Como já citado anteriormente a ativação das vias inflamatórias pelo estresse oxidativo pode ativar inúmeros fatores de transcrição, e esses fatores podem levar a expressão de genes relacionados ao crescimento, quimiocinas e citocinas. Podemos citar como exemplo dessa correlação a IL-8, uma citocina pró-inflamatória com ação angiogênica, considerada uma importante contribuição para a progressão tumoral, principalmente em HCC (11). Além disso, a IL-8 ainda está relacionada com os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS), mostrando que quanto maior os níveis de IL-8 maior a

geração de estresse oxidativo (12). A IL 8 provoca a migração de neutrófilos para o tumor e estas células da imunidade inata provocam grande formação de radicais livres através da ativação da NADPH oxidase.

Outro parâmetro inflamatório que deve ser levado em conta é o fator de transformação do crescimento beta 1 (TGF β 1), o qual parece possuir um papel ambíguo no câncer. Nos estágios iniciais dos tumores, o TGF β 1 atua na supressão tumoral e indução da apoptose, mas em casos de tumores já formados, auxilia o crescimento tumoral fazendo angiogênese (13). Sendo assim, é importante levar em consideração a relação entre câncer, inflamação e estresse oxidativo.

1.3 Tratamentos para o HCC

A escolha do tratamento adequado depende do estágio do tumor, o qual se torna muito importante para determinar o prognóstico do paciente. Segundo o Instituto Nacional do Câncer, pacientes em estágios I e II são beneficiados pela ressecção cirúrgica associada a quimioterapia ou a quimioembolização. Já os pacientes em estágios III e IV, devem receber quimioterapia e serem reavaliados sobre a possibilidade de ressecção cirúrgica.

A indicação do tratamento quimioterápico passa por algumas prerrogativas nessa doença pois é necessário que o paciente tenha uma performance aceitável e que permita o tratamento, visto que a maioria das drogas é metabolizada pelo fígado. Uma das drogas utilizadas na quimioterapia para tratamento de tumores hepáticos primários é a Doxorubicina e, no entanto, sua taxa de resposta é de aproximadamente 10%. Entre os efeitos colaterais provocados por ela temos: mielosupressão, cardiotoxicidade, neurotoxicidade, náuseas, vômitos, alopecia (14).

O transplante e a ressecção hepática são os tratamentos de escolha para o HCC, sendo os mais efetivos em termos de resultados, entretanto menos de 20% dos pacientes tem condições clínicas que permitam tal tratamento (15-17). Os 80% restantes não podem ser tratados dessa maneira por não possuírem reserva hepática mínima para ressecções ou devido ao

estágio avançado da doença. O tratamento mais comum utilizado em pacientes que não podem ser submetidos a ressecção ou ao transplante é a quimioembolização. O conceito de quimioembolização foi introduzido em 1981 e é baseado na combinação de infusão intra-arterial de quimioterápicos com a oclusão do suprimento arterial do tumor (15).

Outra modalidade de tratamento reconhecida para o HCC é a ablação por radiofreqüência, onde é realizada a punção direta do tumor através do fígado com o auxílio de exame de imagem para guiar o procedimento e permitir o posicionamento adequado da agulha no interior da lesão tumoral. Uma vez no interior do tumor essa agulha de ablação é ligada a um gerador e ocorre a produção de radiofreqüência causando agitação molecular local e a destruição de células tumorais por necrose de coagulação (18).

1.4 Células de hepatocarcinoma – HepG2

A linhagem celular HepG2, derivada inicialmente de um hepatoblastoma humano, foi introduzida em estudos científicos em 1979. Desde então, foi utilizada em várias pesquisas como modelo de células hepáticas, visto que possui morfologia e funções metabólicas semelhantes às células do parênquima hepático. Segundo dados do protocolo das células HepG2, a linhagem é derivada de carcinoma hepatocelular, apresenta morfologia epitelial e crescimento aderente (19).

1.5 Frutose-1,6-bisfosfato

A FBP é um intermediário altamente energético da glicólise, apresentando estruturas estáveis anoméricas: α e β furanose. Este açúcar bisfosforilado, além de ser um subproduto da via glicolítica também exerce papel importante junto a diversas rotas metabólicas do organismo (20).

A FBP tem demonstrado efeitos terapêuticos em várias situações patológicas, como isquemia, choque e lesões tóxicas (21). Há também

evidências de seu efeito em doenças cardíacas, renais, cerebrais, intestinais e hepáticas (22-24).

Dentre suas ações podemos destacar sua capacidade de alterar o metabolismo de carboidratos, estimulando a glicólise e inibindo a gliconeogênese (25). Ainda não estão claros por quais mecanismos a FBP protege as células e os tecidos, mas uma possível hipótese seria a capacidade do metabolismo anaeróbico da FBP para gerar ATP (26) ou reduzir sua perda (27), pela sua propriedade quelante de cálcio (28). A capacidade da FBP de diminuir a quantidade de cálcio extracelular, melhora o rendimento mecânico e respiratório do coração isquêmico (22). A FBP também aumenta a captação celular de potássio, o que resulta numa diminuição intracelular da concentração de sódio, reduzindo portanto, o edema citotóxico (29)

A FBP é considerada uma substância antioxidante. O mecanismo pelo qual a FBP reduz a formação de O_2^- pode ser decorrente do aumento dos níveis de ATP, levando em consideração que este pode ser o regulador fisiológico da atividade catalítica da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) oxidase, uma das enzimas responsáveis pela produção destes radicais (30).

É de extrema importância a busca de terapias mais eficazes que apresentem menos efeitos colaterais e menores custos para o tratamento de hepatocarcinoma. Um droga terapêutica que poderia ser útil no tratamento do HCC é a frutose-1,6-bisfosfato (FBP).

2. JUSTIFICATIVA

Com as dificuldades encontradas na terapia antineoplásica tradicional, como a resistências às drogas utilizadas, alta toxicidade e efeitos adversos de elevado grau, recentes estudos têm sido impulsionados para o desenvolvimento de novas terapias antitumorais.

A frutose-1,6-bisfosfato, por apresentar propriedades antioxidantes e antiinflamatórias (20, 23), pode apresentar grande potencial para reduzir a progressão do tumor, já que o microambiente tumoral apresenta um conhecido estado inflamatório, com grande atividade de citocinas e quimiocinas, que poderiam ser alteradas pela FBP.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da frutose-1,6-bisfosfato sobre o crescimento celular, parâmetros inflamatórios e estresse oxidativo em células de carcinoma hepático (HepG2).

3.2 Objetivos Específicos

- Verificar o efeito da frutose-1,6-bisfosfato sobre o crescimento celular da linhagem celular HepG2;
- Avaliar marcadores de apoptose (Annexin V) e ciclo celular em células HepG2 tratadas com frutose-1,6-bisfosfato;
- Verificar a ação da frutose-1,6-bisfosfato sobre a síntese de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias nas culturas celulares (IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF, IL-12p70, TGF- β 1);
- Avaliar a influência da frutose-1,6-bisfosfato sobre estresse oxidativo em células HepG2.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os efeitos adversos, a resistência tumoral, as terapias comerciais agressivas e a citotoxicidade fazem com que novas terapias sejam estudadas, tornando-se cada vez mais necessário descobrir novos agentes antitumorais. A estreita relação do câncer com a inflamação (31), pode fazer com que substâncias antiinflamatórias exerçam efeito no microambiente tumoral.

Considerando a ação anti-inflamatória da FBP, verificou-se que este açúcar reduz a proliferação da linhagem celular de hepatocarcinoma. A primeira hipótese testada foi que a FBP poderia interferir no ciclo celular ou provocar apoptose nas células tumorais, mecanismos estes presentes em algumas drogas antineoplásicas. Utilizando técnicas de Citometria de fluxo, verificamos que a FBP não alterou o ciclo celular das HepG2 e tampouco acionou mecanismos que provocam apoptose.

A seguir buscamos outro mecanismo de ação da FBP, já que alguns relatos afirmam que este açúcar possui um efeito antioxidante. Foi demonstrado que a FBP é capaz de diminuir a proliferação celular e o mecanismo envolvido poderia ser devido ao efeito sobre o estresse oxidativo. Verificamos que a FBP aumenta a atividade da catalase e diminui a formação de espécies reativas de oxigênio demonstrado pela diminuição da concentração de TBARS no meio celular. Entretanto, ao avaliar o efeito antioxidante da FBP sobre o radical livre DPPH, observamos que o açúcar bisfosforilado não é uma molécula com propriedades antioxidante, sugerindo que este mecanismo poderia envolver outras rotas metabólicas.

O estresse oxidativo é considerado uma das causas da inflamação, pois a geração de EROs altera fatores de transcrição que provocam modificações na expressão de citocinas. Baseado nesta relação, resolvemos avaliar o perfil anti-inflamatório nas culturas celulares tratadas com FBP, já que as citocinas anti-inflamatórias representam um mecanismo de proteção contra a proliferação do tumor. Para avaliar se a FBP alteraria o

quadro anti-inflamatório medimos as concentrações de IL-10 e TGF- β 1 e verificamos que não houve alterações destas citocinas quando comparadas com o grupo não tratado. Como o estresse oxidativo se correlaciona com citocinas inflamatórias, medimos as concentrações de TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12 e verificamos a FBP diminuiu significativamente somente a concentração de IL-8, quando comparadas com as citocinas das culturas que não sofreram tratamento.

Após a avaliação dos parâmetros inflamatórios podemos sugerir que a IL-8, uma citocina pró-inflamatória, relacionada com a progressão tumoral principalmente em HCC, é o achado mais importante desse estudo. Nos hepatocarcinomas a IL-8 está intimamente relacionada com a progressão tumoral, sendo seu níveis mais altos em casos mais severos. A IL-8 também parece estar envolvida na produção de espécies reativas de oxigênio, gerando estresse oxidativo e, com a diminuição dessa interleucina pelo tratamento com FBP podemos inferir que este também seja o mecanismo de diminuição do estresse oxidativo.

Como conclusão deste estudo, podemos dizer que a FBP diminui a proliferação celular por suas ações antiinflamatórias e antioxidantes, sendo necessários mais estudos para elucidar por quais mecanismos ela atua na diminuição da proliferação celular e quais seus efeitos nos demais aspectos relacionados ao microambiente tumoral.

5. REFERÊNCIAS

1. Saúde IINdC-Md. Estimativa da Incidência e Mortalidade por Câncer. 2012.
2. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2007;132(7):2557-76.
3. Abdel-Hamid NM, Nazmy MH, Mahmoud AW, Fawzy MA, Youssof M. A survey on herbal management of hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol*. 2011;3(7):175-83.
4. Papaioordanou F, Ribeiro-Junior MAF, Saad WA. Prevenção do carcinoma hepatocelular. *Arq Bras Cir Dig*; 2009. p. 115-9.
5. Tan CH, Thng CH, Low AS, Tan VK, Hartono S, Koh TS, et al. Wash-out of hepatocellular carcinoma: quantitative region of interest analysis on CT. *Ann Acad Med Singapore*. 2011;40(6):269-75.
6. El-Serag, B. H. Epidemiology of Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2012;142(6):1264-73.
7. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):436-44.
8. MANTOVANI A. Cancer-related Inflammation: The Seventh Hallmark of Cancer. *Educational Book*2009.
9. Raza H, John A, Benedict S. Acetylsalicylic acid-induced oxidative stress, cell cycle arrest, apoptosis and mitochondrial dysfunction in human hepatoma HepG2 cells. *Eur J Pharmacol*. 2011;668(1-2):15-24.
10. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med*. 2010;49(11):1603-16.
11. Akiba J, Yano H, Ogasawara S, Higaki K, Kojiro M. Expression and function of interleukin-8 in human hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol*. 2001;18(2):257-64.
12. Lee KE, Khoi PN, Xia Y, Park JS, Joo YE, Kim KK, et al. Helicobacter pylori and interleukin-8 in gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2013;19(45):8192-202.
13. Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet*. 2001;29(2):117-29.
14. He C, Sun XP, Qiao H, Jiang X, Wang D, Jin X, et al. Downregulating hypoxia-inducible factor-2 α improves the efficacy of doxorubicin in the treatment of hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci*. 2012;103(3):528-34.
15. Llovet JM, Bruix J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. *Hepatology*. 2003;37(2):429-42.
16. Lau WY, Lai EC. Hepatocellular carcinoma: current management and recent advances. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2008;7(3):237-57.
17. Lau WY, Leung TW, Yu SC, Ho SK. Percutaneous local ablative therapy for hepatocellular carcinoma: a review and look into the future. *Ann Surg*. 2003;237(2):171-9.
18. Lencioni R, Crocetti L, Petruzzi P, Vignali C, Bozzi E, Della Pina C, et al. Doxorubicin-eluting bead-enhanced radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma: a pilot clinical study. *J Hepatol*. 2008;49(2):217-22.
19. ATCC. Manassas - USA: Product Information Sheet for ATCC HB-8065; 2012.
20. Alva N, Carbonell T, Roig T, Bermúdez J, Palomeque J. Fructose 1,6 biphosphate administration to rats prevents metabolic acidosis and oxidative stress induced by deep hypothermia and rewarming. *Eur J Pharmacol*. 2011;659(2-3):259-64.
21. Fortes Aiub CA, Bortolini R, Arriera Azambuja A, Alves Filho JC, Bordignon Nunes F, Rodrigues de Oliveira J. Alterations in the indexes of apoptosis and necrosis induced by

- galactosamine in the liver of Wistar rats treated with fructose-1,6-bisphosphate. *Hepatol Res.* 2003;25(1):83-91.
22. De Oliveira JR, Rosa JL, Ambrosio S, Bartrons R. Effect of galactosamine on hepatic carbohydrate metabolism: protective role of fructose 1,6-bisphosphate. *Hepatology.* 1992;15(6):1147-53.
 23. Nunes FB, Graziottin CM, Alves Filho JC, Lunardelli A, Pires MG, Wächter PH, et al. An assessment of fructose-1,6-bisphosphate as an antimicrobial and anti-inflammatory agent in sepsis. *Pharmacol Res.* 2003;47(1):35-41.
 24. Calafell R, Boada J, Santidrian AF, Gil J, Roig T, Perales JC, et al. Fructose 1,6-bisphosphate reduced TNF-alpha-induced apoptosis in galactosamine sensitized rat hepatocytes through activation of nitric oxide and cGMP production. *Eur J Pharmacol.* 2009;610(1-3):128-33.
 25. Kirtley ME, McKay M. Fructose-1,6-bisphosphate, a regulator of metabolism. *Mol Cell Biochem.* 1977;18(2-3):141-9.
 26. Gobbel GT, Chan TY, Gregory GA, Chan PH. Response of cerebral endothelial cells to hypoxia: modification by fructose-1,6-bisphosphate but not glutamate receptor antagonists. *Brain Res.* 1994;653(1-2):23-30.
 27. Gregory GA, Welsh FA, Yu AC, Chan PH. Fructose-1,6-bisphosphate reduces ATP loss from hypoxic astrocytes. *Brain Res.* 1990;516(2):310-2.
 28. Hassinen IE, Nuutinen EM, Ito K, Nioka S, Lazzarino G, Giardina B, et al. Mechanism of the effect of exogenous fructose 1,6-bisphosphate on myocardial energy metabolism. *Circulation.* 1991;83(2):584-93.
 29. Cattani L, Costrini R, Cerilli C, Rigobello MP, Bianchi M, Galzigna L. Fructose-1, 6-diphosphate dependence on the toxicity and uptake of potassium ions. *Agressologie.* 1980;21(5):263-4.
 30. Babior BM, Peters WA. The O₂-producing enzyme of human neutrophils. Further properties. *J Biol Chem.* 1981;256(5):2321-3.
 31. Eiró N, Vizoso FJ. Inflammation and cancer. *World J Gastrointest Surg.* 2012;4(3):62-72.