UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DE GENES REGULADOS
POR GLICOSE EM ILHOTAS PANCREÁTICAS HUMANAS

Carlos Alberto Mayora Aita

Tese de Doutorado

PROF^a. DR^a. MARI CLEIDE SOGAYAR

SÃO PAULO

Data do Depósito do Trabalho na SPG: 04 / 11 / 2002

Quatro de Novembro de Dois Mil e Dois

***“Clonagem e Caracterização de Genes
Regulados por Glicose em Ilhotas Pancreáticas
Humanas”***

***CARLOS ALBERTO MAYORA
AITA***

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências – Área: Bioquímica.

Aprovada por:

Prof. Dra. MARI CLEIDE SOGAYAR
IQ – USP
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. PAULO LEE HO
IB

Prof. Dra. CLAUDIMARA PERINI PACICCO LOFTI
ICB – USP

Prof. Dr. DANIEL GIANNELLA NETO
FM – USP

Prof. Dr. SÉRGIO ATALA DIB
UNIFESP

SÃO PAULO
16 DE DEZEMBRO 2002.

À Irenice, pelo seu amor e sua
companhia.

À minha família, por tudo.

À Prof^a Mari Sogayar, pela
orientação e amizade.

AGRADECIMENTO

Esta página é dedicada a todos aqueles que, de alguma forma, colaboraram para a realização deste trabalho. E, mesmo, pela agradável convivência nestes anos. Para transmitir meu agradecimento a todos, faço minhas as palavras de C. Ronald Kahn, emitidas na ocasião de recebimento do prêmio Banting de 1994:

"I thank you from the bottom of my
pancreas. That's like the bottom of
my heart, only deeper".

APOIO FINANCEIRO

CNPq-Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

FINEP - Financiadora de Estudos e Projetos

ICGEB -International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology

PRP-USP - Pró-Reitoria de Pesquisa - USP

PRP-USP - Pró-Reitoria de Pós-Graduação - USP

Sumário

Resumo

Abstract

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras e Tabelas

1.	INTRODUÇÃO	01
1.1	Diabetes mellitus	02
1.2	Ilhotas de Langerhans	12
1.3	Transplante de ilhotas pancreáticas	13
1.4	Proliferação de células β pancreáticas	18
1.5	Métodos de análise de expressão gênica diferencial	21
2.	OBJETIVOS	25
3.	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1	Isolamento e purificação de ilhotas pancreáticas	28
3.2	Avaliação da viabilidade das ilhotas pancreáticas	31
3.3	Cultura de ilhotas pancreáticas e estímulo com glicose	34
3.4	Curva de crescimento celular	34
3.5	Extração e purificação de RNA total	35
3.6	Síntese de cDNAs	36
3.7	Construção da biblioteca de subtração de cDNAs	37
3.8	Clonagem dos fragmentos de cDNA da biblioteca de subtração e transformação bacteriana	41

3.9	Construção de macroarranjos de DNA	43
3.10	Northern blot	47
3.11	Seqüenciamento automatizado de DNA	49
3.12	Análise das seqüências de cDNA em bancos de dados	49
4.	RESULTADOS	50
4.1	Isolamento e purificação de ilhotas pancreáticas	51
4.2	Proliferação de ilhotas pancreáticas humanas	55
4.3	Construção da biblioteca de subtração de cDNAs	57
4.4	Rastreamento da biblioteca de subtração	64
4.5	Seqüenciamento de DNA dos clones selecionados	68
4.6	Confirmação da expressão diferencial	70
4.7	Análise da seqüência do Clone 1	74
4.8	Análise da seqüência do Clone 5	76
5.	DISCUSSÃO	77
6.	CONCLUSÕES	89
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

Curriculum vitae

RESUMO

O Diabetes mellitus (DM) do tipo 1 é uma doença causada pela destruição, por mecanismo auto-imune, das células β das ilhotas pancreáticas, produtoras de insulina. O tratamento convencional da doença é realizado por meio de injeções diárias de insulina exógena.

O transplante de ilhotas pancreáticas inclui-se, atualmente, como uma das alternativas terapêuticas à insulino-terapia. Entretanto, para atingir a insulino-independência, é necessário transplantar um grande número de ilhotas por paciente. O conhecimento do mecanismo de proliferação das células β pode possibilitar a realização do transplante a partir da expansão celular *ex vivo*. A glicose é um dos principais indutores da proliferação de células β .

Neste trabalho, foi estabelecida e executada a tecnologia de isolamento e purificação de ilhotas pancreáticas humanas, visando sua estimulação com glicose. Para identificar genes regulados por glicose nestas ilhotas, foi utilizada a técnica de hibridização subtrativa SSH, associada ao rastreamento da biblioteca através de macroarranjos de DNA.

Num primeiro rastreamento, foram identificados dois fragmentos gênicos induzidos pela glicose. Um destes apresentou homologia com uma proteína hipotética humana de função desconhecida e o segundo com o receptor de polipetídeo pancreático.

Este trabalho permitiu a identificação de novos genes regulados pela glicose em ilhotas pancreáticas humanas, os quais podem estar relacionados à proliferação celular deste tecido.

ABSTRACT

Type 1 Diabetes mellitus (T1DM) is caused by autoimmune destruction of the insulin-producing pancreatic islet β -cells. Treatment is generally approached by daily subcutaneous injections of exogenous insulin.

Nowadays, pancreatic islet transplantation is considered as an effective alternative treatment to insulin therapy. However, in order to reach insulin-independence, a large number of islets is required for each patient. Knowledge of the mechanisms regulating islet β -cell proliferation may allow *ex-vivo* β -cell expansion prior to transplant. Glucose is considered one of the main inducers of islet β -cells proliferation.

We established and executed the technology of human islet isolation and purification. The islets were then stimulated in culture with glucose. In order to identify glucose-regulated genes in cultured human islets, we utilized the suppression subtractive hybridization (SSH) method, followed by cDNA library screening by DNA macroarrays.

Preliminary screening allowed us to isolate two cDNAs displaying glucose regulation, one of which is similar to a human hypothetical protein of unknown function and the other shows similarity to the pancreatic polypeptide receptor.

This work allowed identification of glucose-regulated genes in human pancreatic islets, which may be related to cell proliferation in this tissue.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	adenosina trifosfato
AMP	adenosina monofosfato
bp	pares de base
BSA	albumina sérica bovina
cDNA	DNA complementar
céls	células
CMRL	meio "Connaught Medical Research Laboratories"
DCCT	"The Diabetes Control and Complications Trial Research Group"
DM	Diabetes mellitus
DNA	ácido desoxirribonucléico
dCTP	desoxi-citosina trifosfato
dNTP	desoxinucleotídeo trifosfato
EUA	Estados Unidos da América
GAPDH	gliceraldeído 3-fosfato-desidrogenase
HCl	ácido clorídrico
IEQ	"Islet Equivalents"
IPTG	L-isopropil- β -D-I-tiogalactopiranosídeo
Kb	kilo pares de base
LB	meio de "Luria-Bertani"
MEM	"Minimum Essential Medium"
MgCl ₂	cloreto de magnésio

MOPS	ácido 3-[N-Morpholino] propanosulfônico
mRNA	RNA mensageiro
NaOH	hidróxido de sódio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OD	densidade óptica
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PCR	reação em cadeia da DNA polimerase
PM	padrão de peso molecular
PP	Polipeptídeo pancreático
RDA	"representational difference analysis"
RNA	ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
RPMI	meio "Roswelll Park Memorial Institute"
RT	transcriptase reversa
SAGE	"serial analysis of gene expression"
SDS	dodecil sulfato de sódio
SFB	soro fetal bovino
SSH	"suppression subtractive hybridization"
TGF β	"transforming growth factor β "
X-gal	5-bromo, 4- cloro, 2-indolil, β -D-galactopiranosídeo

FIGURA 1 - Ilustração das etapas do processo de isolamento e purificação de ilhotas pancreáticas humanas	29
FIGURA 2 - Roteiro das principais etapas de execução do trabalho	33
FIGURA 3 - Ilustração da metodologia de construção de bibliotecas de subtração pela técnica "Suppression Subtractive Hybridization"	38
FIGURA 4 - Fotomicrografia (80X) da preparação de ilhotas humanas do pâncreas P03/02, corada com ditizona	53
FIGURA 5 - Fotomicrografia de fluorescência (200X) da preparação de ilhotas humanas do pâncreas P28/00, corada com laranja de acridina e iodeto de propídeo	54
FIGURA 6 - Fotomicrografia de contraste de fase (200X) da preparação de ilhotas humanas do pâncreas P09/99 em cultura aderente	55
FIGURA 7 - Curva de crescimento celular de ilhotas humanas do pâncreas P03/02, em resposta ao estímulo com 2,8 mM ou 11,2 mM de glicose	56
FIGURA 8 - Fracionamento de RNA total de ilhotas pancreáticas humanas através de eletroforese em gel de agarose-formaldeído	58
FIGURA 9 - Northern blot utilizando RNA total de ilhotas pancreáticas humanas hibridizado com sonda de insulina	58
FIGURA 10 - Fracionamento dos cDNAs de Ilhotas humanas do P09/99 em gel de agarose 1,2%, antes e após digestão com <i>Rsa</i> I	60
FIGURA 11 - Teste da eficiência de ligação dos cDNAs aos adaptadores	61
FIGURA 12 - Fracionamento em gel de agarose 2% dos produtos de PCR primário e secundário da subtração de ilhotas do pâncreas P09/99 tratadas com 11,2 mM glicose	62
FIGURA 13 - Teste da eficiência de subtração	63
FIGURA 14 - Rastreamento de 96 clones da biblioteca de subtração de ilhotas humanas do P09/99 tratadas com 11,2 mM de glicose	65

FIGURA 15 - Rastreamento de 768 clones (em duplicata) da biblioteca de subtração de ilhotas do P09/99 tratadas com 11,2 mM de glicose **66**

FIGURA 16 - Gráfico de distribuição dos índices* de densitometragem de 768 clones da biblioteca de subtração de ilhotas humanas do pâncreas P09/99 tratadas com 11,2 mM de glicose **67**

FIGURA 17 - Arranjo de DNA contendo 18 clones da biblioteca de subtração de ilhotas do P09/99 tratadas com 11,2 mM de glicose **71**

FIGURA 18 - Northern blot utilizando RNA total de ilhotas humanas do pâncreas P03/02, hibridizado com sonda de cDNA do clone 5 da biblioteca de subtração de ilhotas tratadas com 11,2 mM de glicose **72**

FIGURA 19 - Northern blot utilizando RNA total de ilhotas humanas do pâncreas P03/02, hibridizado com sonda de cDNA do clone 1 da biblioteca de subtração de ilhotas tratadas com 11,2 mM de glicose **73**

FIGURA 20 - Análise da seqüência do clone 1, utilizando o programa BLAST do GenBank, no banco de dados nr **75**

TABELA 1 - Resultados das análises de controle de qualidade das preparações de ilhotas pancreáticas humanas **52**

TABELA 2 - Análise das seqüências dos clones obtidos a partir da biblioteca de subtração de ilhotas humanas tratadas com 11,2 mM glicose, no GenBank, usando o programa BLAST **69**

1. Introdução

1.1 - *DIABETES MELLITUS*

Histórico

As primeiras referências ao *Diabetes* datam aproximadamente do ano 1500 AC, há mais de 3.000 anos. Os Papirus de Ebers, dos antigos egípcios, faziam referência a uma condição na qual ocorria uma eliminação excessiva de urina. Escritos de várias civilizações antigas (da Ásia Menor, China, Egito, Índia) também trazem referências a uma condição que se apresentava com sede excessiva, perda de peso, infecções e eliminação de uma grande quantidade de urina adocicada.

Muito mais tarde, na Grécia, no século I AC, Celsus fez a primeira descrição clínica da doença. Alguns anos depois, Aretaeus da Capadócia introduziu, pela primeira vez, o termo *Diabetes* (que em grego significa sifão ou "passagem de água através"), em referência à eliminação excessiva de urina, característica da doença.

Em 1869, na Alemanha, Paul Langerhans descreveu a existência, no pâncreas, de formações anatômicas diferentes do resto do tecido, sem conexão direta com os dutos, como que formando "ilhas celulares". A partir de então, estas formações passaram a ser denominadas "ilhas de Langerhans".

Em 1889, também na Alemanha, von Mehring e Minkowski induziram *Diabetes* em cachorros, após a remoção cirúrgica do pâncreas. Este *Diabetes* induzido assemelhava-se muito com a forma aguda e mais severa do *Diabetes* humano, inclusive ocasionando a morte dos animais, porém

não se manifestava quando um pedaço da glândula era deixado no animal ou quando fragmentos de pâncreas eram implantados sob sua pele. Este fato levantou a hipótese de que as alterações metabólicas induzidas após a remoção do pâncreas, poderiam não estar relacionadas à ausência de passagem de suco pancreático para o intestino, mas talvez à perda de alguma outra função da glândula.

Williams, em 1894, realizou a primeira tentativa de transplante clínico de tecido pancreático, ao implantar fragmentos de pâncreas de ovelha numa criança diabética de 15 anos. Esta foi também a primeira descrição de xenotransplante em humanos (WHITE *et al.*, 1999).

Na mesma época, alguns estudos passaram a sugerir a produção de determinadas substâncias, por certos órgãos similares a glândulas, porém sem dutos, as quais exerciam seus efeitos ao serem liberadas para o sangue. Estas substâncias foram posteriormente denominadas coletivamente de "hormônios", e os órgãos produtores, de glândulas endócrinas ou de secreção interna. Assim, no início da década de 1890, Laguesse sugeriu que as "ilhotas de Langerhans" poderiam ser as responsáveis pela produção desta secreção interna, tão importante para o metabolismo da glicose.

Em torno de 1900, patologistas observaram que as ilhotas pancreáticas encontravam-se danificadas em pessoas que morreram por causa de *Diabetes* grave. Tão logo foi estabelecida a ligação entre o pâncreas e o *Diabetes*, o tratamento da doença passou a ser feito através de extratos pancreáticos. Em 1908, em Berlim, Georg Zuelzer experimentou

tratar um paciente diabético que estava morrendo, com um extrato pancreático que ele chamou "acomatrol". Apesar de ter se mostrado indiscutivelmente efetivo, os efeitos colaterais deste composto extremamente impuro não permitiram a sua aplicação em nível terapêutico.

Em 1921, em Toronto, no Canadá, John Macleod, Frederick Banting e seu aluno Charles Best obtiveram extratos de pâncreas de cachorros. O duto pancreático destes animais havia sido obstruído, pois sabia-se que isto provocava a atrofia e destruição dos ácinos, mas não das ilhotas pancreáticas. Além de favorecer o aumento da quantidade de ilhotas neste material, eles trabalhavam com a hipótese de que a dificuldade para se conseguir um extrato pancreático eficaz, poderia ser ocasionada por um efeito adverso da tripsina produzida pelas células acinares, sobre a substância que eles tentavam obter. Neste momento, eles passaram a utilizar pâncreas de fetos bovinos e a purificação deste extrato foi então aperfeiçoada por James Collip, que havia sido integrado ao grupo, na tentativa de evitar a degradação prematura do hormônio pela tripsina. Em janeiro de 1922, após realizarem diversos experimentos que comprovaram a eficácia do produto, injetaram este extrato em Leonard Thompson, um menino de 14 anos sofrendo de *Diabetes mellitus* grave. Até aquele momento, os doentes que sofriam desta forma severa de *Diabetes* evoluíam inexoravelmente para a morte. Entretanto, após passar a receber as injeções de "isletin", como este fluido foi originalmente chamado, o seu nível de glicose no sangue caiu, ele ganhou peso e viveu até a idade adulta. Após melhoras no processo de purificação, o ingrediente mágico presente

naquele fluido passou a ser chamado de "insulin", e a descoberta de Banting e Best passou para a história como uma das mais importantes da Medicina. Em 1923, Macleod e Banting receberam o prêmio Nobel de Medicina pelo seu trabalho com a insulina.

O advento da tecnologia do DNA recombinante permitiu a produção, em 1978, da primeira insulina humana de DNA recombinante. Já em 1996 foi aprovado para uso o primeiro análogo de insulina humana recombinante (Lispro), de ação ultra-rápida.

Entretanto, como as pessoas diabéticas passaram a viver mais, observou-se que o uso da insulina em grande parte dos casos não evitava o aparecimento de uma série de doenças nestes pacientes, especialmente nos olhos, rins, coração, nervos e vasos sanguíneos. Assim, passou-se a suspeitar que os níveis glicêmicos alterados nestes pacientes poderiam ser a causa do aparecimento destas complicações e, ainda, que seria necessário o desenvolvimento de métodos que permitissem um melhor controle da glicemia nestes casos.

Definição

O *Diabetes mellitus* (DM) compreende um grupo clínica e geneticamente heterogêneo de doenças que apresentam, como característica comum, níveis elevados de glicose no sangue, com distúrbios no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas, conseqüente a uma produção ou ação deficiente da insulina pelo organismo, ou a ambas.

Classificação dos tipos de *Diabetes*

A classificação do *Diabetes* pode ser dividida em quatro grupos, segundo o "THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS, 2002": a) DM do tipo 1; b) DM do tipo 2; c) Outros tipos específicos de *Diabetes*, incluindo *Diabetes* secundário ou associado à outras patologias e d) DM gestacional.

DM do tipo 1

Esta forma era anteriormente denominada DM insulino-dependente ou *Diabetes* juvenil, sendo conseqüente à destruição das células β pancreáticas, por mecanismo de auto-imunidade mediada por células (DM tipo 1a) (ATKINSON *et al.*, 1994) ou por mecanismo idiopático, não auto-imune (DM tipo 1b). Manifesta-se geralmente na infância e adolescência, mas pode ocorrer em qualquer idade. Os sintomas clássicos na época do diagnóstico são: poliúria, sede, perda de peso e cansaço. A grande maioria dos pacientes torna-se dependente de insulina exógena para sobreviver, estando em risco de desenvolvimento de cetoacidose devido à total deficiência de insulina. A destruição auto-imune tem predisposição genética múltipla, além de um componente ambiental ainda desconhecido.

DM do tipo 2

Esta é a forma da doença previamente denominada DM não dependente de insulina ou *Diabetes* da maturidade. Estes pacientes geralmente apresentam resistência à ação da insulina, e uma deficiência

relativa de insulina, ao invés de absoluta. Apresenta associação com obesidade e manifesta-se predominantemente após os 40 anos, mas pode ocorrer em qualquer idade. Na maioria dos casos, não é necessário o uso de insulina para sobrevivência, mas pode ser necessário para correção da hiperglicemia. Tem uma forte predisposição genética (em torno de 60 a 90% dos gêmeos monozigóticos são concordantes para a doença), porém a genética desta forma da doença é extremamente complexa e pouco definida.

Epidemiologia

Em 1997, a Organização Mundial de Saúde estimava em 143 milhões o número de diabéticos no mundo. A projeção para o ano 2025 é de que atinja 300 milhões de pessoas, sendo que este aumento deverá ocorrer, em grande, parte nos países em desenvolvimento, principalmente devido ao crescimento e envelhecimento da população, à obesidade e aos fatores dietéticos e sedentarismo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998).

No Brasil, segundo estimativas do Ministério da Saúde, em 1996 existiam aproximadamente 5 milhões de diabéticos, 90% dos quais diabéticos do tipo 2 e 5-10% do tipo 1 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1996).

Nos EUA, segundo dados do National Institute of Diabetes & Digestive & Kidney Diseases (NIDDK), a prevalência de *Diabetes* no ano de 2000 era avaliada em 17 milhões de casos, correspondendo a aproximadamente 6,2% da população. Em relação ao DM do tipo 1, a prevalência estimada era de 300.000 a 500.000 indivíduos, com uma

incidência de 30.000 novos casos por ano (NATIONAL INSTITUTE OF DIABETES AND DIGESTIVE AND KIDNEY DISEASES, 2002).

Complicações crônicas

O DM tem associação com o desenvolvimento de diversas complicações crônicas nos indivíduos afetados (BROWNLEE, 2001), as quais são, em grande parte, responsáveis pelo aumento da morbimortalidade neste grupo de pacientes. O desenvolvimento destas complicações crônicas mostra íntima relação com os níveis de controle glicêmico obtidos pelos pacientes, conforme comprovou o estudo "The Diabetes Control and Complications Trial" (DCCT) (THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP, 1993). As principais complicações crônicas que ocorrem nestes pacientes são a retinopatia, nefropatia, cardiopatia, neuropatia e doença vascular periférica (NATIONAL DIABETES DATA GROUP, 1995).

A retinopatia diabética é a principal causa de cegueira e perda visual na população, ocasionada por lesão da microvasculatura da retina, induzida pela doença. Aproximadamente 12% dos diabéticos insulino-dependentes tornam-se cegos após 30 anos do início da doença (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2002a).

O *Diabetes* é uma das principais causas de nefropatia e insuficiência renal na população, mas a frequência varia com a população e está relacionada, também, à severidade e duração da doença. Aproximadamente 35-45% dos pacientes com DM do tipo 1 vêm a apresentar nefropatia, a

qual, no seu estágio terminal, impõe ao paciente a necessidade de diálise ou transplante renal.

Cardiopatía é responsável por aproximadamente 50% dos óbitos em pacientes diabéticos, em países industrializados.

A neuropatia diabética é, provavelmente, a complicação mais comum do *Diabetes*. Estima-se que mais de 50% dos pacientes desenvolvem algum grau de neuropatia, que pode levar à perda de sensibilidade, lesões nos membros e, em homens, impotência sexual.

Estima-se que entre 20-50% da população diabética sofra algum tipo de deficiência ou limitação física, incluindo o absenteísmo e limitação de atividades, devido ao desenvolvimento destas complicações crônicas. Em portadores de DM do tipo 1, aproximadamente 15% destes morrem após 25 anos do diagnóstico da doença, resultando em uma diminuição de pelo menos 15 anos na expectativa de vida desta população.

De extrema importância é o fato de que a maioria destas complicações pode ser evitada ou sua evolução retardada através de um controle adequado da glicemia e dos demais fatores de risco associados, conforme demonstra o estudo do DCCT (THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP, 1993). Neste estudo, o grupo de pacientes em terapia intensiva com insulina mostrou redução de aproximadamente 60%, no risco de desenvolvimento de retinopatia, nefropatia e neuropatia, em relação ao grupo em tratamento "standard", demonstrando a estreita relação entre o controle glicêmico e o desenvolvimento de complicações.

Complicações metabólicas agudas

As complicações metabólicas agudas do *Diabetes* incluem cetoacidose diabética, coma hiperosmolar não-cetótico e hipoglicemia. A cetoacidose e o coma hiperosmolar são consequência da deficiência de insulina, enquanto a hipoglicemia pode ser consequência do uso de hipoglicemiantes orais, mas é muito mais comum em pacientes tratados com insulina. O estudo do DCCT mostrou que a frequência de episódios de hipoglicemia era muito maior no grupo de pacientes em tratamento intensivo de insulina (THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP, 1993).

Métodos de tratamento

O tratamento não farmacológico do *Diabetes* tem como base a dieta e a atividade física. Em torno de 40% dos diabéticos necessitam tratamento com antidiabéticos orais, e outros 40% necessitam de aplicações de insulina para controle da glicemia.

Em relação ao DM do tipo 1, o tratamento convencional consiste na administração subcutânea de insulina exógena, geralmente em diversas aplicações diárias, não apenas para o controle glicêmico mas, também, para garantir a sobrevivência, tendo em vista a absoluta deficiência de insulina destes pacientes. Como descrito anteriormente, a manutenção de níveis estáveis de glicemia através de terapia intensiva tem sido correlacionado com menor incidência de complicações crônicas (THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP, 1993). Entretanto, a terapêutica

insulínica intensiva é considerada incômoda pela maioria dos pacientes, devido ao rigor necessário para manter níveis glicêmicos próximos ao da normalidade, além de induzir freqüentemente episódios de hipoglicemia grave. Por este motivo, requer monitorização freqüente da glicemia, tornando ainda mais difícil a aderência do paciente ao tratamento.

Dentre as alternativas terapêuticas atuais para a insulinoaterapia, somente os transplantes de pâncreas (órgão total) e o de ilhotas pancreáticas são capazes de recompor o padrão fisiológico de secreção de insulina e tornar o portador de DM do tipo 1 independente das aplicações diárias (BERNEY *et al.*, 2001; BOKER *et al.*, 2001; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2002b).

Até o ano de 2000, mais de 14.000 casos de transplante de pâncreas haviam sido registrados pelo International Pancreas Transplant Registry (IPTR). No período entre 1994 e 1998 foram registradas taxas de sobrevivência de um ano iguais a 94% para o paciente e de 82% para o enxerto pancreático (GRUESSNER *et al.*, 2000). O pâncreas transplantado é capaz de secretar insulina imediatamente após sua revascularização, induzindo completa independência de insulina exógena. Efeitos benéficos sobre as complicações crônicas da doença, como reversão parcial da neuropatia e um efeito protetor no rim transplantado conjuntamente, também têm sido demonstrados. Entretanto, o implante do órgão total, além de ser uma cirurgia que pode acarretar diversas complicações clínicas e cirúrgicas, requer terapia imunossupressora contínua para evitar a rejeição do órgão transplantado. Por este motivo, sua indicação é praticamente restrita

àqueles pacientes que necessitam também de um transplante de rim, para correção da insuficiência renal decorrente da nefropatia diabética. O transplante de pâncreas tem sido realizado isoladamente somente em pacientes com controle metabólico extremamente difícil, nos quais os riscos de hipoglicemia grave são mais sérios que os potenciais efeitos colaterais da terapia imunossupressora (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2002b).

Mais recentemente, o transplante de ilhotas também tem mostrado resultados favoráveis no tratamento de pacientes diabéticos do tipo 1 de difícil controle com insulino terapia exógena, ou em pacientes que necessitam de transplante renal conjunto (SHAPIRO *et al.*, 2000; BOKER *et al.*, 2001; ROBERTSON, 2001; BERTUZZI *et al.*, 2002; OBERHOLZER *et al.*, 2002). Apesar de também requerer terapia imunossupressora para evitar a rejeição do enxerto, o transplante de ilhotas pode ser uma alternativa ao transplante de pâncreas, com a vantagem de ser um procedimento cirúrgico muito mais simples do que este último.

1.2 - ILHOTAS DE LANGERHANS

As estruturas denominadas ilhotas pancreáticas ou de Langerhans foram descritas pela primeira vez em 1869, por Paul Langerhans. Ele as descreveu como formações anatômicas diferentes do resto do tecido, sem conexão direta com os dutos, como que formando "ilhas celulares". As ilhotas de Langerhans formam o chamado "pâncreas endócrino", sendo

compostas pelas células α , β , δ e PP, produtoras dos hormônios glucagon, insulina, somatostatina e polipeptídeo pancreático, respectivamente, além de células endoteliais e fibroblastos. Embora cada uma destas células endócrinas tradicionalmente seja associada à produção do seu hormônio clássico, mais de 20 hormônios diferentes, no total, são secretados pelas células das ilhotas na circulação portal. Estes hormônios são, em grande parte, responsáveis pela homeostase da glicose (MOLDOVAN *et al.*, 2001).

O tamanho das ilhotas varia entre 40 a 900 μ m sendo, cada uma, constituída de aproximadamente 2.000 células. As células β constituem entre 60-80% do total de células de uma ilhota. Num pâncreas humano adulto existem aproximadamente 1 milhão de ilhotas, que representam de 1 a 2% da massa do pâncreas, encontrando-se dispersas pelo parênquima.

1.3 - TRANSPLANTE DE ILHOTAS PANCREÁTICAS

O transplante de ilhotas pancreáticas inclui-se, atualmente, como uma das alternativas terapêuticas à insulino-terapia exógena que estão disponíveis para pacientes com DM do tipo 1, sendo, juntamente com o transplante de pâncreas órgão total, as únicas que restauram o padrão fisiológico de secreção de insulina (BOKER *et al.*, 2001; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2002b).

O transplante de ilhotas oferece vantagens potenciais comparado ao de pâncreas, em vários aspectos. Primeiro, exige um procedimento cirúrgico

mais simples, que geralmente é realizado pela injeção, na veia porta, das ilhotas isoladas, as quais se depositam no fígado. Como, em condições fisiológicas, a insulina secretada pelo pâncreas é conduzida pela circulação portal ao fígado (que utiliza e degrada de 50 a 90% da insulina secretada), este órgão é considerado um local adequado para o transplante de ilhotas, evitando a ocorrência indesejável de hiperinsulinemia sistêmica. Segundo, há a possibilidade de desenvolvimento de técnicas *in vitro* visando diminuir sua antigenicidade, em cultura pré-transplante (FRAGA *et al.*, 1998). Do mesmo modo, o imunoisolamento (encapsulamento) das ilhotas através de materiais biocompatíveis (polímeros, alginato), com permeabilidade seletiva à insulina e nutrientes, mas não aos agentes efetores da resposta imune, pode permitir a realização do transplante na ausência de imunossupressão. Esta condição seria a ideal, pois estenderia a aplicação do transplante à maioria dos pacientes diabéticos, além de potencialmente facilitar a realização de xenotransplantes e diminuir a demanda pelos escassos doadores de órgãos humanos (SOON-SHIONG *et al.*, 1994; MARIA-ENGLER *et al.*; 2001; TATARKIEWICZ *et al.*; 2001; DE VOS *et al.*, 2002). A possibilidade de cultura pré-transplante e o congelamento das ilhotas constituem uma vantagem adicional, que pode oferecer uma grande facilidade logística ao procedimento (WARNOCK *et al.*, 1991; BOTTINO *et al.*, 2002).

A idéia do transplante de ilhotas como uma alternativa ao tratamento do DM tipo 1 tomou impulso a partir de 1965, quando Moskalewski descreveu o uso da colagenase para o isolamento das ilhotas pancreáticas de cobaias, juntamente com o posterior aperfeiçoamento e adaptação da

técnica para o isolamento de ilhotas de rato, por Lacy e Kostianovsky (LACY *et al.*, 1967). Em seguida, BALLINGER *et al.*, 1972, demonstraram que as ilhotas transplantadas eram capazes de reverter o *Diabetes* em roedores.

Durante as décadas de 70 e 80, diversos transplantes clínicos foram realizados utilizando ilhotas alogênicas fetais ou xenogênicas, devido a ineficiência das técnicas de isolamento para aplicação em pâncreas adultos humanos. A informação disponível sobre a maioria destes casos é escassa, entretanto não se tem evidência de casos confirmados de insulino-independência (FEDERLIN *et al.*, 1992). O primeiro caso confirmado de insulino-independência em paciente com DM do tipo 1 foi divulgado por KOLB *et al.*, 1980, após transplante de ilhotas de um doador pediátrico.

Ainda na década de 80, a introdução de modificações no método de isolamento e purificação de ilhotas possibilitaram a sua aplicação para pâncreas humanos adultos (GRAY *et al.*, 1984). Em 1988, foi introduzida uma técnica automatizada que tornou possível o isolamento de um grande número de ilhotas viáveis a partir de pâncreas de doadores humanos (RICORDI *et al.*, 1988; RICORDI, 1992). Estes avanços permitiram que, em 1989, pela primeira vez, fosse demonstrada a reversão do *Diabetes* por um longo período (superior a 300 dias) em paciente com DM do tipo 1 (SCHARP *et al.*, 1989) e, por período superior a um ano, após o transplante de ilhotas alogênicas obtidas de um único doador, em pacientes com câncer abdominal nos quais o *Diabetes* era resultante de hepatopancreatectomia para retirada do tumor (TZAKIS *et al.*, 1990; RICORDI, TZAKIS *et al.*, 1992). Em pacientes com pancreatite crônica submetidos à pancreatectomia total, e

posterior autotransplante de ilhotas, também têm-se obtido prolongada independência da insulina exógena (FARNEY *et al.*, 1998; ROBERTSON *et al.*, 2001).

Entretanto, na maioria dos casos de transplante em DM do tipo 1, a taxa de sucesso permanecia extremamente baixa. Os dados apresentados pelo International Islet Transplant Registry (ITR) em 2001, referentes a 355 transplantes realizados no período entre 1990-1999, mostravam que apenas 11% dos casos atingiram independência de insulina pelo período de 1 ano após o transplante (INTERNATIONAL ISLET TRANSPLANT REGISTRY, 2001). Porém, em 2000, uma série de resultados favoráveis foi divulgada por um grupo da Universidade de Alberta, em Edmonton, no Canadá (SHAPIRO *et al.*, 2000). Este grupo introduziu diversas modificações no protocolo de transplante de ilhotas e, com isto, obteve independência de insulina, pelo período de 1 ano após o transplante, em todos os 7 pacientes acompanhados nesta série.

Os resultados deste novo protocolo, que passou a ser conhecido como "Protocolo de Edmonton", incentivaram o Governo dos EUA a financiar uma nova série de transplantes, incluindo 10 centros da América do Norte e da Europa, com o objetivo de reproduzir estes resultados. Este estudo encontra-se ainda em andamento, porém, dados preliminares divulgados em agosto de 2002 em Miami (EUA), durante o XIX Congresso Internacional da Sociedade de Transplantes, mostram um sucesso em torno de 83% dos casos, no primeiro ano de acompanhamento.

Dentre as modificações introduzidas neste protocolo, destacam-se a utilização de um novo esquema imunossupressor, com novas drogas (não foram utilizados corticosteróides, que são drogas diabetogênicas), uma técnica de isolamento que permite a obtenção de ilhotas de excelente viabilidade, além de uma massa total de ilhotas transplantadas por paciente que, na maioria dos casos, somente foi obtida com o isolamento das ilhotas de pâncreas de 2 ou 3 doadores de órgãos.

Apesar de alguns grupos relatarem casos de insulino-independência após isolamento e transplante de ilhotas obtidas a partir de um único doador, na maioria dos casos ainda são necessários de 2 a 3 isolamentos/transplantes por paciente. Além disto, mesmo que as técnicas de isolamento das ilhotas sejam aperfeiçoadas e se torne possível atingir níveis glicêmicos adequados após um único transplante, dificilmente a oferta de pâncreas de doadores será suficiente caso o transplante de ilhotas venha a se tornar uma terapia indicada para um número maior de pacientes diabéticos. Como a incidência de DM do tipo 1 é em torno de 30.000 novos casos por ano e a oferta de pâncreas de doadores, de apenas 3.000 (dados referentes aos EUA), a defasagem fica evidente (BONNER-WEIR *et al.*, 2000). Assim, um dos temas que passou a ser prioritário neste campo, foi a busca de técnicas que permitam a expansão do número de células β em culturas mantidas *in vitro*, pré-transplante (processo denominado de proliferação *ex vivo*) (GARCIA-OCANA *et al.*, 2001; SERUP *et al.*, 2001).

1.4 - PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS β PANCREÁTICAS

Além das flutuações momentâneas na secreção de insulina, induzidas pelas alterações glicêmicas, mudanças a longo prazo na massa de células β constituem uma importante forma de adaptação às variações na demanda sistêmica de insulina, necessárias para manutenção da euglicemia, em diferentes situações. Portanto, apesar de apresentar um potencial de replicação limitado, admite-se, atualmente, que a massa de células β de um pâncreas adulto é dinâmica, possuindo capacidade de proliferação (BONNER-WEIR, 2000; NIELSEN *et al.*, 2001; STEIL *et al.*, 2001; MARIA-ENGLER *et al.*, 2002). Este aumento no número de células β pode ocorrer por 2 mecanismos, ou seja: pela diferenciação a partir do epitélio ductal pancreático (neogênese) ou por replicação das células β já existentes. Neogênese ocorre principalmente nos estágios fetais e perinatais do desenvolvimento, mas tem sido observada, também, no pâncreas adulto em processo de regeneração (SMITH *et al.*, 1991), enquanto a replicação parece ser mais importante para manutenção da massa celular no pâncreas adulto (SWENNE, 1992).

Num pâncreas adulto normal, estima-se que a geração de novas células β , por divisão das já existentes, esteja em torno de 3% ao dia, e que este valor diminui rapidamente com a idade (SWENNE, 1983). Porém, a exemplo do que ocorre *in vivo*, tem sido demonstrada proliferação destas células induzida por diversos estímulos, especialmente por nutrientes como glicose, aminoácidos e ácidos graxos livres, e por diversos hormônios como

prolactina, lactogênio placentário, GH (hormônio do crescimento), IGF-1 ("insulin-like growth factor 1") e GLP-1 ("glucagon-like peptide 1") (BONNER-WEIR *et al.*; 1994; XU *et al.*, 1999; NIELSEN *et al.*, 2001).

A glicose é um importante fator modulador da expressão gênica em diferentes tipos celulares e organismos. Entretanto, os mecanismos moleculares responsáveis por esta modulação são apenas parcialmente conhecidos, podendo ser ocasionada diretamente pela glicose ou seu metabolismo ou, indiretamente, como efeito secundário das modificações na secreção de insulina e glucagon. Vários genes cujos produtos participam de vias metabólicas são transcricionalmente ativados por dietas ricas em carboidratos como, por exemplo, o da piruvato-quinase do tipo L (L-PK) e da acetil-CoA carboxilase (ACC), os quais apresentam elementos de resposta à glicose ou carboidratos na sua região promotora. Entretanto, para muitos outros, a participação direta ou indireta da glicose neste efeito transcricional ainda não é clara (MITANCHEZ *et al.*, 1997).

No pâncreas, o principal gene responsivo à glicose é o da insulina. Em condições fisiológicas, a elevação da glicemia provoca, nas células β das ilhotas, a liberação da insulina armazenada nos grânulos secretórios, um aumento da biossíntese de insulina através da estimulação da tradução de seu RNA mensageiro (mRNA) e um aumento dos níveis de mRNA de insulina em consequência de sua estabilização e da ativação transcricional. Sabe-se que o metabolismo da glicose é necessário para estimulação da transcrição do gene da insulina (DOCHERTY *et al.*, 1994), porém a natureza exata dos intermediários derivados da glicose que regulam a expressão

deste gene não é conhecida. Na região promotora do gene, vários elementos responsáveis pela limitação da transcrição às células β e pela regulação da sua taxa de transcrição, já foram caracterizados (WALKER *et al.*, 1983; EDLUND *et al.*, 1985).

Além dos efeitos na expressão do gene da insulina, a glicose é reconhecidamente capaz de estimular a proliferação de células β . Em ratos, a infusão contínua de glicose por 96 horas levou a um aumento de 50% na massa de células β , às custas de hipertrofia e hiperplasia celulares (BONNER-WEIR *et al.*, 1989). *In vitro*, também foram descritos efeitos dose-dependentes da glicose sobre a proliferação de células β , porém em níveis bem menores aos observados *in vivo*. SCHUPPIN *et al.*, 1993, relataram uma resposta máxima de 1% de células β dividindo-se, em 4 horas de estímulo com 16,7 mM de glicose, um valor pequeno porém 10 vezes maior do que aquele observado em células expostas a 5,5 mM. Assim como na estimulação da transcrição do gene da insulina, o metabolismo da glicose parece ser necessário para induzir a proliferação das células β . Porém, não são claros os sinais secundários gerados por este metabolismo, que levam ao aumento da divisão celular (BONNER-WEIR, 1992).

O estudo realizado por SJÖHOLM, 1997, sugere que o efeito mitogênico da glicose em células β requer a sinalização via proteínas ligadoras de GTP e ativação de proteína-quinase C (PKC). Por outro lado, YAMASHITA *et al.*, 1988, mostraram o aumento da expressão do transcrito correspondente ao proto-oncogene *c-myc* em células da linhagem de

insulinoma murino RIN estimuladas com glicose, o qual era acompanhado da indução da proliferação destas células. Este aumento de expressão de *c-myc* foi também demonstrado em ilhotas de rato, por JONAS *et al.*, 2001. SUSINI *et al.*, 1998, mostraram o aumento da transcrição dos genes de resposta primária *c-fos*, *c-jun*, *junB*, *zif-268* e *nur-77* em células de insulinoma murino INS-1, o qual ocorria após apenas 1 hora de estímulo com glicose, sugerindo uma possível relação com o efeito proliferativo da glicose em células β .

1.5 - MÉTODOS DE ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL

A identificação do conjunto de genes diferencialmente expressos por uma célula, tecido ou organismo numa determinada condição, em relação ao conjunto de genes expressos em outra situação com a qual se deseja comparar, pode permitir a compreensão dos fatores necessários ou responsáveis pela manifestação do fenótipo diferencial. Entretanto, em geral esta é uma análise extremamente difícil, devido à complexidade de RNAs transcritos pela célula e pela existência de grande variação entre o nível de expressão de diferentes transcritos. Além disto, para muitos genes, a diferença no nível de expressão entre as condições que se quer comparar pode ser muito pequena, dificultando ainda mais a identificação.

Diversas técnicas foram desenvolvidas, recentemente, para a identificação de genes diferencialmente expressos, dentre as quais

podemos citar o "differential display", a "serial analysis of gene expression" (SAGE), os "microarrays" de DNA, e as técnicas baseadas em hibridização subtrativa, como a "representational difference analysis" (RDA) e a "suppression subtractive hybridization" (SSH).

O "differential display" se baseia na amplificação de uma subpopulação de fragmentos dos genes expressos, usando "primers" arbitrários. Os fragmentos amplificados são separados em gel de seqüenciamento e comparados entre as condições experimentais. As bandas diferenciais são cortadas, purificadas do gel e identificadas por seqüenciamento de DNA (LIANG *et al.*, 1992).

Nas metodologias de hibridização subtrativa, as amostras de cDNA contendo os genes diferencialmente expressos que se quer identificar, são ligadas a adaptadores em sua porção 5', desnaturadas e renaturadas na presença de excesso de cDNA da condição controle. Na etapa seguinte, os híbridos diferencialmente expressos contendo adaptadores nas duas extremidades são seletivamente amplificados por PCR. Os cDNAs obtidos são clonados, gerando uma biblioteca enriquecida para genes diferencialmente expressos. No RDA, esta hibridização pode ser executada diversas vezes, gerando bibliotecas altamente enriquecidas (HUBANK *et al.*, 1994). No SSH, é feita uma adaptação para permitir que, juntamente com a hibridização, ocorra normalização das seqüências pouco expressas, em relação àquelas mais abundantes (GURSKAYA *et al.*, 1996).

O SAGE baseia-se no princípio de que seqüências curtas de 9 pares de base são suficientes para identificar, inequivocamente, todos os

mensageiros expressos. Assim, os cDNAs são gerados com oligo-dT biotinilado e digeridos com uma enzima que reconhece 4 pares de base. Os fragmentos correspondentes à porção 3' final dos mensageiros são capturados por estreptavidina ligada a "beads", e seletivamente purificados. No sítio da enzima de restrição destas regiões é ligado um adaptador contendo um sítio para *BsmF1*, uma enzima que cliva a 12 pares de base de sua sequência de reconhecimento. Assim, após digestão com esta enzima, cada mensageiro gera um único "tag" (etiqueta) de 9 pares de base, a partir do sítio de reconhecimento da enzima que reconhece 4 pares de base mais 3' do mensageiro. Os "tags" são ligados entre si e seqüenciados, gerando uma tabela de frequência de cada "tag". Comparando esta tabela entre as condições que se quer comparar a expressão gênica, os genes diferencialmente expressos são identificados (VELCULESCU *et al.*, 1995).

Na técnica de microarranjos de DNA ("microarrays"), seqüências conhecidas de cDNA de milhares de genes são organizadas sobre lâminas de vidro. As duas populações de mRNA que se quer comparar são transcritas a cDNA, cada uma das quais na presença de nucleotídeos marcados com fluorocromos diferentes. A seguir, os cDNAs marcados com fluorocromos são desnaturados, misturados na mesma proporção e hibridizados com os cDNA fixados na lâmina. As lâminas são expostas à luz de comprimentos de onda apropriados e os sinais registrados através de imagens. A comparação entre as duas imagens geradas permite a identificação dos genes diferencialmente expressos (SCHENA *et al.*, 1995).

Cada uma destas técnicas apresenta vantagens e desvantagens, sendo que nenhuma delas é, atualmente, perfeita.

O "differential display" tem como vantagem o fato de ser um processo relativamente rápido, além de permitir trabalhar com pequena quantidade de amostra inicial. Entretanto, esta técnica apresenta uma alta taxa de falsos-positivos, tendo como alvo, geralmente, mRNAs de média abundância. Por este motivo, em geral a análise é restrita a apenas uma parcela dos cDNAs. As bibliotecas de subtração são muito sensíveis e eficientes, porém trabalhosas (AUSUBEL *et al.*, 1999). O SAGE permite a análise de muitas amostras ao mesmo tempo, porém exige seqüenciamento automatizado em grande escala para se chegar às seqüências pouco expressas. Os "microarrays" são extremamente rápidos e eficientes, mas só identificam genes ou seqüências já conhecidas, além de serem relativamente caros (SOARES, 1997; KOZIAN *et al.*, 1999).

A escolha da metodologia de hibridização subtrativa SSH para a realização deste trabalho foi baseada nos seguintes aspectos: a) pelo seu custo relativamente baixo; b) a possibilidade de identificação de novos genes e c) o enriquecimento da biblioteca para genes pouco abundantes (GURSKAYA *et al.*, 1996; O'NEILL *et al.*, 1997; AUSUBEL *et al.*, 1999; VEDOY *et al.*, 1999). Destacamos, ainda, a experiência acumulada no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, onde foram desenvolvidas duas teses de Doutorado utilizando esta metodologia (VEDOY, 2000; BENGTON, 2002).

2. Objetivos

OBJETIVO GERAL:

Estabelecer a tecnologia de obtenção de ilhotas pancreáticas humanas, para realizar o isolamento e a caracterização de genes regulados por glicose neste tecido.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Estabelecimento da metodologia para isolamento, purificação e cultura de ilhotas pancreáticas humanas, utilizando a técnica automatizada clássica, acompanhada das modificações introduzidas pelo "Protocolo de Edmonton".
2. Caracterização do efeito da glicose sobre a proliferação celular em ilhotas pancreáticas humanas, através do cultivo das ilhotas em meio de cultura contendo diferentes concentrações de glicose e avaliação do crescimento celular.
3. Construção de uma biblioteca subtraída de cDNAs de ilhotas humanas submetidas ao tratamento com glicose, para o isolamento e a caracterização de genes regulados por este agente mitogênico de células β pancreáticas.

3. Material e Métodos

3.1 - ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE ILHOTAS PANCREÁTICAS HUMANAS

As ilhotas pancreáticas humanas foram obtidas a partir de pâncreas de doadores cadavéricos humanos consentidos, utilizando critérios estabelecidos para seleção de doadores (>18 anos de idade; sem história familiar de *Diabetes*; glicemia <200 mg/dl; amilase <85 UI/l; sem uso de dopamina ou em doses <15 µg/Kg/min; tempo de isquemia fria do órgão <8 horas) (LAKEY *et al.*, 1996), além de sorologias negativas para HIV, HTLV I/II, Hepatites B e C, CMV, Doença de Chagas e Sífilis, e história e sinais clínicos negativos para alcoolismo crônico ou intoxicação por álcool. Os pâncreas foram retirados dos doadores pelos cirurgiões que fazem parte da equipe da Unidade de Ilhotas Pancreáticas Humanas do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, através de técnica cirúrgica convencional para retirada de pâncreas para transplante, imersos em frasco estéril contendo solução de Viaspan (Du Pont Pharma - Wilmington, DE, EUA) e encaminhados ao laboratório em recipiente contendo gelo. Após o recebimento do pâncreas no laboratório, o isolamento e purificação de ilhotas foi realizado segundo a técnica descrita por RICORDI *et al.*, 1988, com as alterações introduzidas pelo grupo da Universidade de Alberta, em Edmonton, Canadá (SHAPIRO *et al.*, 2000).

Inicialmente, o pâncreas foi dissecado para remoção de vasos e gordura peri-pancreática, sem danificar a cápsula pancreática. Em seguida, foi realizada a introdução de uma cânula flexível Introcan (Laboratórios

B.Braun S/A - São Gonçalo, RJ, Brasil), calibre 18, no duto pancreático principal, com a finalidade de realizar a perfusão da solução enzimática no pâncreas, como descrito a seguir. A Figura 1 ilustra as principais etapas do processo de isolamento e purificação.

FIGURA 1 - Ilustração das etapas do processo de isolamento e purificação de ilhotas pancreáticas humanas (Reproduzido de LAKEY et al., 2001)

Para realizar a digestão da matriz colagênica do pâncreas e, assim, promover a separação entre as ilhotas e o tecido exócrino pancreático, foi realizada a perfusão no pâncreas, de uma solução de collagenase especial, chamada Liberase HI (Roche Diagnostics Corporation - Indianapolis, IN, EUA). A perfusão do pâncreas com esta solução enzimática foi realizada numa câmara especial, denominada câmara de perfusão, desenvolvida na

Universidade de Alberta, sob pressão (80 mmHg durante 5 minutos e 180 mmHg nos 5 minutos seguintes) e temperatura (4°C) controladas, através da cânula mencionada anteriormente.

Após esta perfusão, o pâncreas foi cortado em aproximadamente 10 pedaços, e a digestão foi realizada numa câmara especial, denominada câmara de digestão ou câmara de Ricordi, sob agitação, com temperatura controlada (37°C) e recirculação da solução enzimática através de bomba peristáltica Masterflex (Cole-Parmer Instrument Co - Vernon Hills, IL, EUA), durante aproximadamente 20 a 25 minutos. No interior desta câmara coloca-se uma tela contendo orifícios de 500 µm, permitindo que o tecido pancreático já digerido possa recircular juntamente com a solução, enquanto os fragmentos de tamanho maior sejam retidos na câmara. Durante esta etapa, a monitoração da digestão é realizada colhendo-se amostras de material, as quais são submetidas à coloração com solução de difeniltiocarbazona (ditizona) (Sigma Chemical Co - St Louis, MO, EUA), que cora o zinco (Zn²⁺) nas células β das ilhotas, onde este encontra-se complexado à insulina. Ao atingir uma separação adequada entre as ilhotas e o tecido exócrino, a digestão é interrompida por resfriamento, diluição e adição de albumina humana (LFB Laboratoire - Courtaboeuf, França) ao sistema. O material resultante desta digestão é lavado com meio MEM (Invitrogen Corporation - Grand Island, NY, EUA), centrifugado (250 x g por 1 minuto, a 4°C) para remoção da solução enzimática, e submetido a um processo de purificação, por centrifugação em gradiente contínuo de Ficoll (Biochrom AG - Berlin, Alemanha), utilizando o processador de células

COBE 2991 (Gambro BCT Inc - Lakewood, CO, EUA). As frações do gradiente contendo as ilhotas são recolhidas, lavadas em meio 199 (Invitrogen) para remoção do Ficoll e concentradas por centrifugação. A preparação final é ressuspendida em meio 199 e amostras são coradas com ditizona para contagem do número de ilhotas obtidas e avaliação da pureza da preparação.

3.2 - AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS

A análise de viabilidade morfológica das ilhotas foi realizada no dia seguinte ao isolamento, através de dupla coloração com iodeto de propídeo 150 $\mu\text{mol/l}$ e laranja de acridina 290 $\mu\text{mol/l}$ (Sigma) que coram, respectivamente, células mortas e células vivas, seguida de observação sob microscópio de fluorescência Nikon FluoPhot (Nikon Corporation - Tokyo, Japão) (BANK, 1988).

A atividade funcional das ilhotas pancreáticas foi avaliada no dia seguinte ao isolamento, incubando-se uma quantidade conhecida de ilhotas (1000 IEQ¹ para as preparações do pâncreas P09/99 e P02/02; 500 IEQ para o P03/02 e 200 IEQ para o P28/00 e P29/00) em meio RPMI 1640 (Invitrogen) contendo 2,8 mM de glicose (Sigma) e outra em meio contendo 20 mM de glicose, durante 2 horas. Alguns experimentos foram realizados

¹ IEQ ou *Islet Equivalents*, é o termo utilizado para indicar a quantidade de ilhotas numa amostra, com o tamanho das ilhotas normalizado para 150 μm de diâmetro.

incubando-se as ilhotas em meio CMRL 1066 (Invitrogen) contendo 5,6 mM de glicose ou 11,2 mM de glicose, durante 1 hora. Após este período, o sobrenadante das culturas foi recolhido para dosagem de insulina, por eletroquimioluminescência, no Laboratório CRIESP (São Paulo, SP, Brasil). O índice obtido dividindo-se a produção de insulina em alta concentração de glicose pelo valor obtido na presença de baixa concentração de glicose, foi utilizado para avaliação da viabilidade das ilhotas (RICORDI, HERING *et al.*, 1992).

Após as análises de viabilidade, as ilhotas foram utilizadas para o estímulo com glicose e a construção da biblioteca de subtração. A Figura 2 apresenta um roteiro das principais etapas de execução do trabalho.

FIGURA 2 - Roteiro das principais etapas de execução do trabalho

3.3 - CULTURA DE ILHOTAS PANCREÁTICAS E ESTÍMULO COM GLICOSE

Após o isolamento, as ilhotas pancreáticas foram mantidas em cultura aderente em monocamada, em meio CMRL 1066 contendo glicose na concentração de 5,6 mM e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab - Campinas, SP, Brasil), em estufa umidificada Thermo Forma Series II (Thermo Forma - Marietta, OH, EUA) a 37°C, em atmosfera de 5% CO₂, até serem utilizadas para o estímulo com glicose.

Para o estímulo com glicose, as ilhotas foram previamente lavadas 3 vezes com meio RPMI sem glicose, e cultivadas durante 4 horas em meio RPMI contendo glicose na concentração de 2,8 mM, para sincronização das células no ciclo celular. Em seguida, uma amostra foi incubada em meio RPMI contendo 2,8 mM e a outra em meio RPMI contendo 11,2 mM de glicose, por 2 horas. Após estas 2 horas, as ilhotas foram lisadas para extração de RNA total.

3.4 - CURVA DE CRESCIMENTO CELULAR

A caracterização do estímulo proliferativo de glicose nas ilhotas foi realizado através de curva de crescimento celular. Para isto, aproximadamente 5×10^4 células de ilhotas humanas do pâncreas P03/02, cultivadas em substrato plástico (cultura aderente) foram plaqueadas em 20

placas P35, em duplicata. Após 24 horas de cultivo em meio CMRL 1066 contendo 10% SFB, as células foram lavadas com tampão PBS e, a seguir, foi adicionado meio RPMI contendo 2,8 mM de glicose e 1% SFB, durante 24 horas, para sincronização no ciclo celular. A seguir, o meio foi trocado e em metade das placas foi adicionado meio RPMI contendo 2,8 mM glicose e 5% SFB e, na outra metade, meio RPMI contendo 11,2 mM glicose e 5% SFB. A cada 2 dias após o início do estímulo, as células de 2 placas de cada condição foram lavadas com tampão PBS sem cálcio e magnésio (3x), recolhidas da garrafa plástica por tripsinização (0,1%) (ICN Pharmaceuticals Inc - Costa Mesa, CA, EUA), diluídas em formaldeído (Merck KGaA - Darmstadt, Alemanha) 4% em volume final de 1 ml e conservadas a 4°C até o momento da contagem. No total, foram realizadas cinco coletas de cada condição, em duplicata. A contagem foi realizada em contador de células CELM CC530 (Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos - Barueri, SP, Brasil). Os resultados foram analisados utilizando-se o software GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software - San Diego, CA, EUA).

3.5 - EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE RNA TOTAL

As culturas de ilhotas em diferentes condições de estímulo foram lavadas (3x) com PBS gelado e lisadas com solução de isotiocianato de guanidina 4 M, citrato de sódio 25 mM (pH 7,0) e β -mercaptoetanol 0,1 M.

Os lisados foram transferidos para tubos de polialômero contendo solução de cloreto de cézio 5,7 M e acetato de sódio 25 mM (pH 5,0), e

centrifugados a 130.000 x g por 17 horas a 20°C (CHIRGWIN *et al.*, 1979). O RNA, sedimentado no fundo dos tubos, foi ressuspensão em água bidestilada estéril. A concentração do RNA na amostra foi determinada em espectrofotômetro, pela absorbância das preparações a 260 nm, utilizando, como valor padrão, 1 OD₂₆₀ = 40 µg/ml de RNA. O grau de pureza foi avaliado pela relação OD 260/280 nm, que deve ser próxima a 2,0 para ácidos nucleicos. A qualidade dos RNAs foi analisada, também, através de fracionamento por eletroforese em gel de agarose 1% e formaldeído 2,2 M. A seguir, as amostras foram congeladas a -70°C até utilização para construção das bibliotecas de cDNA e para realização de Northern blot.

3.6 - SÍNTESE DE cDNAs

Os RNAs extraídos das amostras de ilhotas tratadas em alta e baixa concentração de glicose foram utilizados para síntese de cDNAs, através da metodologia "SMART PCR cDNA Synthesis" (BD Biosciences Clontech - Palo Alto, CA, EUA), conforme instruções do manual. Na reação de transcrição reversa foi adicionado inibidor de RNase "RNase OUT Recombinant RNase Inhibitor" (Invitrogen), com o objetivo de inibir a degradação do RNA nesta etapa.

O kit "SMART PCR cDNA Synthesis" faz uso da atividade transferase terminal da enzima Transcriptase Reversa (RT) para ancorar iniciadores na porção 5' terminal de todos os cDNAs sintetizados. Esta atividade faz com

que, ao chegar à porção 5' final do mRNA, a enzima catalise a adição de uma pequena repetição de citosinas na fita de cDNA sintetizada. Isto se deve ao fato do kit conter um iniciador que, por possuir uma região rica em guaninas, se anela com o poli-C adicionado e passa a servir como molde para a RT. Desta forma, uma região do iniciador é adicionada ao cDNA. A seguir, usando-se um iniciador para esta região e para a porção poli-A do mensageiro, os cDNAs completos sintetizados foram amplificados por "Long Distance PCR", na fase exponencial de reação (20 ciclos neste caso). Os cDNAs incompletos, os RNAs ribossômicos e o DNA genômico não são amplificados, pois não possuem sítios de anelamento para estes iniciadores, garantindo um cDNA completo de alta qualidade.

As amostras de cDNAs assim sintetizados foram quantificadas determinando-se a absorbância das preparações a 260 nm e considerando-se, como valor padrão, $1 \text{ OD}_{260} = 50 \mu\text{g/ml}$ de DNA.

3.7 - CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE SUBTRAÇÃO DE cDNAs

As amostras de cDNAs geradas anteriormente foram utilizadas para construção da biblioteca de subtração de cDNAs, através da metodologia "Suppression Subtractive Hybridization" (GURSKAYA *et al.*, 1996), utilizando-se o kit "PCR Select cDNA Subtraction" (BD Biosciences Clontech). O esquema desta metodologia está apresentado na Figura 3.

FIGURA 3 - Ilustração da metodologia de construção de bibliotecas de subtração pela técnica "Suppression Subtractive Hybridization" (Reproduzido de GURSKAYA *et al.*, 1996)

A população de cDNAs contendo os genes diferencialmente expressos (neste caso, da amostra de ilhotas tratada em alta concentração de glicose) foi chamada "tester", enquanto a amostra controle foi chamada "driver". Os cDNAs de ambas as amostras foram digeridos com a enzima de restrição *RsaI* (Invitrogen), com o objetivo de reduzir a complexidade dos fragmentos e de gerar mais representações de cada cDNA. A seguir, a amostra de cDNAs "tester" foi dividida em duas porções, sendo cada uma ligada a um adaptador diferente. Cada um destes dois adaptadores inclui uma sequência diferente de anelamento de iniciadores para PCR, e também uma única extremidade fosforilada, a fim de permitir a ligação direcional aos fragmentos de cDNA. A ligação destes adaptadores é essencial para o funcionamento adequado da subtração, sendo necessário que pelo menos em torno de 25% dos fragmentos esteja ligado. A eficiência da ligação foi verificada através da amplificação de fragmentos de GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase), por PCR, utilizando-se dois conjuntos de iniciadores. Um destes conjuntos é desenhado para amplificar todo fragmento de GAPDH presente na amostra, enquanto o outro amplifica somente fragmentos de GAPDH ligados ao adaptador. Os produtos destes PCRs foram submetidos à eletroforese em gel de agarose e a intensidade das bandas foi comparada, fornecendo uma indicação da porcentagem de fragmentos ligados em relação ao total.

Após a ligação dos adaptadores foi, então, realizada a hibridização subtrativa, em duas etapas. Na 1ª hibridização subtrativa os cDNAs foram desnaturados por calor (95°C) e adicionou-se cDNA "driver" em excesso de

50 vezes, a cada uma das amostras "tester" contendo um dos dois diferentes adaptadores. A temperatura foi, então, reduzida a 68°C e as amostras hibridizadas durante 8 horas, ocorrendo uma renaturação parcial. Devido à cinética de hibridização ser de segunda ordem, as moléculas mais abundantes sofrem reanelamento mais rápido, ocorrendo uma equalização entre as seqüências simples-fita. Ao mesmo tempo, as moléculas simples-fita de seqüências diferencialmente expressas são enriquecidas em relação às não diferencialmente expressas, as quais tendem a formar híbridos com o "driver", pelo fato deste estar super representado.

A 2ª hibridização subtrativa foi realizada misturando-se as duas amostras da 1ª hibridização juntamente com a adição de mais "driver" desnaturado, durante 12 horas a 68°C. Assim, somente as moléculas simples-fita equalizadas e diferencialmente expressas devem reassociar, formando híbridos com adaptadores terminais diferentes (provenientes das duas amostras de "tester").

A seguir, foi realizado o preenchimento das pontas dos cDNAs com *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). O PCR primário, para amplificação inicial dos fragmentos subtraídos, foi realizado utilizando-se dois iniciadores ("primers") diferentes, com seqüências complementares a cada um dos dois diferentes adaptadores. Nesta etapa, as moléculas contendo o mesmo adaptador nas duas pontas não são amplificadas adequadamente pois, devido à sua complementaridade, ocorre uma tendência destas pontas anelarem entre si (efeito supressivo). Para obter-se uma especificidade maior, o PCR secundário para amplificação dos fragmentos diferencialmente

expressos foi realizado com uma alíquota diluída (1:100) do PCR primário e reamplificado utilizando iniciadores com sítios de anelamento internos aos do PCR primário ("nested primers").

A eficiência de normalização/subtração desta biblioteca de subtração foi testada diluindo-se uma alíquota do produto do PCR secundário e amplificando-se esta amostra, por PCR, com iniciadores para GAPDH e números variáveis de ciclos (18, 23, 28 e 33 ciclos). A indicação do nível de normalização obtido, foi realizado comparando-se o número extra de ciclos de PCR necessários para amplificação do fragmento de GAPDH na amostra subtraída em relação à amostra controle (não subtraída).

3.8 - CLONAGEM DOS FRAGMENTOS DE cDNA DA BIBLIOTECA DE SUBTRAÇÃO E TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

Os fragmentos de cDNA da biblioteca de subtração amplificados no PCR secundário (100 µl) foram purificados em colunas "GFX PCR DNA and Gel Band Purification" (Amersham Biosciences - Buckinghamshire, Inglaterra) e eluídos em 50 µl de água estéril. Estas colunas são feitas de matriz de fibra de vidro, nas quais o DNA se liga na presença de agentes caotrópicos, permitindo sua purificação com remoção de proteínas, nucleotídeos, sais e fragmentos pequenos de DNA, tais como iniciadores ("primers").

Os cDNAs purificados foram preenchidos e fosforilados em reação catalisada por Klenow (5 U) (Invitrogen) e Polinucleotídeo quinase (10 U) (Invitrogen), em tampão 3,3 mM Tris-acetato (pH 7,9), 1 mM acetato de magnésio, 6,6 mM acetato de potássio e 0,01 mg/ml BSA, adicionado de 1 µl de dNTPs (10 mM cada) e 3 µl de ATP 10 mM, incubando-se a 37⁰C por 45 minutos.

Após nova purificação em colunas GFX, um quinto dos fragmentos puros foi ligado com 100 ng de vetor plasmideal pUC18 *Sma*I/BAP. Para esta reação, foram utilizadas 400 U de T4 DNA ligase (Invitrogen) em tampão 10 mM Tris-acetato, 10 mM acetato de magnésio, 50 mM acetato de potássio, por 16 horas à temperatura ambiente.

O produto desta reação de ligação foi utilizado para transformar bactérias *E. coli* DH5α eletrocompetentes, por eletroporação, como descrito a seguir. Quarenta microlitros de bactérias eletrocompetentes foram transferidas para cubetas estéreis de 2 mm de espessura, geladas, às quais foi acrescentado 1 µl da ligação. Após 1 minuto no gelo, a cubeta foi colocada no aparelho Eletroporator EC 100 (EC Apparatus Corporation - Holbrook, NY, EUA), e submetida a uma tensão de 2,8 kV e 120 Ω. As bactérias foram imediatamente ressuspendidas em 1 ml de meio LB e crescidas a 37⁰C por 1 hora, em "shaker" a 200 rpm. A seguir, as bactérias foram plaqueadas em meio LB-ágar contendo 50 µl/ml IPTG, 225 µl/ml X-gal e 75 µl/ml ampicilina. Colônias brancas (transformadas) foram selecionadas

e crescidas em microplacas de 96 poços, em meio LB contendo 100 µg/ml de ampicilina, por 16 horas, e congeladas em 15% glicerol.

Preparo de bactérias eletrocompetentes: 10 ml de uma cultura fresca de *E. coli* DH5α crescida por 16 horas, foram inoculados em 1 litro de meio LB e esta cultura foi incubada a 37°C até atingir uma OD₆₀₀ de 0,7. Neste ponto, as bactérias foram transferidas para gelo e, após 30 min, coletadas por centrifugação a 4.000 x g por 15 min, em centrífuga refrigerada. O meio de cultura foi drenado completamente e as células ressuspensas em 1 litro de água gelada estéril. Os passos de coleta e ressuspensão foram repetidos por 3 vezes, sendo que o litro de água foi trocado por 0,5 litro de água, 20 ml de 10% glicerol gelado e, por fim, 2 ml de 10% glicerol. A seguir, as bactérias foram aliquotadas e estocadas a -70°C até o momento do uso.

3.9 - CONSTRUÇÃO DE MACROARRANJOS DE DNA

Os fragmentos clonados de cDNA da biblioteca de subtração foram amplificados por PCR e utilizados para a geração de macroarranjos de DNA, como descrito a seguir. Estes macroarranjos foram utilizados para o rastreamento de clones diferencialmente expressos na biblioteca.

PCR de colônia

Amostras (aproximadamente 1 µl) de clones bacterianos contendo fragmentos de cDNA da biblioteca de subtração, crescidos em microplacas

de 96 poços, foram transferidos para placas de PCR contendo 14 µl de mix de PCR (1.226 µl de água estéril, 150 µl de tampão de PCR 10X, 45 µl de $MgCl_2$ 50 mM, 19 µl de dNTP a 10 mM cada, 25 µl de iniciadores M13 a 10 µM e 10 µl de *Taq* DNA Polimerase 5 U/µl, para cada 100 reações). A reação foi submetida à temperatura de 95°C por 4 min para lise inicial das bactérias, seguido de 95°C por 45 s para desnaturação, 57°C por 45 s para anelamento, 72°C por 1 min para extensão, por 40 ciclos, e extensão final a 72°C por 5 min. O produto da reação foi fracionado em gel de agarose 1%, em tampão TAE 1X.

Preparo das membranas de 96 amostras

Os produtos de PCR foram desnaturados acrescentando-se 15 µl de NaOH 0,6 N e, em seguida, aplicados sobre membranas de nylon Hybond-XL (Amersham Biosciences), utilizando-se o aparelho Hydra (Thomas Scientific - Swedesboro, NJ, EUA). As membranas contendo as amostras de cDNA foram neutralizadas em solução de 0,5 M Tris-HCl (pH 7,5) e secas ao ar. O cDNA foi fixado nas membranas em forno a 80°C, por 2 horas.

Preparo das membranas de 1.536 amostras

Membranas de nylon Hybond-XL (Amersham Biosciences) foram hidratadas em água por 10 min e drenadas para remover o excesso de água. A seguir, os produtos de PCR de colônia foram aplicados nas membranas utilizando um sistema de aplicação manual ("spotter") "Exprecision DNA Arraying System" (Bioinformática Ltda - São Paulo, SP,

Brasil), conforme protocolo adaptado de SCHUMMER *et al.*, 1997. Este sistema permite a aplicação de 1.536 amostras em cada membrana, transferindo um volume de 0,1 µl de cada amostra de PCR (numa concentração em torno de 225 ng/µl). Assim, foram transferidos 768 clones da biblioteca de subtração, em duplicata. Entre cada aplicação, o "spotter" foi lavado com solução de hipoclorito de sódio 10%, seguido de água Milli-Q e flambagem. Os cDNAs foram desnaturados embebendo-se as membranas em solução de NaOH 0,6 N, por 10 min, e neutralizados em 0,5 M Tris-HCl (pH 7,5), por 5 min. O cDNA foi fixado nas membranas em forno a 80°C, por 2h.

Preparo das membranas contendo 18 clones selecionados

Dezoito clones de cDNA selecionados no rastreamento da biblioteca foram amplificados por PCR (mesmo programa do PCR de colônia), purificados em colunas "GFX PCR DNA and Gel Band Purification" (Amersham Biosciences), eluídos em 50 µl de água estéril e quantificados em espectrofotômetro, a 260 nm. Os produtos de PCR foram desnaturados acrescentando-se 15 µl de NaOH 0,6 N e, em seguida, aproximadamente 200 ng foram aplicados manualmente sobre duas membranas de nylon Hybond-XL (Amersham Biosciences), em triplicata. As membranas contendo as amostras de cDNA foram neutralizadas em solução de 0,5 M Tris-HCl (pH 7,5) e secas ao ar. O cDNA foi fixado nas membranas em forno a 80°C, por 2h.

Preparo das sondas de cDNA e marcação radioativa

Os cDNAs das amostras "tester" e "driver" foram utilizados para marcação radioativa com o kit "Ready-to-Go DNA Labelling Beads (-dCTP)" (Amersham Biosciences), por reação de "random-primer extension". Aproximadamente 45 µl de solução contendo 60 ng de cDNA a ser marcado foram desnaturados e usados para ressuspender "beads". As "beads" contêm todos os componentes necessários para a reação de marcação (nucleotídeos, "random primers", Klenow e tampão), exceto o nucleotídeo marcado com ^{32}P , o qual é adicionado em seguida. Durante incubação a 37°C, os iniciadores ("primers") anelam em sítios randômicos no DNA, permitindo que a enzima Klenow sintetize as fitas complementares, incorporando o nucleotídeo marcado durante o processo. A seguir, as sondas foram purificadas dos nucleotídeos livres, utilizando colunas "MicroSpin S-300" (Amersham Biosciences).

Hibridização e lavagem das membranas

As membranas foram pré-hibridizadas em solução "Rapid-hyb buffer" (Amersham Biosciences) a 65°C por 2 horas. A seguir, foi adicionada a sonda marcada radioativamente (previamente desnaturada) e a hibridização foi realizada a 65°C por 16 horas, na mesma solução.

Após a hibridização, as membranas foram lavadas 2 vezes em SSC 2X/SDS 0,1 %, por 10 min à temperatura ambiente, e 4 vezes em SSC 0,1X/SDS 0,1 %, a 56°C por 30 min.

A revelação da reação foi realizada por exposição das membranas em telas "Storage Phosphor Screen", "scanning" das telas no equipamento "STORM" (Amersham Biosciences) e análise no "software" "ImageQuant" (Amersham Biosciences).

3.10 - NORTHERN BLOT

Para a realização de Northern blots, amostras de RNA foram obtidas de culturas de ilhotas estimuladas com glicose, conforme descrito no item 3.3. A extração e a purificação dos RNAs foi realizada conforme descrito no item 3.5.

Fracionamento de RNA em gel de agarose-formaldeído e transferência para membrana de nylon (THOMAS, 1980)

Alíquotas (10-20 µg) dos diferentes RNAs foram desnaturadas a 65°C por 15 min, em solução de formaldeído 2,2 M e formamida 50%, para impedir a formação de estruturas secundárias. Após a adição do tampão de amostra, as alíquotas dos RNAs foram fracionadas por eletroforese em gel de agarose 1%, formaldeído 2,2 M, em tampão MOPS 1X. Após o fracionamento, o gel foi lavado 4 vezes por 10 min, em água, para remoção do excesso de formaldeído, e corado com solução de brometo de etídeo para observação sob luz ultravioleta. A seguir, os RNAs foram transferidos para membranas de nylon, em tampão SSC 10X. Após a transferência, as

membranas foram lavadas em SSC 3X e secas ao ar. Os RNAs foram fixados na membrana em forno a 80°C, por 2 h.

Preparo da sonda de cDNA e marcação radioativa

Clones bacterianos contendo os cDNAs selecionados no rastreamento foram utilizados para amplificação dos fragmentos, por PCR de colônia, como descrito no item 3.9. Alíquotas dos produtos de amplificação foram fracionadas em gel de agarose 1%, em tampão TAE 1X, para confirmação da presença de banda única. A seguir, estes fragmentos foram purificados em colunas "GFX PCR DNA and Gel Band Purification" (Amersham Biosciences), eluídos em 50 µl de água estéril e quantificados em espectrofotômetro, a 260 nm. Em alguns experimentos de Northern blot foi utilizado, para confecção da sonda radioativa, cDNA correspondente ao gene completo da preproinsulina humana, o qual foi obtido por doação do Prof. Adilson Leite, da UNICAMP.

A marcação radioativa dos insertos foi realizada utilizando-se o kit "Ready-to-Go DNA Labelling Beads (-dCTP)" (Amersham Biosciences), conforme descrito no item 3.9.

Hibridização e lavagem das membranas

A hibridização e lavagem das membranas, e a revelação da reação, foram realizados conforme descrito no item 3.9.

3.11 - SEQÜENCIAMENTO AUTOMATIZADO DE DNA

Clones bacterianos transformados, contendo os fragmentos de cDNAs selecionados no rastreamento da biblioteca de subtração, foram utilizados para amplificação dos fragmentos por PCR de colônia, como descrito no item 3.9.

Aproximadamente 30 ng (1 µl) do produto de PCR foram utilizados como "template" na reação de seqüenciamento do kit "DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing" (Amersham Biosciences). Esta metodologia envolve uma reação de PCR com apenas um iniciador ("primer"), e terminação da reação através de dideoxinucleotídeos marcados com compostos fluorescentes. O produto desta reação foi analisado no aparelho de seqüenciamento automático "ABI Prism 377 DNA Sequencer" (Applied Biosystems - Foster City, CA, EUA).

3.12 - ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS DE cDNA EM BANCOS DE DADOS

As seqüências de cDNA obtidas foram submetidas à análise por comparação no programa "BLAST", pela Internet, no endereço eletrônico do "National Center for Biotechnology Information" (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

4. Resultados

4.1 - ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE ILHOTAS PANCREÁTICAS HUMANAS

No período em que foi desenvolvida esta tese, aproximadamente 100 pâncreas de doadores cadavéricos humanos consentidos foram processados para realização de isolamento de ilhotas. Até o ano de 2000, a técnica utilizada para o isolamento foi aquela desenvolvida por RICORDI *et al.*, 1988. A partir de novembro de 2000, foram introduzidas as modificações descritas pelo grupo da Universidade de Alberta, em Edmonton, Canadá (SHAPIRO *et al.*, 2000). Estas modificações resultaram num maior rendimento de ilhotas no isolamento, além de ilhotas de melhor qualidade, tanto em termos de morfologia quanto funcionalidade.

Nos experimentos descritos nesta tese, foram utilizadas preparações de ilhotas obtidas a partir dos pâncreas P09/99 (utilizadas para construção da biblioteca de subtração), P28/00, P29/00, P02/02 (Northern blots), e P03/02 (Northern blot e curva de crescimento). Estas preparações apresentaram alto grau de pureza (superior a 85%), além de adequada viabilidade funcional (aumento da secreção de insulina em resposta ao aumento da concentração de glicose no meio de cultura).

A Tabela 1 mostra os resultados de pureza, viabilidade morfológica e funcional e níveis de secreção de insulina pelas ilhotas obtidas nestas preparações.

TABELA 1 - Resultados das análises de controle de qualidade das preparações de ilhotas pancreáticas humanas

Preparação	Idade doador	Tempo de isquemia fria (h)	Pureza (%)	Viabilidade morfológica (% céls. vivas)	Viabilidade funcional (Índice)	Insulina em 20 / 2,8 mM glicose (μ UI/IEQ**)
P09/99	18	6	95	80	1,4	2,5 / 1,8*
P28/00	52	5	90	90	1,7	2,3 / 1,3*
P29/00	45	8	95	80	3,3	2,5 / 0,7
P02/02	36	9	85	90	9,8	32,4 / 3,3
P03/02	31	7	85	80	3,2	4,7 / 1,4

* Nestes 2 experimentos, as concentrações de glicose utilizadas foram de 11,2 mM e 5,6 mM de glicose, respectivamente. ** IEQ = equivalentes de ilhotas

Pode-se observar que as preparações mais recentes apresentam índices mais elevados de estímulo de secreção de insulina, possivelmente pela introdução das modificações na técnica de isolamento. Porém, não é possível a comparação direta com o índice das ilhotas do P09/99 e P28/00, pelo fato da técnica de avaliação da viabilidade morfológica também ter sido modificada. Para o teste com as ilhotas dos pâncreas P09/99 e P28/00, as concentrações de glicose utilizadas no meio de cultura foram de 5,6 mM para a baixa concentração e de 11,2 mM para a alta, com período de incubação de 1 hora, enquanto para as demais preparações (P29/00, P02/02 e P03/02) utilizou-se 2,8 mM e 20 mM de glicose, incubando-se durante 2 horas. A pureza das amostras não pode ser avaliada com base na

técnica de isolamento empregada, visto que este resultado têm maior relação com as características próprias do doador e do órgão, do que com a técnica utilizada (LAKEY *et al.*, 1996).

A Figura 4 mostra uma preparação típica de ilhotas, obtida através desta técnica, a partir do pâncreas P03/02.

FIGURA 4 - Fotomicrografia (80X) da preparação de ilhotas humanas do pâncreas P03/02, corada com ditizona (em vermelho, ilhotas)

As análises de viabilidade morfológica das preparações de ilhotas humanas utilizadas neste trabalho foram realizadas através de dupla coloração com laranja de acridina e iodeto de propídeo que coram, respectivamente, células vivas e células mortas, e análise ao microscópio de fluorescência. Os dados apresentados na Tabela 1 mostram que todas

estas preparações tiveram viabilidade $\geq 85\%$. A Figura 5 mostra o resultado deste teste para as ilhotas obtidas a partir do pâncreas P28/00, com viabilidade superior a 90%.

FIGURA 5 - Fotomicrografia de fluorescência (200X) de uma ilhota da preparação de ilhotas humanas do pâncreas P28/00, corada com laranja de acridina (em verde, células vivas) e iodeto de propídeo (em vermelho, células mortas)

A cultura em monocamada (cultura aderente) e o estímulo com glicose das ilhotas do P09/99, foram realizados conforme descrito em Material e Métodos.

A Figura 6 apresenta uma fotomicrografia desta cultura do P09/99, antes da realização do estímulo com glicose. Pode-se observar nesta imagem a morfologia epitelióide característica destas células, que é comum a vários tipos celulares endócrinos.

FIGURA 6 - Fotomicrografia de contraste de fase (200X) da preparação de ilhotas humanas do pâncreas P09/99 em cultura aderente

4.2 - PROLIFERAÇÃO DE ILHOTAS PANCREÁTICAS HUMANAS

Para verificar se o estímulo com glicose induz proliferação celular nas culturas de ilhotas pancreáticas, foi realizada uma curva de crescimento celular. Este ensaio foi realizado cultivando-se as células das ilhotas humanas do P03/02 em meio contendo 2,8 mM ou 11,2 mM de glicose e colhendo-se as células em 2, 4, 6, 8 e 10 dias após o início do estímulo. O número total de células em cada ponto da curva foi determinado conforme descrito em Material e Métodos, e um gráfico foi gerado utilizando-se o "software" GraphPad Prism 3.0.

Pode-se observar neste gráfico (Figura 7) que o crescimento celular foi maior quando as células foram cultivadas em meio contendo 11,2 mM de glicose (em relação ao crescimento em meio contendo 2,8 mM de glicose), aos 2, 4, 6 e 8 dias pós-estímulo. O tempo de dobramento (TD) calculado para as culturas em 2,8 mM e 11,2 mM de glicose foi de, respectivamente, 24,8 horas e 16,7 horas e a densidade de saturação (DS) de, respectivamente, 3×10^5 céls/cm² e $4,3 \times 10^5$ céls/cm². No 10^o dia não foi observada diferença no crescimento entre as duas condições, possivelmente devido à ocorrência de inibição por efeito de densidade das culturas, visto que o crescimento já havia atingido a saturação.

FIGURA 7 - Curva de crescimento celular de ilhotas humanas do pâncreas P03/02, em resposta ao estímulo com 2,8 mM ou 11,2 mM de glicose. Os dados estão representados pela média das duplicatas $\pm$ erro padrão

4.3 - CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE SUBTRAÇÃO DE cDNAs

A biblioteca de subtração de cDNAs foi construída a partir de RNA da preparação de ilhotas do pâncreas P09/99, o qual foi obtido de um doador de órgãos de 18 anos.

Extração de RNAs e demonstração da expressão do gene da insulina

Amostras de RNA total (1 µg) de ilhotas humanas cultivadas em meio contendo 2,8 mM ou 11,2 mM de glicose foram utilizadas para síntese dos cDNAs "driver" e "tester", respectivamente. A relação OD 260/280 nm destas amostras de RNA foi de 1,9 e o fracionamento em gel de agarose/formaldeído (Figura 8) mostrou que eram de boa qualidade. Northern blot hibridizado com sonda de insulina comprovou a expressão do RNA mensageiro correspondente a este hormônio nestas amostras (Figura 9). Tendo se mostrado adequadas, as amostras foram utilizadas para a síntese dos cDNAs.

FIGURA 8 - Fracionamento de RNA total de ilhotas pancreáticas humanas através de eletroforese em gel de agarose-formaldeído

Canaleta 1: RNA ilhotas P09/99 tratadas com 2,8 mM glicose; **Canaleta 2:** RNA ilhotas P09/99 tratadas com 11,2 mM glicose. As posições relativas dos RNAs ribossomais 28S e 18S estão indicadas na Figura.

FIGURA 9 - Northern blot utilizando RNA total de ilhotas pancreáticas humanas hibridizado com sonda de insulina

Canaleta 1: RNA ilhotas P09/99 tratadas com 2,8 mM glicose; **Canaleta 2:** RNA ilhotas P09/99 tratadas com 11,2 mM glicose; **Canaleta 3:** RNA células ST1 (controle negativo).

Síntese dos cDNAs e digestão com *Rsa*I

Esta síntese foi realizada através do kit "SMART PCR cDNA Synthesis" (Clontech), partindo-se de 1 µg de RNA total das amostras de ilhotas cultivadas em baixa (2,8 mM) ou alta (11,2 mM) concentração de glicose, conforme descrito em Material e Métodos. Os cDNAs dupla-fita sintetizados foram digeridos com a enzima de restrição *Rsa*I para gerar fragmentos de, em média, 500 bp. Esta digestão é necessária para se evitar que ocorra, nas etapas posteriores de PCR, amplificação de fragmentos pequenos em detrimento dos grandes. Além disto, a cinética de hibridização de fragmentos deste tamanho é mais homogênea. Outras duas vantagens são: evitar formação de híbridos complexos entre diversos cDNAs diferentes e, ainda, permitir que um mesmo gene seja representado por diversos fragmentos na biblioteca, aumentando sua probabilidade de ser clonado. A Figura 10 apresenta o fracionamento destes cDNAs, em gel de agarose, antes e depois da digestão com *Rsa*I. Pode-se observar que, antes da digestão, a maioria dos fragmentos apresenta tamanho entre 0,5-10 Kb e, após a digestão, entre 0,2-1,5 Kb. O tamanho dos fragmentos antes da digestão mostra que a síntese dos cDNAs foi eficiente para transcritos grandes, isto sendo devido, possivelmente, à adição de inibidor de RNase ao tampão de reação. O motivo desta adição deveu-se à presença de grandes quantidades de RNases em amostras provenientes de pâncreas (MONSTEIN *et al.*, 1995), o que causava alto nível de degradação das amostras na ausência do inibidor. Em relação ao tamanho dos fragmentos após a digestão, estes mostraram-se adequados.

FIGURA 10 - Fracionamento dos cDNAs de Ilhotas humanas do P09/99 em gel de agarose 1,2%, antes e após digestão com *RsaI*

Canaletas 1 e 2: cDNAs de Ilhotas tratadas com 2,8 mM glicose, antes e após a digestão com *RsaI*, respectivamente; **Canaletas 3 e 4:** cDNAs de Ilhotas tratadas com 11,2 mM glicose, antes e após a digestão com *RsaI*, respectivamente.

Ligação dos adaptadores

A amostra de cDNAs "tester" (provenientes de ilhotas tratadas em alta concentração de glicose) foi diluída e dividida em duas frações, as quais foram ligadas a dois tipos diferentes de adaptadores. Após a ligação, foi realizado um teste para verificar se a ligação destes adaptadores foi eficiente (Figura 11). Neste teste, são realizadas duas reações de PCR para cada amostra. Uma das reações usa um par de iniciadores que são internos ao sítio de digestão por *RsaI* no cDNA do gene correspondente a GAPDH. O outro usa iniciadores para o adaptador e para um dos sítios internos descritos acima. A razão entre a banda gerada pelos dois PCRs (após 20 ciclos), fornece uma indicação da quantidade de fragmento de GAPDH que foi ligado ao adaptador, em relação ao total de fragmentos de GAPDH da amostra. Na Figura 11, pode-se observar que as bandas de

aproximadamente 0,8 Kb, correspondentes à amplificação dos fragmentos de GAPDH ligados a cada um dos adaptadores, apresentam intensidade de, pelo menos, 25% das bandas de 0,4 Kb, correspondentes à amplificação do total de fragmentos de GAPDH presentes na amostra. Como aproximadamente 25% das amostras foram ligadas (que é o valor mínimo considerado adequado pela técnica), estas foram consideradas adequadas.

FIGURA 11 - Teste da eficiência de ligação dos cDNAs aos adaptadores

Fracionamento em gel de agarose 1% do produto de PCR (20 ciclos) dos fragmentos de GAPDH, amplificados a partir das amostras de cDNA de ilhotas obtidas a partir do pâncreas P09/99 tratadas com 11,2 mM de glicose, após ligação aos adaptadores 1 e 2. **Canaleta 1:** PCR com primers para GAPDH e adaptador 1. **Canaleta 3:** PCR com primers para GAPDH e adaptador 2. **Canaletas 2 e 4:** PCR com primers para GAPDH 3' e 5'.

Hibridização subtrativa e PCRs primário e secundário

Os cDNAs da amostra "tester" ligados a cada um dos adaptadores, foram desnaturados na presença de excesso (50 vezes) de cDNA "driver", em 2 tubos separados, e parcialmente renaturados a 68°C durante 8 horas. Em seguida, o conteúdo dos dois tubos foi misturado e os cDNAs totalmente renaturados, na presença de quantidade adicional de cDNA "driver". Nesta

etapa, os genes diferencialmente expressos formam duplo híbrido contendo um tipo de adaptador diferente ligado a cada fita.

Na etapa seguinte, estes cDNAs diferencialmente expressos foram amplificados por duas reações de PCR. No PCR primário, foram utilizados iniciadores para cada um dos adaptadores e, no PCR secundário, foram utilizados iniciadores com sítios de anelamento mais internos aos adaptadores ("nested PCR"), visando uma maior especificidade dos produtos gerados. Na Figura 12 pode-se observar que, na sua maioria, os fragmentos gerados nestes PCRs apresentaram entre 0,3-2 Kb.

FIGURA 12 - Fracionamento em gel de agarose 2% dos produtos de PCR primário e secundário da subtração de ilhotas do pâncreas P09/99 tratadas com 11,2 mM glicose

Canaleta 1: amostra do PCR primário; **Canaleta 2:** amostra do PCR secundário.

Teste da eficiência de subtração

Para testar a eficiência de subtração do experimento (definida como a redução da abundância relativa de seqüências correspondentes a genes de alta expressão em relação às seqüências de baixa expressão), foram

utilizadas uma alíquota da amostra subtraída (PCR secundário) e uma da amostra não subtraída (cDNA digerido com *RsaI*) e realizado PCR com iniciadores para GAPDH, por 18, 23, 28 e 33 ciclos. A estimativa da eficiência de subtração foi realizada considerando-se o número de ciclos necessários para a amostra subtraída atingir a mesma amplificação da não subtraída (considerando-se cada 5 ciclos como um enriquecimento de, aproximadamente, 20 vezes). Na Figura 13, pode-se observar que a banda de cerca de 0,5 Kb, correspondente a amplificação do fragmento de GAPDH, aparece após 18 ciclos na amostra não subtraída e após 23 ciclos na amostra subtraída. Porém, nesta última, a banda é de intensidade bem menor. Assim, a eficiência desta subtração foi estimada como sendo de, pelo menos, 20 vezes, mas possivelmente até maior (entre 100-200 vezes).

FIGURA 13 - Teste da eficiência de subtração

Fracionamento em gel de agarose 2% do produto de amplificação de GAPDH, coletado após diferentes números de ciclos de PCR. **Canaletas 1, 2, 3 e 4:** cDNA não subtraído; 18, 23, 28 e 33 ciclos de PCR, respectivamente; **Canaletas 5, 6, 7 e 8:** cDNA subtraído; 18, 23, 28 e 33 ciclos de PCR, respectivamente.

4.4 - RASTREAMENTO DA BIBLIOTECA DE SUBTRAÇÃO

Os fragmentos de cDNA obtidos da biblioteca de subtração foram clonados em vetor plasmideal pUC18 e utilizados para transformar bactérias *E. coli*, por eletroporação. Os clones bacterianos resultantes foram coletados, crescidos em placas de 96 poços e estocados a -70°C.

Noventa e seis destes clones (uma placa) foram amplificados por PCR de colônia e transferidos para duas membranas de nylon, utilizando o aparelho "Hydra". Outros 768 clones (em duplicata, totalizando 1.536 amostras) foram preparados da mesma forma e transferidos para duas membranas de nylon de 8x12 cm, utilizando o sistema "ExpreCISION DNA Arraying System".

Estas membranas foram hibridizadas com sondas radioativas preparadas a partir de cDNA das amostras tratadas em baixa ("driver") ou alta ("tester") concentração de glicose, com o objetivo de rastrear a biblioteca de subtração para clones diferencialmente expressos. Um total de 864 clones foram rastreados nestas membranas. As Figuras 14 e 15 mostram o resultado do "scanning" das membranas de 96 e 1.536 amostras, respectivamente, realizado no equipamento "STORM".

FIGURA 14 - Rastreamento de 96 clones da biblioteca de subtração de ilhotas humanas do P09/99 tratadas com 11,2 mM de glicose

Membrana A: hibridizada com sonda de cDNA preparada a partir da amostra de ilhotas tratada com 2,8 mM de glicose. **Membrana B:** hibridizada com sonda de cDNA preparada a partir da amostra de ilhotas tratadas com 11,2 mM de glicose. Estão indicados com flechas os clones com aumento de expressão na amostra tratada com 11,2 mM de glicose.

FIGURA 15 - Rastreamento de 768 clones (em duplicata) da biblioteca de subtração de ilhotas do P09/99 tratadas com 11,2 mM de glicose

Membrana A: hibridizada com sonda de cDNA preparada a partir da amostra de ilhotas tratada com 2,8 mM de glicose. **Membrana B:** hibridizada com sonda de cDNA preparada a partir da amostra de ilhotas tratadas com 11,2 mM de glicose.

Os 5 clones da membrana de 96 amostras que, visualmente, mostraram aumento de expressão na membrana hibridizada com a sonda preparada a partir de cDNA da amostra tratada com alta concentração de glicose, foram selecionados para confirmação e seqüenciamento de DNA.

Os "spots" da membrana de 1.536 amostras foram densitometrados usando o programa "ImageQuant". As médias das duplicatas de cada clone foram calculadas, obtendo-se um índice dividindo a média da absorbância da amostra em alta concentração de glicose pela média da absorbância da amostra em baixa concentração de glicose. Estes índices foram utilizados

para gerar o gráfico da Figura 16, que relaciona o número correspondente a cada clone com o seu índice. Os 13 clones desta membrana que apresentaram aumento de expressão >3 vezes, foram selecionados para seqüenciamento e confirmação.

Assim, dos 864 clones rastreados nesta biblioteca, um total de 18 (2,0%) foram selecionados para confirmação por Northern blot e seqüenciamento de DNA.

FIGURA 16 - Gráfico de distribuição dos índices* de densitometragem de 768 clones da biblioteca de subtração de ilhotas humanas do pâncreas P09/99 tratadas com 11,2 mM de glicose

* Os índices foram obtidos dividindo-se a densitometragem do sinal de cada clone (média das duplicatas) da membrana hibridizada com cDNA de ilhotas tratadas em 11,2 mM de glicose, pelo valor obtido na membrana hibridizada com cDNA de ilhotas tratadas em 2,8 mM de glicose.

4.5 - SEQÜENCIAMENTO DE DNA DOS CLONES SELECIONADOS

O seqüenciamento de DNA dos 18 clones da biblioteca de subtração foi utilizado para análise por comparação, no banco de dados de seqüências não redundantes (nr) do "National Center for Biotechnology Information" (NCBI), utilizando o programa "BLAST" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Os resultados destas análises estão apresentados na Tabela 2, juntamente com o "E value" obtido. O valor de E é um parâmetro que descreve a probabilidade de se obter um alinhamento semelhante, em um banco de dados de determinado tamanho. Portanto, quanto menor seu valor, menor a possibilidade do alinhamento obtido ser apenas casual.

TABELA 2 - Análise das seqüências dos clones obtidos a partir da biblioteca de subtração de ilhotas humanas tratadas com 11,2 mM glicose, no GenBank, usando o programa BLAST

Número do Clone e resultado da análise	E value
1 - Homo sapiens hypothetical protein	7×10^{-21}
2 - Homo sapiens hyaluronic acid synthetase	10^{-30}
3 - Homo sapiens translocation protein 1 (TLOC1)	4×10^{-25}
4 - Homo sapiens phenylalkylamine binding protein gene	10^{-29}
5 - Human pancreatic polypeptide receptor Y1	10^{-9}
6 - Homo sapiens CLIC2 gene	2×10^{-29}
7 - Homo sapiens lysosomal-associated membrane protein 2	10^{-156}
8 - No significant similarity found	
9 - Homo sapiens, Similar to cyclic nucleotide gated channel, cGMP	10^{-106}
10 - Homo sapiens ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2	5×10^{-145}
11 - No significant similarity found	
12 -Human TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein	4×10^{-89}
13 - No significant similarity found	
14 - Homo sapiens genomic sequence	0,8
15 - Homo sapiens similar to hypothetical protein	10^{-111}
16 - Human ferritin L chain	0
17 - No significant similarity found	
18 - No significant similarity found	

4.6 - CONFIRMAÇÃO DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL

Inicialmente, foi construído um macroarranjo de DNA com os 18 clones selecionados no rastreamento, em membrana de nylon, aplicados em triplicata. Estas membranas foram hibridizadas com sondas de cDNA preparadas a partir das amostras de ilhotas do pâncreas P09/99 incubadas na presença de 2,8 ou 11,2 mM de glicose. Este recurso foi utilizado para tentar caracterizar os clones com maior expressão diferencial entre estas duas amostras. A Figura 17 apresenta o resultado do "scanning" destas membranas, realizado no equipamento "STORM".

FIGURA 17 - Arranjo de DNA contendo 18 clones da biblioteca de subtração de ilhotas do P09/99 tratadas com 11,2 mM de glicose

Membrana A: hibridizada com sonda de cDNA da amostra de ilhotas tratada com 2,8 mM glicose; **Membrana B:** hibridizada com sonda de cDNA da amostra de ilhotas tratada com 11,2 mM glicose.

As membranas foram densitometradas e as médias das triplicatas de cada clone foram utilizadas para gerar um índice, dividindo-se o valor do sinal obtido com a sonda preparada a partir da amostra de ilhotas tratadas com 11,2 mM, pelo valor obtido com a sonda preparada a partir da amostra de ilhotas tratadas com 2,8 mM de glicose. Os clones que geraram índices superiores a 1, estão descritos a seguir, com seus respectivos índices: Clone 5: 2,3; Clone 6: 1,7; Clones 8 e 13: 1,6; Clones 1, 14 e 17: 1,3; Clones 7 e 9: 1,2.

Estes índices foram utilizados, posteriormente, para selecionar clones com maior probabilidade de confirmação no Northern blot, tendo em vista a

dificuldade de obtenção de grande quantidade de RNA de ilhotas humanas para realização de diversos Northern blots.

Northern blot

Foi realizado Northern blot de 9 dos 18 clones selecionados no rastreamento, para confirmação da expressão diferencial. Destes 9, apenas 2 clones foram confirmados, ou seja, os clones 5 e 1. A Figura 18 mostra o resultado do Northern blot do clone 5 e a Figura 19, do clone 1.

FIGURA 18 - Northern blot utilizando RNA total de ilhotas humanas do pâncreas P03/02, hibridizado com sonda de cDNA do clone 5 da biblioteca de subtração de ilhotas tratadas com 11,2 mM de glicose

Canaleta 1: Ilhotas tratadas por 4h em 11,2 mM glicose; **Canaleta 2:** Ilhotas tratadas por 4h em 2,8 mM glicose. A posição relativa dos RNAs ribossomais 28S e 18S está indicada na figura.

A densitometria das bandas do Northern blot do clone 5 mostrou um aumento de, aproximadamente, 2 vezes na amostra tratada com 11,2 mM de glicose, confirmando a expressão diferencial. Pode-se observar também, no painel inferior, apresentado como controle, que a visualização da banda do RNA ribossômico 28S indica que aproximadamente a mesma quantidade de RNA foi aplicada nas duas amostras, sugerindo que o aumento de expressão deste clone não deve ter sido artefactual.

FIGURA 19 - Northern blot utilizando RNA total de ilhotas humanas do pâncreas P03/02, hibridizado com sonda de cDNA do clone 1 da biblioteca de subtração de ilhotas tratadas com 11,2 mM de glicose

Canaleta 1: Ilhotas tratadas por 4h em 11,2 mM glicose; **Canaleta 2:** Ilhotas tratadas por 4h em 2,8 mM glicose. A posição relativa dos RNAs ribossomais 28S e 18S está indicada na figura.

A densitometria das bandas do Northern blot do clone 1 mostrou um aumento de, aproximadamente, 2 vezes na amostra tratada com 11,2 mM de glicose, confirmando a expressão diferencial. Pode-se observar também, no painel inferior, apresentado como controle, que a visualização da banda do RNA ribossômico 28S indica que aproximadamente a mesma quantidade de RNA foi aplicada nas duas amostras, sugerindo que o aumento de expressão deste clone não deve ter sido artefactual.

4.7 - ANÁLISE DA SEQÜÊNCIA DO CLONE 1

O clone 1, que teve sua regulação por glicose confirmada, com aumento de expressão de aproximadamente 2 vezes em ilhotas humanas tratadas com 11,2 mM glicose, em comparação com ilhotas tratadas em 2,8 mM glicose, teve sua seqüência comparada no programa BLAST do GenBank, no banco de dados nr. O alinhamento obtido está apresentado na Figura 20.

Sequences producing significant alignments:

Score E Value

gi 16876849 gb BC016707.1 BC016707	Homo sapiens, hypothetic...	109	7e-21	L U
gi 16307524 gb BC010308.1 BC010308	Homo sapiens, hypothetic...	109	7e-21	L U
gi 12652798 gb BC000151.1 BC000151	Homo sapiens, hypothetic...	109	7e-21	L U
gi 6841455 gb AF161466.1 AF161466	Homo sapiens HSPC117 mRNA...	109	7e-21	L
gi 7657014 ref NM_014306.1 	Homo sapiens hypothetical prote...	109	7e-21	L U
gi 7688672 gb AF155658.1 AF155658	Homo sapiens putative 55 ...	109	7e-21	U
gi 4886424 emb AL050255.1 HS149A16A	Novel gene similar to C...	109	7e-21	L U
gi 12804222 gb BC002970.1 BC002970	Homo sapiens, hypothetic...	101	2e-18	L U

FIGURA 20 - Análise da sequência do clone 1, utilizando o programa BLAST do GenBank, no banco de dados nr

Pode-se observar que sua seqüência apresentou similaridade com a seqüência da proteína hipotética humana HSPC117 (ZHANG *et al.*, 2000) (número de acesso AAH16707), de 505 aminoácidos. Uma proteína hipotética similar, de 55,2 kDa já foi, também, demonstrada em *C. elegans*, pertencendo a uma família de proteínas de função desconhecida. O clone de cDNA originalmente foi obtido de células tronco hematopoiéticas CD34+, de coriocarcinoma de placenta e de carcinoma mucoepidermóide de pulmão. Além disto, sua expressão já foi demonstrada em diversos tipos de tecidos, dentre estes, vários tipos de adenomas e carcinomas, além de tecido de pâncreas, ilhotas e em insulinooma. O gene está localizado no cromossomo 22, posição q12.

4.8 - ANÁLISE DA SEQÜÊNCIA DO CLONE 5

O clone 5 mostrou um aumento de expressão de aproximadamente 2 vezes na amostra de ilhotas humanas tratadas com 11,2 mM glicose, em comparação com ilhotas tratadas em 2,8 mM glicose. A análise de sua seqüência no programa BLAST do GenBank mostrou similaridade com o receptor de polipeptídeo pancreático humano. A presença deste receptor já foi demonstrada em ilhotas e em tecido pancreático (LUNDELL *et al.*, 1995).

5. Discussão

Neste trabalho, foi realizada a construção de uma biblioteca de subtração de cDNAs de ilhotas pancreáticas humanas cultivadas em meio contendo alta concentração de glicose, com o objetivo de identificar genes induzidos por glicose, os quais podem ter relação com a proliferação celular neste tecido.

As ilhotas pancreáticas humanas foram obtidas através de técnica automatizada desenvolvida por RICORDI, 1992, e modificada por SHAPIRO *et al.*, 2000. Esta técnica envolve a digestão do parênquima pancreático através de uma solução de collagenase, a qual é perfundida através do duto pancreático. A digestão é realizada numa câmara especial, conhecida como Câmara de Ricordi. A seguir, o tecido pancreático digerido é submetido a um processo de purificação por gradiente de Ficoll, numa centrífuga especial de fluxo contínuo, denominada COBE 2991. As frações contendo as ilhotas são recuperadas deste gradiente, lavadas e, finalmente, cultivadas.

Esta técnica de isolamento de ilhotas foi desenvolvida com o objetivo de se obter um grande número de ilhotas a partir de pâncreas humanos para, posteriormente, utilizá-las no transplante de pacientes com DM do tipo 1 ou *Diabetes* secundário. As técnicas utilizadas anteriormente mostravam-se adequadas para o isolamento de ilhotas de pequenos animais, como ratos e camundongos, mas não para pâncreas humanos e de grandes animais. A utilização desta tecnologia, a partir de 1988, permitiu o início de diversos programas de transplante de ilhotas no mundo todo. Vários grupos

descreveram casos de pacientes insulino-independentes após transplantes de ilhotas obtidas com esta técnica (LONDON *et al.*, 1994).

Algumas modificações na técnica foram introduzidas no decorrer da década de 90 como, por exemplo, o desenvolvimento e a utilização de uma colagenase especial, a Liberase® (Roche), altamente purificada e contendo baixíssimos níveis de endotoxinas bacterianas (LINETSKY *et al.*, 1995). Estas modificações resultaram em preparações de ilhotas de melhor viabilidade. Apesar disto, a grande maioria dos transplantes em pacientes com DM tipo 1 ainda não mostrava bons resultados (INTERNATIONAL ISLET TRANSPLANT REGISTRY, 2001).

Somente com a divulgação da técnica de transplante desenvolvida pelos pesquisadores da Universidade de Alberta, no Canadá, é que estes resultados se mostraram adequados (SHAPIRO *et al.*, 2000). Entre as modificações na técnica de isolamento de ilhotas introduzidas por este grupo, destacam-se a utilização de uma câmara especial para perfusão da colagenase no pâncreas (LAKEY *et al.*, 1999) com pressão e temperatura controladas, a purificação através de um gradiente contínuo de Ficoll em baixa temperatura (4°C), além da utilização de diversos equipamentos para manter o tecido pancreático resfriado a 4°C enquanto o isolamento é realizado (SHAPIRO *et al.*, 2000). Os resultados apresentados por este grupo demonstraram a importância da qualidade das ilhotas no sucesso do procedimento de transplante.

Estas modificações foram introduzidas em nosso protocolo de isolamento de ilhotas a partir de dezembro de 2000. As preparações obtidas

com este novo protocolo resultaram, na sua maioria, em ilhotas de melhor viabilidade morfológica e melhor índice de secreção de insulina em resposta ao estímulo com glicose, confirmando o resultado esperado. Outro fator que colaborou para a obtenção de ilhotas de melhor viabilidade, foi a utilização de pâncreas de doadores selecionados segundo critérios também estabelecidos pelo grupo canadense (LAKEY *et al.*, 1996).

Apesar disto, realizamos diversos isolamentos antes da introdução destas modificações, que resultaram em ilhotas de boa qualidade. A preparação de ilhotas do P09/99, que foi utilizada para construção da biblioteca de subtração, mostrava mais de 80% de células vivas no dia seguinte ao isolamento, pureza superior a 95%, além de um pequeno aumento na taxa de secreção de insulina após estímulo com glicose. O índice de secreção de insulina desta preparação não pode ser comparado com as preparações obtidas posteriormente, pelo fato de havermos mudado o método de execução deste teste. No teste realizado com as ilhotas dos pâncreas P09/99 e P28/00, a concentração de glicose no meio de cultura foi aumentada 2 vezes, de 5,6 para 11,2 mM, enquanto que, para as demais preparações, este aumento foi maior que 7 vezes (de 2,8 para 20 mM). Os índices menores obtidos anteriormente podem, em parte, ter sido ocasionados por este fato.

Todas as preparações de ilhotas utilizadas neste trabalho, com exceção do P09/99, foram realizadas com a nova técnica de isolamento.

As ilhotas utilizadas para construção da biblioteca de subtração foram obtidas do pâncreas de um doador de órgãos de 18 anos. Este foi,

também, um fator de escolha desta preparação, pelo fato da idade do doador ser comprovadamente capaz de influenciar no potencial de proliferação das células β (SWENNE, 1983; TYRBERG *et al.*, 1996).

O cultivo das ilhotas isoladas foi realizado em cultura aderente em monocamada, para permitir uma expansão celular mais rápida e RNAs de melhor qualidade para a construção da biblioteca. Apesar de facilitar a proliferação celular, as amostras utilizadas apresentavam expressão do gene da insulina, no Northern blot que foi realizado como controle, demonstrando que um certo grau de diferenciação celular havia sido mantido. O fato de não ter sido observado aumento do nível de expressão de insulina na amostra tratada com alta concentração de glicose, pode ser explicado pelo fato do tempo de estímulo ter sido breve, apenas 2 horas. Sabe-se que o controle dos níveis de insulina no sangue, em períodos curtos de hiperglicemia, é exercido primeiramente por um aumento da secreção de insulina pela célula β e, também, por mecanismos pós-transcricionais (MITANCHEZ *et al.*, 1997). Nas primeiras 6 horas de um estímulo hiperglicêmico, o aumento da transcrição do gene da insulina é, geralmente, de apenas 2 vezes.

Foi utilizado um período curto de estímulo na tentativa de isolar genes de resposta imediata, muitos dos quais têm relação com o controle do ciclo celular (RANE *et al.*, 2000). SCHUPPIN *et al.*, 1993, relataram uma resposta máxima de 1% de células β dividindo-se, em 4 h de estímulo com 16,7 mM de glicose, um valor pequeno porém 10 vezes maior do que aquele observado em células expostas a 5,5 mM.

O estímulo com 11,2 mM de glicose nas ilhotas em cultura provocou uma redução no tempo de dobramento destas células, e um aumento na densidade de saturação. Somente no quinto ponto da curva, ou seja, no décimo dia de tratamento, o número de células foi semelhante na condição tratada em alta glicose em relação à amostra em baixa glicose. Uma possível explicação para isto é que, neste dia, as culturas já se encontravam confluentes, o que pode ter ocasionado inibição do crescimento por efeito de densidade celular. Outra explicação poderia ser a "dessensibilização" destas células, devido à exposição prolongada à alta concentração de glicose, ou por aumento da apoptose, induzida pelo mesmo motivo (FEDERICI *et al.*, 2001; GRILL *et al.*, 2001; JONAS *et al.*, 2001).

Diversos nutrientes e hormônios são capazes de estimular a proliferação das células β (BONNER-WEIR, 2000; NIELSEN *et al.*, 2001). A glicose foi escolhida neste trabalho pelo fato de ser um dos mais potentes e, fisiologicamente, um dos principais fatores responsáveis pela regulação do "pool" de células β necessários para manutenção da normoglicemia. Em estudo com ratos, *in vivo*, a glicose foi capaz de induzir um aumento de 50% na massa de células β , durante infusão contínua de glicose por 96 horas. Além disto, a glicose é de fácil obtenção e baixíssimo custo.

A construção da biblioteca de subtração foi realizada através da metodologia "Suppression Subtractive Hybridization" (SSH) (GURSKAYA *et al.*, 1996). A técnica de hibridização subtrativa promove um enriquecimento para genes diferencialmente expressos, entre duas condições que se quer testar. A vantagem desta técnica em relação às demais, consiste no fato de

promover uma normalização dos fragmentos subtraídos, reduzindo a redundância das seqüências diferencialmente expressas abundantes em relação àsquelas mais raras na amostra. Esta normalização também pode facilitar a clonagem de genes diferencialmente expressos pouco abundantes, em relação às demais técnicas de análise de expressão gênica diferencial.

Apesar de promover este enriquecimento da biblioteca, e de algumas publicações mostrarem alta eficiência na obtenção de fragmentos diferencialmente expressos (DIATCHENKO *et al.*, 1996; GURSKAYA *et al.*, 1996), na maioria dos casos o que se observa é que apenas uma parte dos clones obtidos tem sua regulação confirmada. Entre os fatores que interferem nesta eficiência, pode-se incluir: 1) o número de genes diferentes entre as duas condições; 2) a abundância relativa dos transcritos; 3) o nível de indução do gene em questão; 4) a complexidade do conjunto de genes expressos pela célula; 5) a magnitude dos níveis basais de expressão dos genes e; 6) o enriquecimento e a normalização da biblioteca (REBRIKOV *et al.*, 2000).

Com o objetivo de reduzir a necessidade de realização de seqüenciamento e de Northern blots para confirmação de clones subtraídos, foi realizado um rastreamento da biblioteca através de macroarranjos de cDNA (NGUYEN *et al.*, 1995; BECK *et al.*, 2001).

Foram rastreados 864 clones no total, em duas membranas de nylon em duplicata, uma contendo 96 clones e a outra, 768 clones em duplicata. Dezoito clones foram selecionados neste rastreamento. Nove destes clones

foram selecionados para análise de Northern blot e confirmação da expressão diferencial. Somente 2 destes 9 clones tiveram sua expressão diferencial confirmada, num aumento de expressão de aproximadamente 2 vezes, o que representa em torno de 2% de confirmação. Este valor é muito próximo ao encontrado numa Tese de Doutorado realizada no Laboratório, que resultou em aproximadamente 1% de confirmação numa biblioteca de células ST1 de glioma de rato, tratadas com ácido retinóico (BENGTON, 2002). Neste mesmo trabalho, a aplicação de outra metodologia de subtração, a "*Representational Difference Analysis*" (RDA) (HUBANK *et al.*, 1994), resultou numa eficiência muito maior do que aquela obtida com SSH. Numa análise limitada de 30 clones, 7 foram confirmados. Portanto, a tecnologia de RDA pode ser uma boa alternativa para a construção de bibliotecas de subtração.

Um possível problema na geração desta biblioteca, pode ter sido o tempo de sincronização das células, que foi bastante curto (4 horas). Assim, os níveis de expressão de genes regulados pela glicose, relacionados à proliferação celular, podem não ter sido discriminados suficientemente nesta amostra, ficando numa relação inferior à necessária para detecção pelo método de subtração por SSH, que é em torno de 5 vezes (GURSKAYA *et al.*, 1996). Para testar esta hipótese, seria necessário a construção de uma nova biblioteca, com maior tempo de sincronização das células.

Um fato interessante ocorrido, é que um dos clones selecionados para confirmação, e que havia sido seqüenciado, mostrou similaridade com a cadeia leve da ferritina. Este clone não teve sua expressão diferencial

confirmada. Entretanto, MACDONALD *et al.*, 1994, rastreando uma biblioteca de ilhotas de rato tratadas com 20 mM de glicose durante 24 horas, por hibridização diferencial, em comparação com amostra mantida em 1 mM de glicose, encontraram a cadeia pesada da ferritina com aumento de expressão entre 4 a 8 vezes na amostra incubada em alta concentração de glicose. Foi demonstrado, também, o aumento de expressão da proteína nas amostras estimuladas com glicose, aumento este que ocorria especificamente nas células β . Apesar dos autores não terem definido a razão deste aumento, sugeriram que poderia estar relacionado ao armazenamento de zinco nas células β , o qual é necessário para formação do hexâmero de insulina, dentro dos grânulos de secreção.

Uma das possibilidades para a não confirmação de diversos clones, seria uma possível heterogeneidade nas diversas preparações de ilhotas humanas. Assim, por motivo de diferente composição celular, viabilidade ou mesmo por características próprias do doador, algumas preparações poderiam ter expressão muito variável de determinados genes.

Diversos trabalhos na literatura utilizaram metodologias de análise de expressão gênica diferencial em ilhotas pancreáticas ou em linhagens de células β , para identificar genes regulados por glicose. Um destes foi descrito anteriormente, de autoria de MACDONALD *et al.*, 1994, que utilizou metodologia de hibridização diferencial. TANAKA *et al.*, 1995, compararam a biblioteca de DNA complementar (cDNA) de células da linhagem MIN-6 de insulinoma de camundongo, mantidas em baixa ou alta concentração de

glicose, encontrando 3 clones de cDNA desconhecidos, cuja expressão era glicose-dependente.

YAMATO *et al.* 1996, utilizaram a tecnologia de RDA para isolar cDNAs regulados por glicose, em células MIN-6 tratadas durante 24 horas em 25 mM ou em 2,5 mM de glicose. Dezesesseis clones foram obtidos, sendo que dois destes apresentaram similaridade com amilina e com pré-albumina, 4 clones se mostraram homólogos a genes de outras espécies, enquanto outros 10 clones não apresentaram nenhuma homologia.

Em células MIN-6 estimuladas com glicose, JOSEFSEN *et al.*, 1999 identificaram, por hibridização subtrativa, o aumento da expressão do gene Egr-1 ("early growth response gene"), que codifica para uma proteína "zinc-finger". A expressão de Egr-1 nestas células foi acompanhada pelo aumento da expressão dos genes de resposta primária *c-fos* e *junB*, sugerindo o seu envolvimento na resposta adaptativa de células β induzidas por glicose, através de regulação transcricional gênica.

"Microarrays" de DNA também têm sido empregados, mais recentemente, para analisar genes induzidos por glicose em linhagens celulares e em ilhotas pancreáticas. WEBB *et al.*, 2000, utilizaram cDNA de células MIN-6 expostas a 5,5 ou 25 mM de glicose para hibridizar "microarrays" Affymetrix (Affymetrix, Santa Clara) de alta densidade. Genes com aumento de expressão maior que 2,2 vezes foram considerados positivos, e revelaram diversos "clusters" gênicos induzidos, dentre os quais componentes de vias secretórias, enzimas do metabolismo intermediário, componentes de sinalização intracelular e fatores de transcrição. O gene

que mostrou o maior aumento de expressão (>20x) foi a sub-unidade α do "signal recognition particle receptor", um componente do "translocon" celular.

SHALEV *et al.*, 2002, também utilizaram um "microarray" Affymetrix contendo aproximadamente 10.000 seqüências, para identificar genes regulados por glicose em ilhotas pancreáticas humanas. Estes autores trataram as ilhotas durante 24 horas em meio contendo 1,67 ou 16,7 mM de glicose, as quais foram utilizadas para gerar as sondas para hibridizar os "microarrays". Aproximadamente 6.000 genes foram expressos nas ilhotas, sendo que 14 destes foram induzidos e 6 reprimidos pelo estímulo com glicose. O gene de maior indução foi o da "thioredoxin-interacting protein" (TXNIP), com aumento de 11 vezes. Esta proteína é um importante regulador do estado "redox" celular. Diversos membros da família BMP ("bone morphogenic protein") também foram induzidos, enquanto TGF β , um gene com envolvimento na diferenciação celular, foi reprimido.

Estes trabalhos utilizando "microarrays" para revelar genes regulados por glicose em ilhotas, juntamente com outro que estudou a expressão diferencial em células β de rato purificadas e tratadas com IL-1b (interleucina-1b) e INF-g (interferon- γ) (CARDOZO *et al.*, 2001), demonstram o potencial desta nova tecnologia para a caracterização de vias de ativação celulares.

Dos 2 clones com expressão diferencial confirmada neste trabalho, o de número 1, que representa uma proteína hipotética humana de função desconhecida, mostra-se de grande interesse para análise posterior. A

análise funcional deste clone em linhagens de células β e em células β purificadas, pode trazer várias informações a respeito de sua função e, também, de sua real participação no controle da proliferação celular.

O clone 5, que mostrou homologia com o receptor de polipeptídeo pancreático humano, é uma proteína que se encontra associada à "G proteins" em membranas celulares. Esta associação pode promover a regulação dos níveis intracelulares de AMP cíclico e de Ca^{2+} livre (BARD *et al.*, 1995), além de induzir a fosforilação de ERK 1/2 ("extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2") em células CHO ("Chinese Hamster Ovary cells") (MULLINS *et al.*, 2002). Recentemente, foi demonstrado que o neuropeptídeo Y (NPY), que pertence à mesma família de peptídeos do polipeptídeo pancreático, foi capaz de induzir neuroproliferação de células de cultura primária de epitélio olfatório, pela via de ERK 1/2, mediado pela proteína-quinase C (PKC) (HANSEL *et al.*, 2001). Assim, a análise da expressão deste gene especificamente em células β , e sua posterior análise funcional, podem trazer grande contribuição para este estudo.

A possibilidade de expansão celular *ex vivo*, através da indução da proliferação de células β *in vitro*, tem grande potencial de aplicação no desenvolvimento da tecnologia de transplante celular e de ilhotas pancreáticas. O transplante de ilhotas, juntamente com as técnicas de geração de novas ilhotas e células β a partir de células-tronco (BONNER-WEIR *et al.*, 2000; RAMIYA *et al.*, 2000; SORIA *et al.*, 2000), são altamente promissores como tratamentos alternativos fisiológicos para os pacientes diabéticos.

6. Conclusões

1. A metodologia para o isolamento e a purificação de ilhotas pancreáticas humanas foi estabelecida, permitindo a obtenção de ilhotas purificadas, que se mostram morfológica e funcionalmente viáveis.
2. O cultivo das ilhotas pancreáticas em meio de cultura contendo alta concentração de glicose, induziu o crescimento celular.
3. Foi construída uma biblioteca de subtração de cDNAs de ilhotas humanas tratadas em alta concentração de glicose, através da metodologia de "Suppression Subtractive Hybridization".
4. Num rastreamento limitado de 864 clones desta biblioteca de subtração, foram selecionados 18 clones para análise e confirmação. De 9 destes clones analisados por Northern blot, apenas 2 tiveram sua expressão diferencial confirmada.
5. Uma proteína hipotética humana, pertencente a uma família de proteínas de função desconhecida, e o receptor de polipeptídeo pancreático humano, foram identificados como diferencialmente expressos em ilhotas pancreáticas humanas tratadas em alta concentração de glicose.

7. Referências Bibliográficas

- American Diabetes Association. Position Statement. Diabetic Retinopathy. *Diabetes Care*, 25 (Suppl 1):S90-3, 2002a.
- American Diabetes Association. Position Statement. Pancreas Transplantation for Patients with Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*, 25 (Suppl 1):S111, 2002b.
- Atkinson, M. A.; Maclaren, N. K. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 331:1428-36, 1994.
- Ausubel, F. M. et al. *Current Protocols in Molecular Biology*. Boston, John Wiley & Sons, 1999.
- Ballinger, W. F.; Lacy, P. E. Transplantation of intact pancreatic islets in rats. *Surgery*, 72:175-86, 1972.
- Bank, H. L. Rapid assessment of islet viability with acridine orange and propidium iodide. *In Vitro Cell Dev Biol*, 24:266-73, 1988.
- Bard, J. A.; Walker, M. W.; Branchek, T. A.; Weinshank, R. L. Cloning and functional expression of a human Y4 subtype receptor for pancreatic polypeptide, neuropeptide Y and peptide YY. *J Biol Chem*, 270:26762-5, 1995.
- Beck, M. T.; Holle, L.; Chen, W. Y. Combination of PCR subtraction and cDNA microarray for differential gene expression profiling. *Biotechniques*, 31:782-6, 2001.
- Bengtson, M. H. Caracterização celular e molecular dos efeitos do ácido retinóico sobre as células ST1 de glioma de rato. 2002. 110p. Tese de Doutorado - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Berney, T.; Buhler, L.; Caulfield, A.; Oberholzer, J.; Toso, C.; Alejandro, R.; Cooper, D. K.; Ricordi, C.; Morel, P. Transplantation of islets of Langerhans: new developments. *Swiss Med Wkly*, 131:671-80, 2001.
- Bertuzzi, F.; Grohovaz, F.; Maffi, P.; Caumo, A.; Aldrighetti, L.; Nano, R.; Hengster, P.; Calori, G.; Di Carlo, V.; Bonifacio, E.; Secchi, A. Successful transplantation of human islets in recipients bearing a kidney graft. *Diabetologia*, 45:77-84, 2002.
- Boker, A.; Rothenberg, L.; Hernandez, C.; Kenyon, N. S.; Ricordi, C.; Alejandro, R. Human islet transplantation: update. *World J Surg*, 25:481-6, 2001.
- Bonner-Weir, S. Two pathways of beta-cell growth in the regenerating rat pancreas: implications for islet transplantation. *Diab Nutr Metab*, 5 (suppl 1):1-3, 1992.

- Bonner-Weir, S. Islet growth and development in the adult. *J Mol Endocrinol*, 24:297-302, 2000.
- Bonner-Weir, S.; Deery, D.; Leahy, J. L.; Weir, G. C. Compensatory growth of pancreatic beta-cells in adult rats after short-term glucose infusion. *Diabetes*, 38:49-53, 1989.
- Bonner-Weir, S.; Smith, F. E. Islet cell growth and the growth factors involved. *Trends Endocrinol Metab*, 5:60-4, 1994.
- Bonner-Weir, S.; Taneja, M.; Weir, G. C.; Tatarkiewicz, K.; Song, K. H.; Sharma, A.; O'Neil, J. J. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97:7999-8004, 2000.
- Bottino, R.; Balamurugan, A. N.; Bertera, S.; Pietropaolo, M.; Trucco, M.; Piganelli, J. D. Preservation of human islet cell functional mass by anti-oxidative action of a novel SOD mimic compound. *Diabetes*, 51:2561-7, 2002.
- Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414:813-20, 2001.
- Cardozo, A. K.; Kruhoffer, M.; Leeman, R.; Orntoft, T.; Eizirik, D. L. Identification of novel cytokine-induced genes in pancreatic beta-cells by high-density oligonucleotide arrays. *Diabetes*, 50:909-20, 2001.
- Chirgwin, J. M.; Przybyla, A. E.; MacDonald, R. J.; Rutter, W. J. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, 18:5294-9, 1979.
- de Vos, P.; Hamel, A. F.; Tatarkiewicz, K. Considerations for successful transplantation of encapsulated pancreatic islets. *Diabetologia*, 45:159-73, 2002.
- Diatchenko, L.; Lau, Y. F.; Campbell, A. P.; Chenchik, A.; Moqadam, F.; Huang, B.; Lukyanov, S.; Lukyanov, K.; Gurskaya, N.; Sverdlov, E. D.; Siebert, P. D. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93:6025-30, 1996.
- Docherty, K.; Clark, A. R. Nutrient regulation of insulin gene expression. *Faseb J*, 8:20-7, 1994.
- Edlund, T.; Walker, M. D.; Barr, P. J.; Rutter, W. J. Cell-specific expression of the rat insulin gene: evidence for role of two distinct 5' flanking elements. *Science*, 230:912-6, 1985.
- Farney, A. C.; Hering, B. J.; Nelson, L.; Tanioka, Y.; Gilmore, T.; Leone, J.; Wahoff, D.; Najarian, J.; Kendall, D.; Sutherland, D. E. No late failures of intraportal human islet autografts beyond 2 years. *Transplant Proc*, 30:420, 1998.

- Federici, M.; Hribal, M.; Perego, L.; Ranalli, M.; Caradonna, Z.; Perego, C.; Usellini, L.; Nano, R.; Bonini, P.; Bertuzzi, F.; Marlier, L. N.; Davalli, A. M.; Carandente, O.; Pontiroli, A. E.; Melino, G.; Marchetti, P.; Lauro, R.; Sesti, G.; Folli, F. High glucose causes apoptosis in cultured human pancreatic islets of Langerhans: a potential role for regulation of specific Bcl family genes toward an apoptotic cell death program. *Diabetes*, 50:1290-301, 2001.
- Federlin, K. F.; Bretzel, R. G.; Hering, B. J. Islet transplant registry. In: Ricordi, C. *Pancreatic Islet Cell Transplantation*. Austin, Texas, RG Landes Company, 1992. p462-72.
- Fraga, D. W.; Sabek, O.; Hathaway, D. K.; Gaber, A. O. A comparison of media supplement methods for the extended culture of human islet tissue. *Transplantation*, 65:1060-6, 1998.
- García-Ocaña, A.; Vasavada, R. C.; Takane, K. K.; Cebrian, A.; Lopez-Talavera, J. C.; Stewart, A. F. Using beta-cell growth factors to enhance human pancreatic Islet transplantation. *J Clin Endocrinol Metab*, 86:984-8, 2001.
- Gray, D. W.; McShane, P.; Grant, A.; Morris, P. J. A method for isolation of islets of Langerhans from the human pancreas. *Diabetes*, 33:1055-61, 1984.
- Grill, V.; Bjorklund, A. Overstimulation and beta-cell function. *Diabetes*, 50 (Suppl 1):S122-4, 2001.
- Gruessner, A. C.; Sutherland, D. E. R. Analysis of pancreas transplant outcomes for United States cases reported to the United Network for Organ Sharing (UNOS) and non-US cases reported to the International Pancreas Transplant Registry (IPTR) Annual Report for 1999. In: *Clinical Transplants*. Los Angeles, UCLA Tissue Typing Laboratory, 2000. p45-72.
- Gurskaya, N. G.; Diatchenko, L.; Chenchik, A.; Siebert, P. D.; Khaspekov, G. L.; Lukyanov, K. A.; Vagner, L. L.; Ermolaeva, O. D.; Lukyanov, S. A.; Sverdlov, E. D. Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Anal Biochem*, 240:90-7, 1996.
- Hansel, D. E.; Eipper, B. A.; Ronnett, G. V. Neuropeptide Y functions as a neuroproliferative factor. *Nature*, 410:940-4, 2001.
- Hubank, M.; Schatz, D. G. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res*, 22:5640-8, 1994.
- International Islet Transplant Registry. Newsletter 9. Brendel, M. D. *et al*, 2001.

- Jonas, J. C.; Laybutt, D. R.; Steil, G. M.; Trivedi, N.; Pertusa, J. G.; Van De Casteele, M.; Weir, G. C.; Henquin, J. C. High Glucose Stimulates Early Response Gene c-Myc Expression in Rat Pancreatic beta-Cells. *J Biol Chem*, 276:35375-81, 2001.
- Josefsen, K.; Sorensen, L. R.; Buschard, K.; Birkenbach, M. Glucose induces early growth response gene (Egr-1) expression in pancreatic beta cells. *Diabetologia*, 42:195-203, 1999.
- Kolb, E.; Largiader, F. Clinical islet transplantation. *Transplant Proc*, 12:205-7, 1980.
- Kozian, D. H.; Kirschbaum, B. J. Comparative gene-expression analysis. *Trends Biotechnol*, 17:73-8, 1999.
- Lacy, P. E.; Kostianovsky, M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes*, 16:35-9, 1967.
- Lakey, J. R.; Warnock, G. L.; Rajotte, R. V.; Suarez-Alamazor, M. E.; Ao, Z.; Shapiro, A. M.; Kneteman, N. M. Variables in organ donors that affect the recovery of human islets of Langerhans. *Transplantation*, 61:1047-53, 1996.
- Lakey, J. R.; Warnock, G. L.; Shapiro, A. M.; Korbitt, G. S.; Ao, Z.; Kneteman, N. M.; Rajotte, R. V. Intraductal collagenase delivery into the human pancreas using syringe loading or controlled perfusion. *Cell Transplant*, 8:285-92, 1999.
- Lakey, J. R. T.; Anderson, T. J.; Rajotte, R. V. Novel approaches to cryopreservation of human pancreatic islets. *Transplantation*, 72:1005-11, 2001.
- Liang, P.; Pardee, A. B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 257:967-71, 1992.
- Linetsky, E.; Selvaggi, G.; Bottino, R.; Kong, S. S.; Qian, T.; Alejandro, R.; Ricordi, C. Comparison of collagenase type P and Liberase during human islet isolation using the automated method. *Transplant Proc*, 27:3264, 1995.
- London, N. J.; Robertson, G. S.; Chadwick, D. R.; Johnson, P. R.; James, R. F.; Bell, P. R. Human pancreatic islet isolation and transplantation. *Clin Transplant*, 8:421-59, 1994.
- Lundell, I.; Blomqvist, A. G.; Berglund, M. M.; Schober, D. A.; Johnson, D.; Statnick, M. A.; Gadski, R. A.; Gehlert, D. R.; Larhammar, D. Cloning of a human receptor of the NPY receptor family with high affinity for pancreatic polypeptide and peptide YY. *J Biol Chem*, 270:29123-8, 1995.

- MacDonald, M. J.; Cook, J. D.; Epstein, M. L.; Flowers, C. H. Large amount of (apo)ferritin in the pancreatic insulin cell and its stimulation by glucose. *Faseb J*, 8:777-81, 1994.
- Maria-Engler, S. S.; Mares-Guia, M.; Correa, M. L.; Oliveira, E. M.; Aita, C. A.; Krogh, K.; Genzini, T.; Miranda, M. P.; Ribeiro, M.; Vilela, L.; Noronha, I. L.; Eliaschewitz, F. G.; Sogayar, M. C. Microencapsulation and tissue engineering as an alternative treatment of diabetes. *Braz J Med Biol Res*, 34:691-7, 2001.
- Maria-Engler, S. S.; Krogh, K.; Corrêa, M. L. C.; Colin, C.; Silva, F. L.; Aita, C. A. M.; Oliveira, E. M. C.; Corrêa, T. C. S.; Silva, I. C.; Genzini, T.; Miranda, M. P.; Noronha, I. L.; Vilela, L.; Mares Guia, M.; Mortara, R. A.; Eliaschewitz, F. G.; Sogayar, M. C. Insulin and nestin-positive cells in long-term human pancreatic islet cultures. 2002. Submetido para publicação.
- Ministério da Saúde. Diabetes mellitus: Guia básico para diagnóstico e tratamento. Brasília, 1996.
- Mitanchez, D.; Doiron, B.; Chen, R.; Kahn, A. Glucose-stimulated genes and prospects of gene therapy for type I diabetes. *Endocr Rev*, 18:520-40, 1997.
- Moldovan, S.; Brunicardi, F. C. Endocrine pancreas: summary of observations generated by surgical fellows. *World J Surg*, 25:468-73, 2001.
- Monstein, H. J.; Nylander, A. G.; Chen, D. RNA extraction from gastrointestinal tract and pancreas by a modified Chomczynski and Sacchi method. *Biotechniques*, 19:340-4, 1995.
- Mullins, D. E.; Zhang, X.; Hawes, B. E. Activation of extracellular signal regulated protein kinase by neuropeptide Y and pancreatic polypeptide in CHO cells expressing the NPY Y1, Y2, Y4 and Y5 receptor subtypes. *Regulatory Peptides*, 105:65-73, 2002.
- National Diabetes Data Group. Diabetes In America, 2nd edition. NIH Publication, 1995.
- National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. National Diabetes Statistics fact sheet: general information and national estimates on diabetes in the United States, 2000. Bethesda, MD, 2002.
- Nguyen, C.; Rocha, D.; Granjeaud, S.; Baldit, M.; Bernard, K.; Naquet, P.; Jordan, B. R. Differential gene expression in the murine thymus assayed by quantitative hybridization of arrayed cDNA clones. *Genomics*, 29:207-16, 1995.

- Nielsen, J. H.; Galsgaard, E. D.; Moldrup, A.; Friedrichsen, B. N.; Billestrup, N.; Hansen, J. A.; Lee, Y. C.; Carlsson, C. Regulation of beta-cell mass by hormones and growth factors. *Diabetes*, 50 (Suppl 1):S25-9, 2001.
- Oberholzer, J.; Toso, C.; Triponez, F.; Ris, F.; Bucher, P.; Demirag, A.; Lou, J.; Majno, P.; Buehler, L.; Philippe, J.; Morel, P. Human islet allotransplantation with Basiliximab in type I diabetic patients with end-stage renal failure. *Transplant Proc*, 34:823-5, 2002.
- O'Neill, M. J.; Sinclair, A. H. Isolation of rare transcripts by representational difference analysis. *Nucleic Acids Res*, 25:2681-2, 1997.
- Ramiya, V. K.; Maraist, M.; Arfors, K. E.; Schatz, D. A.; Peck, A. B.; Cornelius, J. G. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nat Med*, 6:278-82, 2000.
- Rane, S. G.; Reddy, E. P. Cell cycle control of pancreatic beta cell proliferation. *Front Biosci*, 5:D1-19, 2000.
- Rebrikov, D. V.; Britanova, O. V.; Gurskaya, N. G.; Lukyanov, K. A.; Tarabykin, V. S.; Lukyanov, S. A. Mirror orientation selection (MOS): a method for eliminating false positive clones from libraries generated by suppression subtractive hybridization. *Nucleic Acids Res*, 28:E90, 2000.
- Ricordi, C. The automated method for islet isolation. In: Ricordi, C. *Pancreatic Islet Cell Transplantation*. Austin, Texas, RG Landes Company, 1992. p99-112.
- Ricordi, C.; Hering, B. J.; London, N. J. M.; Rajotte, R. V.; Gray, D. W. R.; Sutherland, D. E. R.; Socci, C.; Alejandro, R.; Carrol, P. B.; Bretzel, R. G.; Scharp, D. W. Islet isolation assessment. In: Ricordi, C. *Pancreatic Islet Cell Transplantation*. Austin, Texas, RG Landes Company, 1992. p132-42.
- Ricordi, C.; Lacy, P. E.; Finke, E. H.; Olack, B. J.; Scharp, D. W. Automated method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes*, 37:413-20, 1988.
- Ricordi, C.; Tzakis, A. G.; Carroll, P. B.; Zeng, Y. J.; Rilo, H. L.; Alejandro, R.; Shapiro, A.; Fung, J. J.; Demetris, A. J.; Mintz, D. H.; et al. Human islet isolation and allotransplantation in 22 consecutive cases. *Transplantation*, 53:407-14, 1992.
- Robertson, R. P. Pancreatic islet transplantation for diabetes: successes, limitations, and challenges for the future. *Mol Genet Metab*, 74:200-5, 2001.
- Robertson, R. P.; Lanz, K. J.; Sutherland, D. E.; Kendall, D. M. Prevention of diabetes for up to 13 years by autoislet transplantation after pancreatectomy for chronic pancreatitis. *Diabetes*, 50:47-50, 2001.

- Scharp, D.; Lacy, P.; Ricordi, C.; Boyle, P.; Santiago, J.; Cryer, P.; Gingerick, R.; Jaffe, A.; Anderson, C.; Flye, W. Human islet transplantation in patients with type I diabetes. *Transplant Proc*, 21:2744-5, 1989.
- Schena, M.; Shalon, D.; Davis, R. W.; Brown, P. O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 270:467-70, 1995.
- Schummer, M.; Ng, W.; Nelson, P. S.; Bumgarner, R. E.; Hood, L. Inexpensive handheld device for the construction of high-density nucleic acid arrays. *Biotechniques*, 23:1087-92, 1997.
- Schupp, G. T.; Bonner-Weir, S.; Montana, E.; Kaiser, N.; Weir, G. C. Replication of adult pancreatic-beta cells cultured on bovine corneal endothelial cell extracellular matrix. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 29A:339-44, 1993.
- Serup, P.; Madsen, O. D.; Mandrup-Poulsen, T. Islet and stem cell transplantation for treating diabetes. *BMJ*, 322:29-32, 2001.
- Shalev, A.; Pise-Masison, C. A.; Radonovich, M.; Hoffmann, S. C.; Hirshberg, B.; Brady, J. N.; Harlan, D. M. Oligonucleotide microarray analysis of intact human pancreatic islets: identification of glucose-responsive genes and a highly regulated TGFbeta signaling pathway. *Endocrinology*, 143:3695-8, 2002.
- Shapiro, A. M.; Lakey, J. R.; Ryan, E. A.; Korbitt, G. S.; Toth, E.; Warnock, G. L.; Kneteman, N. M.; Rajotte, R. V. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med*, 343:230-8, 2000.
- Sjöholm, A. Glucose stimulates islet beta-cell mitogenesis through GTP-binding proteins and by protein kinase C-dependent mechanisms. *Diabetes*, 46:1141-7, 1997.
- Smith, F. E.; Rosen, K. M.; Villa-Komaroff, L.; Weir, G. C.; Bonner-Weir, S. Enhanced insulin-like growth factor I gene expression in regenerating rat pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88:6152-6, 1991.
- Soares, M. B. Identification and cloning of differentially expressed genes. *Curr Opin Biotechnol*, 8:542-6, 1997.
- Soon-Shiong, P.; Heintz, R. E.; Merideth, N.; Yao, Q. X.; Yao, Z.; Zheng, T.; Murphy, M.; Moloney, M. K.; Schmehl, M.; Harris, M.; et al. Insulin independence in a type 1 diabetic patient after encapsulated islet transplantation. *Lancet*, 343:950-1, 1994.
- Soria, B.; Roche, E.; Berna, G.; Leon-Quinto, T.; Reig, J. A.; Martin, F. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize

- glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes*, 49:157-62, 2000.
- Steil, G. M.; Trivedi, N.; Jonas, J. C.; Hasenkamp, W. M.; Sharma, A.; Bonner-Weir, S.; Weir, G. C. Adaptation of beta-cell mass to substrate oversupply: enhanced function with normal gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 280:E788-96, 2001.
- Susini, S.; Roche, E.; Prentki, M.; Schlegel, W. Glucose and glucocretin peptides synergize to induce *c-fos*, *c-jun*, *junB*, *zif-268* and *nur-77* gene expression in pancreatic beta(INS-1) cells. *Faseb J*, 12:1173-82, 1998.
- Swenne, I. Effects of aging on the regenerative capacity of the pancreatic B-cell of the rat. *Diabetes*, 32:14-9, 1983.
- Swenne, I. Pancreatic beta-cell growth and diabetes mellitus. *Diabetologia*, 35:193-201, 1992.
- Tanaka, M.; Katashima, R.; Murakami, D.; Adzuma, K.; Takahashi, Y.; Tomonari, A.; Iwahana, H.; Yoshimoto, K.; Itakura, M. Molecular cloning of a group of mouse pancreatic islet beta-cell- related genes by random cDNA sequencing. *Diabetologia*, 38:381-6, 1995.
- Tatarkiewicz, K.; Garcia, M.; Omer, A.; Van Schilfgaarde, R.; Weir, G. C.; De Vos, P. C-peptide responses after meal challenge in mice transplanted with microencapsulated rat islets. *Diabetologia*, 44:646-53, 2001.
- The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 329:977-86, 1993.
- The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 25 (Suppl 1):S5-20, 2002.
- Thomas, P. S. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77:5201-5, 1980.
- Tyrberg, B.; Eizirik, D. L.; Hellerstrom, C.; Pipeleers, D. G.; Andersson, A. Human pancreatic beta-cell deoxyribonucleic acid-synthesis in islet grafts decreases with increasing organ donor age but increases in response to glucose stimulation in vitro. *Endocrinology*, 137:5694-9, 1996.
- Tzakis, A. G.; Ricordi, C.; Alejandro, R.; Zeng, Y.; Fung, J. J.; Todo, S.; Demetris, A. J.; Mintz, D. H.; Starzl, T. E. Pancreatic islet transplantation after upper abdominal exenteration and liver replacement. *Lancet*, 336:402-5, 1990.

- Vedoy, C. G. Isolamento, identificação e caracterização de seqüências expressas de DNA (ESTs) de genes regulados por glicocorticóides na reversão fenotípica tumoral-normal de células ST1 de glioma de rato. 2000. 103p. Tese de Doutorado - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Vedoy, C. G.; Bengtson, M. H.; Sogayar, M. C. Hunting for differentially expressed genes. *Braz J Med Biol Res*, 32:877-84, 1999.
- Velculescu, V. E.; Zhang, L.; Vogelstein, B.; Kinzler, K. W. Serial analysis of gene expression. *Science*, 270:484-7, 1995.
- Walker, M. D.; Edlund, T.; Boulet, A. M.; Rutter, W. J. Cell-specific expression controlled by the 5'-flanking region of insulin and chymotrypsin genes. *Nature*, 306:557-61, 1983.
- Warnock, G. L.; Kneteman, N. M.; Ryan, E.; Seelis, R. E.; Rabinovitch, A.; Rajotte, R. V. Normoglycaemia after transplantation of freshly isolated and cryopreserved pancreatic islets in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*, 34:55-8, 1991.
- Webb, G. C.; Akbar, M. S.; Zhao, C.; Steiner, D. F. Expression profiling of pancreatic beta cells: glucose regulation of secretory and metabolic pathway genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97:5773-8, 2000.
- White, S. A.; Nicholson, M. L. Xenotransplantation. *Br J Surg*, 86:1499-514, 1999.
- World Health Organization. The World Health Report. Press release, 1998.
- Xu, G.; Stoffers, D. A.; Habener, J. F.; Bonner-Weir, S. Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes*, 48:2270-6, 1999.
- Yamashita, S.; Tobinaga, T.; Ashizawa, K.; Nagayama, Y.; Yokota, A.; Harakawa, S.; Inoue, S.; Hirayu, H.; Izumi, M.; Nagataki, S. Glucose stimulation of protooncogene expression and deoxyribonucleic acid synthesis in rat islet cell line. *Endocrinology*, 123:1825-9, 1988.
- Yamato, E.; Ikegami, H.; Miyazaki, J.-I.; Ogihara, T. Identification of genes regulated by glucose in a pancreatic beta-cell line by a new method for subtraction of mRNA. *Diabetologia*, 39:1293-8, 1996.
- Zhang, Q. H.; Ye, M.; Wu, X. Y.; Ren, S. X.; Zhao, M.; Zhao, C. J.; Fu, G.; Shen, Y.; Fan, H. Y.; Lu, G.; Zhong, M.; Xu, X. R.; Han, Z. G.; Zhang, J. W.; Tao, J.; Huang, Q. H.; Zhou, J.; Hu, G. X.; Gu, J.; Chen, S. J.; Chen, Z. Cloning and functional analysis of cDNAs with open reading frames for 300 previously undefined genes expressed in CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells. *Genome Res*, 10:1546-60, 2000.

CURRICULUM VITAE

Nome: Carlos Alberto Mayora Aita

Local e Data de Nascimento: Santa Maria (RS), 18/05/1966

Educação:

- I. E. Olavo Bilac, Santa Maria (RS) - 1973-1980
- Colégio Santa Maria, Santa Maria (RS) - 1981-1983
- Curso de Medicina - 1984-1989
Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria (RS)
- Residência Médica em Patologia Clínica - 1991-1994
Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo - São Paulo (SP)
- Mestrado em Ciências - Área: Imunologia - 1998
Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo - São Paulo (SP)
Título: Reatividade Humoral Anticélula Endotelial em Transplante Cardíaco Humano e Doença de Chagas
Orientador: Prof. Jorge Kalil

Publicações:

- Maria-Engler SS, Krogh K, Corrêa MLC; Colin C, Silva FL, **Aita CAM**, Oliveira EMC, Corrêa TCS, Silva IC, Genzini T, Miranda MP, Noronha IL, Vilela L, Mares Guia M, Mortara RA, Eliaschewitz FG, Sogayar MC. Insulin and Nestin-Positive Cells in Long-Term Human Pancreatic Islet Cultures. Submetido para publicação.
- Maria-Engler SS, Mares-Guia M, Correa ML, Oliveira EM, **Aita CA**, Krogh K, Genzini T, Miranda MP, Ribeiro M, Vilela L, Noronha IL, Eliaschewitz FG, Sogayar MC. Microencapsulation and Tissue Engineering as an Alternative Treatment of Diabetes. Braz J Med Biol Res, 34(6):691-7, 2001.
- Oliveira EMC, **Aita CAM**, Genzini T, Miranda MP, Correa MLC, Eliaschewitz FG, Sogayar MC, Noronha IL. Transplante de Ilhotas Pancreáticas. In: Atualidades em Nefrologia 6. São Paulo, Ed. Sarvier, 2000.
- Lojudice FH, Maria-Engler SS, Krogh K, Gianella MLC, **Aita CAM**, Oliveira EMC, Correa TCS, Silva IC, Genzini T, Miranda MP, Noronha IL, Mortara RA, Vilela L, Mares-Guia M, Eliaschewitz FG, Sogayar MC. Terapia Celular para o tratamento do diabetes. In: Avanços da Biologia Celular. Porto Alegre, Ed. EDIPUCRS, 2002.