**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES
DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM INSULINOMAS
BENIGNOS HUMANOS**

KARIN KROGH

Orientadora: Profa. Dra. MARI CLEIDE SOGAYAR

**Tese de Doutorado apresentada ao
Departamento de Bioquímica**

SÃO PAULO

Quinze de fevereiro de 2005

“Levanta, sacode a poeira e dá a volta por cima.....”

(Paulo Vanzolini)

Aos meus pais, exemplos de vida...

Ao Damont, pelo maior amor do mundo...

Às minhas irmãs, por tudo que são...

Agradecimentos

À professora Mari Cleide Sogayar que conseguiu, com muita sabedoria, associar orientação e amizade durante estes anos;

À professora Anna Carla Goldberg, por seu constante apoio e amizade;

Ao corpo técnico do laboratório (Zizi, Débora, Helena, Luana, Sandra e Ricardo), pela amizade e pelos excelentes serviços prestados;

Aos companheiros da Unidade de Ilhotas Pancreáticas Humanas (Fernando, Patrícia e Leticia) por conseguirem transformar plantões estressantes em momentos de pura descontração;.

Ao pessoal do LBCM, Luciana Cruz, Juan, Ana Paula, Diana, Juliana, Ísis, Luciana, Antero, Cléber, Marcos, Marina Denise e em especial ao Christian por terem conseguido unir trabalho a companheirismo;

À grande cientista e amiga Leticia Labriola, pelas nossas tão produtivas e agradáveis conversas;

Aos novos e incríveis amigos, Wagner (meu guru espiritual), Theri, Ricardo, Léo, Fê Festa, Sheila, Rita, Anselmo e Gabriela (Pipoca);

Agradecimentos mais que especiais ao amigo Leonardo Oliveira, grande companheiro na minha batalha com o computador e à única Fê Festa pelas críticas pertinentes na leitura da tese;

Aos mais novos companheiros, as Caróis, Vítor e Ilana;

À Fernanda Ortis, Maki, Mariana, Carlos e Irê, amigos que estarão sempre em minhas lembranças;

Ao pessoal da bioinformática do laboratório, Renato e André, por estarem sempre a postos;

Ao Dr. Daniel Giannella e sua aluna Sandra Valéria de Sá, pela prestimosa colaboração;

Ao Dr. Marcel Machado pelos insulinomas;

Aos amigos eternos de Ribeirão Preto, Silmara e Luis, por permanecerem a meu lado mesmo à distância;

À D. Gizélia, Érika, Urbano, Chris, Diego e Arthur por terem me recebido com tanto carinho em suas famílias;

À Elisabeth da Costa Oliveira pelos ensaios com animais e ao pessoal da Faculdade de Medicina pelos ensaios de imunohistoquímica;

Aos professores, colegas e funcionários do Instituto de Química, pelo apoio e atenção;

À Fapesp, CNPq, Finep pelo auxílio financeiro no desenvolvimento deste trabalho.

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas	I
RESUMO	IV
ABSTRACT	V
1. Introdução	1
2. Objetivos	17
3. Material e Métodos	18
3.1. Material biológico	18
3.1.1. Pâncreas	18
3.1.2. Insulinomas	18
3.1.3. Linhagens Celulares	18
3.2. Soluções	20
3.3. Isolamento e purificação de ilhotas pancreáticas normais	20
3.4. Extração de RNA e preparo dos cDNAs	21
3.5. Isolamento de genes diferencialmente expressos	22
3.5.1. Construção de bibliotecas de cDNA subtraídas de acordo com o protocolo de RDA ("Representational Difference Analysis")	22
3.5.2. Caracterização dos produtos subtraídos	25
3.5.3. CodeLink "bioarrays"	26
3.6. Confirmação da expressão diferencial dos genes	30
3.6.1. "Primers"	30
3.6.2. RT-PCR semi-quantitativo	31
3.6.3. Real-Time PCR	32
3.7. Estabelecimento da linhagem celular de insulinoma humano	37
3.7.1. Insulinoma	37
3.7.2. Cultura primária	37
3.7.3. Teste de atividade funcional	38
3.7.4. Imunofluorescência	39
3.7.5. Crescimento em suspensão de agarose	39
3.7.6. Ensaio de tumorigênese	39
3.7.7. Imunohistoquímica	40
3.7.8. Estudo de proliferação celular	41
4. Resultados	43
4.1. Construção das bibliotecas subtraídas de cDNA	43
4.1.1. Geração das representações	43

4.1.2. Geração do primeiro e do segundo produto diferencial (DP1 e DP2)	45
4.1.3. Rastreamento dos clones subtraídos da biblioteca <i>forward</i>	47
4.1.4. Confirmação da expressão diferencial dos clones de cDNAs e sequenciamento	50
4.1.5. Análise Bioinformática do gene FLJ13072	54
4.1.6. Análise comparativa da expressão de FLJ13072 em diversas linhagens celulares humanas	59
4.2. CodeLink Bioarrays	61
4.3. Validação, por Real-Time PCR, da expressão diferencial dos genes identificados através da plataforma CodeLink	74
4.4. Estabelecimento e caracterização da linhagem de insulinoma humano	82
4.4.1. Cultura celular do insulinoma GLS	82
4.4.2. Caracterização da cultura do insulinoma GLS quanto ao seu caráter tumorigênico	87
4.4.3. Estudo da atividade proliferativa da cultura do insulinoma GLS frente a estímulos com mitógenos	92
5. Discussão	98
5.1. Construção da biblioteca de RDA	99
5.2. Plataforma de "Bioarrays" CodeLink	100
5.3. Genes super-expressos nos insulinomas	102
5.3.1. STAT4	102
5.3.2. PRSS11	105
5.3.3. ASCL1	106
5.3.4. ECRG4	108
5.3.5. SPARCL1	109
5.3.6. FLJ13072	112
5.4. Estabelecimento e caracterização de culturas primárias e precoces de insulinomas humanos	113
6. Conclusões	118
7. Referências bibliográficas	120
8. Curriculum Vitae	135

Lista de Abreviaturas

ABS- Absorbância
ASCL1- "Human Achaete-Scute homologue 1"
ATP- Trifosfato de adenosina
cDNA- DNA complementar
CMRL-
cRNA- RNA complementar
CT- "Threshold cycle"
CTP- Trifosfato de citosina
dCTP- Trifosfato de desoxicitosina
DEPC- Dietilpirocarbonato
DM- "Diabetes mellitus"
DME- Dulbecco 's Modified Eagle
DNA- Ácido desoxirribonucléico
dNTP- desoxinucleotídeo
DPI- "Differential Product I"
DPII- "Differential Product II"
DTT- Ditionitrito
ECRG4- "Esophageal Cancer-Related gene 4"
EF1B- "Elongation Factor 1, Beta"
EGF- "Epidermal Growth Factor"
ERK- "Extracellular-regulated kinase"
Fbox2- Neural F-box protein
GAPDH- Gliceraldeído 3-fosfato
GO- "Gene Ontology"
GTP- Trifosfato de guanina
HMGIC- "High Mobility Group IC"
HPRT- Hipoxantina-guanina fosforribosil transferase
HTCF4 - "Human Ternary Complex Factor 4"
IGF- "Insulin-like Growth Factor"

IGFALS- "Insulin-like Growth Factor Binding Protein, Acid Labile Subunit"
IGFBP- "Insulin like Growth Factor Binding Protein"
MAPK- "Mitogen-Activated Protein Kinase"
MEM- "Modified Eagle's Medium
MgCl₂- Cloreto de Magnésio
MOS- "Mirror Orientation Selection"
mRNA- RNA mensageiro
NaOH- Hidróxido de Sódio
NEM-1- Neoplasia Endócrina Múltipla do tipo 1
PACSIN2- "Protein kinase C and Casein Kinase Substrate in Neurons"
pb- pares de bases
PBSA- Solução salina de PBS sem cálcio e magnésio
PCR- "Polymerase chain reaction"
PI3K- "Phosphatidylinositol-3-kinase
PPP1CB- "Protein Phosphatase 1, Beta"
PRSS11- "Protease, Serine 11"
RDA- "Representation Difference Analysis"
rh PRL- Prolactina humana recombinante
RNA- Ácido ribonucléico
RNase- Ácido ribonuclease
RT-PCR- "Reverse transcriptase-polymerase chain reaction"
SAGE- "Serial Analysis of Gene Expression"
SDS- "Sodium Dodecyl Sulfate"
SFB- Soro Fetal Bovino
Shc- "Src homology and collagen"
SPARCL1- "Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein Like 1"
SSC- Solução salina contendo Citrato de sódio, pH 7,0
SSH- "Suppressive Subtraction Hybridization"
SSPE-Solução salina contendo sódio/fosfato e EDTA, pH 7,0
STAT4- "Signal Transducer and Activator of Transcription 4"

TAE- Tampão Tris-Acetato EDTA pH 7,5

TBS- Solução salina Tris-tamponada

TGF- "Transforming Growth Factor"

tRNA- RNA transportador

UTP- Trifosfato de uridina

UW-"University of Winsconsin"

VEGF- "Vascular Endothelial Growth Factor"

VHL- "Von Hippel-Lindau

RESUMO

Os insulinomas são os mais comuns neoplasmas endócrinos pancreáticos, constituindo cerca de 17% de todos os tumores neuroendócrinos do trato digestivo. São tumores raros, que tem, como principal manifestação clínica, a hipoglicemia, a qual é ocasionada por secreção exagerada de insulina pelo tumor.

Devido ao fato de serem tumores raros, o conhecimento das mudanças genéticas associadas à iniciação e progressão desses tumores é muito limitado. Em função disto, o objetivo deste trabalho é a identificação de genes diferencialmente expressos em insulinomas benignos humanos, visando o melhor entendimento dos mecanismos moleculares do processo tumorigênico dos insulinomas e a descoberta de novos alvos moleculares para terapia.

Utilizando-se a plataforma de "bioarrays" CodeLink foram identificados 354 genes mais expressos nos insulinomas benignos, sendo que 16% estavam envolvidos em proliferação. Dentre estes genes foram escolhidos 6 genes para validação por "Real-Time PCR", onde os genes SPARCL1, PRSS11, STAT4, ECRG4, ASCL1 confirmaram sua expressão diferencial nos tumores, porém a diferença do gene IGFALS não foi estatisticamente significativa.

Através da técnica "Representational Difference Analysis", isolou-se o clone FLJ13072, como super-expresso nos insulinomas benignos quando comparado à ilhotas normais, sendo que a sequência protéica putativa deste gene apresenta um domínio conservado de helicase, podendo estar envolvido em eventos de transcrição, tradução, reparo de DNA e remodelamento de cromatina.

Uma das dificuldades encontradas no estudo dos insulinomas é a falta de linhagens celulares humanas. Por esta razão, iniciou-se o estabelecimento de culturas primárias e precoces de insulinomas humanos visando sua utilização como modelos celulares para futuros estudos funcionais dos genes identificados.

ABSTRACT

Insulinomas are the most common pancreatic endocrine neoplasms, comprising around 17% of all neuroendocrine tumors of the digestive tract. These rare tumors have hypoglycemia as the main clinical manifestation, caused by over secretion of insulin by the tumor.

Based on that, the objective of this work is the identification of differentially expressed genes in human benign insulinomas, aiming at the better understanding of the molecular mechanisms of their tumorigenic process and the discovery of new molecular targets for therapeutics.

Using the CodeLink bioarrays platform (GE Healthcare) 354 genes upregulated in human benign insulinomas were identified, among which, 16% are involved in cell proliferation. From these genes, 6 were chosen for validation by Real Time PCR, where SPARCL1, PRSS11, STAT4, ECRG4 and ASCL1 were shown to be upregulated in all benign tumors, however the expression difference of IGFALS gene were not statistically significant.

Using the RDA (Representational Difference Analysis) methodology, the unknown gene FLJ13072 was shown to be upregulated in benign insulinomas when compared to normal pancreatic islets. The putative protein product from this gene has an helicase domain, being possibly involved in processes like transcription, translation, DNA repair and chromatin remodeling.

An important drawback for the study of insulinomas is the lack of human cell lines. Because of that, the establishment of early primary cultures of human insulinomas was initiated, aiming at its use as a cell model for future functional studies of the genes identified.

1. INTRODUÇÃO

O pâncreas é uma glândula digestiva de secreção interna e externa, de mais ou menos 15 cm de comprimento e de formato triangular, localizada transversalmente sobre a parede posterior do abdomen, na alça formada pelo duodeno, sob o estômago. Este órgão é formado por uma cabeça que se encaixa no quadro duodenal, de um corpo e de uma cauda afilada. A secreção externa do pâncreas é dirigida para o duodeno pelos canais de Wirsung e de Santorini. O canal de Wirsung desemboca ao lado do canal colédoco na ampola de Vater. O pâncreas comporta dois órgãos estreitamente imbricados: pâncreas exócrino e o endócrino (Warwick, 1979)(Figura 1).

Figura 1. Esquema representativo do pâncreas. Figura retirada do site www.webciencia.com

O pâncreas exócrino é composto de células acinares envolvidas na síntese de enzimas digestivas, que compreende o maior volume do órgão total e o pâncreas endócrino, que é

composto pelas Ilhotas de Langerhans responsáveis pela secreção de diversos hormônios (Bonner-Weir, 1990). As ilhotas pancreáticas foram descritas por Paul Langerhans em 1869 (Langerhans, 1869) como corpúsculos globulosos presentes em grande número no parênquima do pâncreas. No adulto, as ilhotas representam aproximadamente 1-2% da massa total do pâncreas humano, com um núcleo central constituído por células beta (secretores de insulina), circundadas por células alfa (produtoras de glucagon); células delta (secretores de somatostatina) e células PP (secretores do polipeptídeo pancreático) (Philippe, 1991); ASHCROFT & ASHCROFT, 1992) (Figura 2). Outros tipos celulares estão presentes, mas em menor frequência, como as células D₁, produtoras de bombesina e VIP (Polipeptídeo Vaso Intestinal); células EC, produtoras de serotonina e substância P, e as células gama, as quais produzem gastrina (BONNER-WEIR, 1990).

Do ponto de vista médico, o pâncreas endócrino é um importante órgão devido à sua associação com duas doenças: o *Diabetes mellitus* e os tumores de ilhotas pancreáticas.

Figura 2. Imunohistoquímica em cortes de pâncreas para os anticorpos anti-insulina (A), anti-glucagon (B) e anti-somatostatina (C), que indicam respectivamente, as células beta, células alfa e células delta.

Figura retirada do site pathology.mc.duke.edu.

Diabetes mellitus

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

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 a doença 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, aos fatores dietéticos e ao sedentarismo (Rodriguez et al., 2002).

O *Diabetes* pode ser dividido em dois tipos principais, segundo o "THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS, 2002": a) DM do tipo 1; b) DM do tipo 2.

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).

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 auto-imune mediada por células (DM tipo 1a) (Atkinson & Maclaren, 1994) ou por mecanismo não auto-imune idiopático (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, em função do 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 (DeFronzo, 2004).

Bases moleculares da tumorigênese

As células de mamíferos possuem diversos meios de proteção contra potenciais efeitos de mutações em genes com envolvimento em câncer, porém quando diversos genes apresentam-se alterados um processo neoplásico se desenvolve. Alterações em três tipos de genes seriam os principais fatores responsáveis pelo processo tumorigênico: os oncogenes, os genes supressores de tumor e os genes de estabilidade (Vogelstein & Kinzler, 2004).

A ativação de oncogenes pode resultar de translocações cromossômicas, de amplificações gênicas ou de mutações intragênicas afetando resíduos cruciais que regulam a atividade do produto gênico. Uma mutação somática ativadora em um alelo de um oncogene, geralmente é o suficiente para conferir uma vantagem seletiva de crescimento na célula.

Os genes supressores de tumor contribuem de maneira oposta para o processo tumorigênico: mutações reduzem a atividade do produto gênico. Tais inativações originam-se de mutações de troca de bases em resíduos que são essenciais para sua atividade, mutações que resultam em uma proteína truncada, deleções ou inserções de vários tamanhos, ou de silenciamento epigenético. Normalmente, mutações nos alelos maternos e paternos de um gene supressor de tumor são necessárias para conferir uma vantagem seletiva de crescimento celular. Esta situação geralmente ocorre através da deleção de um alelo via um evento cromossomal grande, como a perda de um cromossomo inteiro ou do braço cromossomal associado a uma mutação intragênica do outro alelo (Knudson, 2002).

Dentre os genes de estabilidade encontram-se os “mismatch repair”, genes de reparo por excisão nucleotídica e reparo por excisão de base, responsáveis pelos reparos realizados em erros ocorridos durante a replicação do DNA ou induzidos por exposições a agentes mutagênicos. Outros genes de estabilidade controlam processos envolvendo grandes porções cromossomais, tais como os responsáveis por recombinação e segregação cromossomal, como por exemplo, BRCA1, BLM e ATM (Friedberg, 2003).

Como os genes supressores de tumor, normalmente ambos alelos dos genes de estabilidade devem estar inativados para que ocorra o efeito patológico.

Mutações nestas 3 classes de genes podem ocorrer na linhagem germinativa, resultando em predisposição hereditária ao câncer, ou em células somáticas, resultando em tumores esporádicos. A primeira mutação somática em um oncogene ou gene supressor de tumor ocasiona uma expansão clonal iniciando o processo neoplásico (Nowell, 2002). Subseqüentes mutações somáticas são necessárias para que ocorram novos ciclos de

expansão clonal e, conseqüentemente, a progressão do tumor (Maley et al., 2004).

Mutações em oncogenes e genes supressores de tumor operam de maneira similar ao nível fisiológico: elas dirigem o processo neoplásico, aumentando o número de células tumorais, através do estímulo do ciclo celular ou da inibição da morte celular. O aumento pode ser causado pela ativação de genes que dirigem o ciclo celular, pela inibição de processos apoptóticos normais ou facilitando a provisão de nutrientes através do aumento da angiogênese (Friedberg, 2003).

Diversos genes envolvidos em câncer controlam diretamente transições de um estado de repouso (G0 ou G1) para uma fase de replicação do ciclo celular (S), como a quinase dependente de ciclina 4 (CDK4), ciclina D1, gene do retinoblastoma (Rb), e p16 (Classon & Harlow, 2002; Ortega et al., 2002; Sherr, 2000).

Rb e p16 são genes supressores de tumor inativados por mutação, enquanto que CDK4 e ciclina D1 são oncogenes ativados por mutações, sendo que os quatro interagem, em uma única via, nos tumores (Classon & Harlow, 2002, Ichimura et al., 2000).

Outra proteína envolvida no controle da progressão do ciclo celular é a p53, um fator de transcrição que normalmente inibe o crescimento celular e induz a morte celular quando estimulada por estresse. Uma mutação pontual é a maneira mais comum de interromper a via de p53, impedindo-a de se ligar especificamente a sua sequência de reconhecimento no DNA (Oren, 2003; Prives & Hall, 1999; Vogelstein et al., 2000).

Uma das mais importantes descobertas na década de 90 foi que, aparentemente, todos os vírus tumorais de DNA, que promovem a formação de tumores, codificam proteínas que inativam Rb e p53 (Klein, 2002; Munger & Howley, 2002; zur Hausen, 2001).

Além das vias de Rb e p53, existem outras que possuem importante papel em diversos tipos tumorais, como APC (Adenomatous polyposis coli), GLI (Gene associado a glioma), HIF-1 (Fator de Transcrição induzido por Hipóxia), PI3-K (Fosfatidil-inositol quinase), SMADs e receptores tirosina-quinase (RTKs) (Hunter, 2000).

Além dos genes que se encontram mutados em um número significativo de tumores, existem muitos outros que estão envolvidos em neoplasias, porém não estão mutados e sim, expressos em menor ou maior grau nestes tumores (Brown & Botstein, 1999; Polyak & Riggins, 2001). Geralmente, estes genes estão associados a mudanças epigenéticas, isto é, modificações covalentes no DNA ou cromatina, presentes durante a divisão celular. Diferentemente das modificações genéticas, pode-se observar modificações epigenéticas idênticas às encontradas em câncer, em alguns estágios do desenvolvimento (Feinberg & Tycko, 2004; Jones & Baylin, 2002).

Existe também, uma outra forma de instabilidade, a instabilidade cromossomal, comumente encontrada em cânceres, e que é melhor observada ao nível cromossomal do que ao nível de nucleotídeos. Ao nível molecular, as perdas de cromossomos são evidenciadas como perda de heterozigose (LOH). Uma média de 25-30% dos alelos presentes em células normais é perdida em cânceres, principalmente em regiões contendo genes supressores de tumor e não é raro observar a perda de até 75% dos alelos (Lengauer et al., 1998).

Um dos processos importantes para a formação do tumor, que envolve o desbalanço das vias dos oncogenes e genes supressores de tumor é a angiogênese. A angiogênese é um processo de formação de novos vasos sanguíneos, os quais são importantes para o aporte de nutrientes e oxigênio até o interior da massa tumoral. Embora este processo não seja completamente entendido,

ele pode ser descrito pelos seguintes eventos seqüenciais: a degradação da lâmina basal que envolve os capilares, migração das células endoteliais que revestem os capilares no tumor, divisão das células endoteliais, e formação de uma nova membrana basal envolvendo os capilares recentemente formados (Bergers & Benjamin, 2003).

Muitos tumores produzem fatores de crescimento que estimulam a angiogênese; outros induzem células adjacentes normais a sintetizar e secretar tais fatores. O fator de crescimento de fibroblasto (FGF), fator de crescimento transformante alfa (TGF α), e o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), os quais são secretados por muitos tumores, possuem propriedades angiogênicas (Verheul et al., 2004).

A ação destes fatores e a interação entre as células epiteliais neoplásicas e as células do estroma tem sido extremamente reconhecidos nos últimos anos (Fata et al., 2004; Tlsty & Hein, 2001; Verheul et al., 2004). Em primeiro lugar, em função da identificação de inibidores angiogênicos que promoveram a inibição do crescimento de tumores experimentais (Folkman, 2002; Kerbel & Folkman, 2002). Em segundo lugar, o desenvolvimento de inibidores sintéticos de uma das principais vias regulatórias da angiogênese (VEGF) levou à inibição da progressão celular em pacientes com câncer (Ferrara et al., 2004), e, em terceiro, a inativação do gene Von Hippel Lindau (VHL), um clássico gene supressor de tumor, favoreceu o crescimento de tumores de células renais através do controle da angiogênese (Kondo et al., 2002). Finalmente, todas as vias dos oncogenes e genes supressores de tumor parecem estar envolvidas, direta ou indiretamente no processo de angiogênese (Vogelstein & Kinzler, 2004).

A presença de vasos sanguíneos adjacentes também facilita o processo de metástase, favorecendo o espalhamento do tumor e a formação de sítios secundários de crescimento.

Alguns dos processos bioquímicos envolvidos nos estágios precoces da metástase, tais como aumento da motilidade celular e produção de proteases que degradam a matriz extracelular estão bem estudados, no entanto, as alterações genéticas responsáveis por dotar as células com estas habilidades, ainda não estão identificadas claramente (Fidler, 2002). Embora anormalidades nos genes já conhecidos envolvidos em câncer, seja essencial para a tumorigênese, a maioria delas ocorre em um estágio precoce da doença e nenhum destes genes está associado especificamente ao processo de metástase (Chambers et al., 2002).

O melhor conhecimento dos mecanismos moleculares da biologia do câncer, como a angiogênese tumoral e a migração celular permitiria a identificação de novas moléculas envolvidas nestas vias, desta forma abrindo novas perspectivas no campo da terapia anti-câncer (Vogelstein & Kinzler, 2004).

Tumores neuroendócrinos pancreáticos (TNEP)

Os tumores de ilhotas pancreáticas podem ser de dois tipos: os funcionais (que produzem um ou mais hormônios) e os não-funcionais (que não produzem hormônios). Os tumores funcionais são classificados de acordo com os peptídeos por eles secretados e respectivas síndromes clínicas resultantes (Delcore & Friesen, 1994; Kent et al., 1981; Modlin et al., 1993). Cinco síndromes clinicamente distintas já foram descritas: insulinoma, gastrinoma, glucagonoma, VIPoma, e somatostatina (Figura 3) (Delcore & Friesen, 1994), sendo que o insulinoma é o mais comum, estando em geral associado com um bom prognóstico (Stefanini et al., 1974). A maioria dos tumores funcionais é maligna, com exceção do insulinoma, onde somente 5-10% dos pacientes apresentam tumores com características de malignidade (Fraker & Norton, 1989; Service et al., 1991).

Atualmente, a designação "tumor neuroendócrino do pâncreas" foi substituído pelo termo "carcinoma neuroendócrino", e os termos bem-diferenciado (grau I), moderadamente-diferenciado (grau II) e pouco-diferenciado (grau III), são geralmente acrescentados a "carcinoma neuroendócrino" quando apropriado (Wick, 2000).

Tumores de ilhotas Pancreáticas

Figura 3. Desenho esquemático mostrando a porcentagem relativa dos diversos tipos de tumores de ilhotas pancreáticas e suas principais manifestações clínicas. Figura modificada do site www.mfi.ku.dk.

Insulinomas

Os insulinomas são as mais comuns neoplasias endócrinas pancreáticas, constituindo cerca de 17% de todos os tumores

neuroendócrinos do trato digestivo (Buchanan et al., 1986). São tumores raros, tendo uma prevalência de 1 em um milhão de pessoas ao ano e uma incidência de 4 pacientes por 1 milhão de pessoas ao ano (Boden, 1989; Service et al., 1991). A maioria dos insulinomas origina-se esporadicamente, em indivíduos com uma idade média de 50 anos, sendo normalmente pequenos (< 2 cm) e solitários. Porém podem ser múltiplos, especialmente quando estão associados à síndrome da neoplasia endócrina múltipla do tipo I (NEM-I) (Boden, 1989; Proye, 1987), uma síndrome tumoral autossômica dominante caracterizada por hiperplasia da paratireóide, ou por tumores endócrinos pancreáticos e adenomas pituitários. Os insulinomas ocorrem em 5-10% dos pacientes com a síndrome NEM-1 (Trump et al., 1996).

A grande maioria dos insulinomas são benignos (> 90%) (Boden, 1989; Proye, 1987), apesar disso, aproximadamente 6% dos tumores tornam-se malignos e estão associados com a invasão local dos tecidos adjacentes ou com a presença de metástase no fígado e nos linfonodos (Broder & Carter, 1973). Os insulinomas malignos ocorrem em pacientes de idade avançada, não sendo observados em crianças (Stringel et al., 1985). Além disso, os homens parecem ser mais afetados que as mulheres (Danforth et al., 1984).

Para determinar a malignidade destes tumores por histopatologia é ocasionalmente muito difícil. Uma nova classificação foi proposta pela *World Health Organization* (Kloppel, 1997; Rindi et al., 1998) em que tumores menores que 2 cm, confinados ao pâncreas, sem angio-invasão ou metástases e com um índice mitótico de menos que duas mitoses por campo utilizando uma objetiva de 10x são considerados benignos. No entanto, os únicos critérios para malignidade são a infiltração do tumor em órgãos adjacentes, a presença de angio-invasão do linfonodo, e/ou metástases distantes (Kloppel, 1997). Como a maioria dos

marcadores propostos é de valor limitado na prática diária (La Rosa et al., 1996) e o prognóstico individual de um dado paciente não pode ser satisfatoriamente predito por parâmetros convencionais histológicos ou padrões de expressão imunohistoquímica, a utilização de marcadores moleculares que indicassem o grau de malignidade seria um avanço nessa área (Wild et al., 2001).

A principal manifestação clínica do insulinoma é, principalmente, a hipoglicemia, a qual é ocasionada por secreção exagerada e não controlada de insulina pelo tumor. O diagnóstico do insulinoma é frequentemente difícil e lento, requerendo a intervenção de clínicos gerais ao lado de endocrinologistas, em função dos sintomas neuropsiquiátricos do paciente, como: vista turva, incoerência, comportamento anormal, psicoses e sintomas adrenérgicos e hipoglicopênicos como: palpitações, diaforese e tremores, resultantes da neuroglicopenia em pacientes com este tipo de tumor (Doherty et al., 1991; Fajans & Vinik, 1989). Mais de 80% dos pacientes possuem sintomas transitórios de disfunção do Sistema Nervoso Central, existindo diversos relatos de pacientes com insulinoma que apresentam diagnósticos psiquiátricos ou neurológicos errôneos (Glickman et al., 1980). A confirmação do diagnóstico requer jejum supervisionado de 72 horas (Delcore & Friesen, 1994; Grant, 1993). Uma vez hospitalizados, os pacientes normalmente manifestam sintomas de hipoglicemia em 24 horas. Neste período os níveis sorológicos de glicose, insulina e peptídeo C deverão ser dosados e a presença de níveis elevados de peptídeo C, níveis de glicose menores que 40 mg/dl com níveis concomitantes de insulina superiores a 6 mU/ml, confirmam o diagnóstico de insulinoma (Grant, 1993; van Heerden et al., 1979).

Uma vez realizado o diagnóstico, os sintomas podem ser melhorados modificando-se a dieta do paciente (Ellison et al., 1986; Pasioka et al., 1992; Stefanini et al., 1974) e através da

administração de drogas que auxiliam no controle da hipoglicemia (Norton, 1994).

Embora a associação clínica de hipoglicemia e tumores de células beta pancreáticas tenha sido descrita em 1927 (Wilder et al., 1927), os mecanismos moleculares envolvidos nesta doença ainda são desconhecidos. Alguns estudos em roedores mostram alto conteúdo de insulina em insulinomas e sugerem que o defeito está ao nível da razão estímulo-secreção. No entanto, resultados de estudos histoquímicos em insulinomas humanos, mostraram que os tumores possuem um conteúdo reduzido de insulina quando comparados às células beta normais, mostrando que é possível que a diminuição da capacidade de armazenamento e a liberação hormonal descontrolada sejam responsáveis pela hiperinsulinemia (Creutzfeldt et al., 1976). Porém, ainda permanece desconhecido como estes tumores conseguem manter estes altos níveis de secreção de insulina sem a exaustão das células beta como pode ser observado nos estágios tardios do diabetes do tipo 2. Fisiologicamente, a secreção de insulina ocorre somente se os estoques nas células beta forem completamente re-abastecidos pela biossíntese da proteína.

O principal ponto da regulação da biossíntese da insulina ocorre ao nível da tradução (Goodge & Hutton, 2000). Esta regulação traducional específica envolve a região 5' não traduzida do gene. O gene da (prepro) insulina consiste de três exons e dois introns (figura 4). Visto que a região codificadora inicia-se no exon 2, o exon 1, intron 1 e parte do exon 2 fazem parte da região 5' não traduzida (Shalev et al., 2002). Estudos identificaram a super-expressão de um variante de *splicing* da insulina em insulinomas quando comparados às células beta normais (Minn et al., 2004). Este variante mantém 26 pb do intron 1 e, assim, modificações na região 5' não traduzida, porém sem modificações na região codificadora. Esta variante de *splicing* da insulina mostrou uma

maior eficiência de tradução *in vitro* e *in vivo* comparado com o mRNA da insulina nativa, permitindo, assim um aumento da síntese de insulina. A super-expressão desta variante com maior eficiência de tradução, em insulinomas, explicaria como estes tumores mantêm altos níveis de síntese de insulina, que, juntamente com a sua secreção descontrolada, levaria aos episódios característicos de hipersinsulinemia e hipoglicemia nesta doença.

Figura 4. Representação esquemática da biossíntese de insulina.

E=exon, I=intron. O *splicing* remove seqüências intrônicas e produz o RNA mensageiro maduro. * Códon de iniciação e término identificando a região codificante, a qual não é afetada pelo variante de *splicing*.

Para o tratamento do insulinoma, a escolha é a ablação do tumor (Marks & Teale, 1991; Menegaux et al., 1993). O principal problema enfrentado pelos cirurgiões corresponde à localização exata destes tumores no pré- e, principalmente, no intra-operatório, pois nenhuma técnica de imagem mostra-se suficientemente segura (Machado et al., 1998). Utiliza-se, então, a experiência do cirurgião na palpação do pâncreas durante o ato operatório, associada à ultrassonografia intra-operatória.

Para pacientes com insulinoma benigno, o tratamento cirúrgico apresenta resultados altamente satisfatórios e uma vida normal pode ser esperada após a cirurgia (Service et al., 1991).

Devido ao fato de serem tumores raros, o conhecimento das mudanças genéticas associadas à iniciação e progressão desses tumores é muito limitado. Além disso, os dados genéticos contam com um pequeno número de tumores analisados (Bartsch et al., 1999). No entanto, diversas observações sugerem que a ativação dos proto-oncogenes *c-myc*, e *K-ras*; e a super-expressão do Fator de Crescimento Transformante alfa (TGF-alfa) e a proteína supressora de tumor p53, podem ocorrer durante a progressão maligna (Pavelic et al., 1995).

Um alto número de alterações genéticas foi encontrado no gene *MEN I* presente no cromossomo 11q13, o qual é responsável pela síndrome NEM I, uma síndrome hereditária caracterizada por tumores originados primariamente de tecidos endócrinos (Chandrasekharappa et al., 1997). A perda da heterozigosidade, incluindo a região do gene *MEN I*, foi identificada em 93% dos gastrinomas e em 50% dos insulinomas; enquanto que mutações somáticas no mesmo gene foram identificadas em 33% dos gastrinomas e 17% dos insulinomas (Zhuang et al., 1997). Estudos de LOH em outros loci não revelaram algum outro gene candidato para a iniciação ou progressão de tumores neuroendócrinos (Dietrich et al., 1994; Iwamura et al., 1992; Sawicki et al., 1992). Por exemplo, recentemente foi demonstrado que a perda da região cromossomal 3p25 em tumores neuroendócrinos está associada com um fenótipo mais agressivo, porém, nenhuma mutação no gene VHL, localizado nesta região do cromossomo, envolvido na doença autossômica dominante de Von Hippel-Lindau, que afeta indivíduos desenvolvendo múltiplas neoplasias em órgãos alvo, está presente nestes tumores (BARGHORN et al., 1998). Outros "loci" cromossomais estavam ocasionalmente deletados em tumores

neuroendócrinos como o 1p, 5q, 9q, 7q e 16q (Ding et al., 1992; Radford et al., 1990).

Speel e colaboradores, através da técnica de Hibridização Genômica Comparativa, identificaram aberrações cromossômicas mais comuns em insulinomas, como ganho na região 9q, sendo a região mais envolvida a 9q34 e perda nas regiões 1p, 1q, 4q, 11q, Xq e Y. Este grupo também mostrou que perdas nas regiões 3pq e 6q e ganho nas regiões 17pq e 20q estão fortemente associados ao comportamento maligno de insulinomas.

Nosso entendimento dos mecanismos moleculares do processo de tumorigênese dos insulinomas é ainda escasso. Recentemente, foram publicados os primeiros trabalhos mostrando uma análise de expressão global de insulinomas humanos, identificando diversos genes, tais como oncogenes, fatores de crescimento, moléculas de adesão e migração e etc, iniciando um estudo das possíveis vias responsáveis pelo processo de tumorigênese em insulinomas (Jin et al., 2003; Kayton et al., 2003; Maitra et al., 2003).

A identificação e caracterização de genes diferencialmente expressos em insulinomas humanos pode abrir o caminho para a geração de “chips” de DNA para o diagnóstico rápido destes tumores, além de contribuir para avaliar o prognóstico e o pós-operatório. Além disso, estes genes constituem-se em ferramentas poderosas para o desenho de estratégias futuras de terapia destes tumores.

2. OBJETIVOS

Devido ao fato dos insulinomas serem tumores raros, o conhecimento das mudanças genéticas associadas à iniciação e progressão desses tumores é muito limitado. Em função disto, o objetivo deste trabalho é a identificação de genes diferencialmente expressos em insulinomas benignos humanos que possam levar ao entendimento dos mecanismos moleculares do processo tumorigênico dos insulinomas e auxiliar no diagnóstico precoce, permitindo uma classificação prognóstica mais acurada dos tumores neuroendócrinos pancreáticos e a descoberta de novos alvos moleculares para terapia. Para isto, o presente estudo propõe:

1. Identificação e isolamento e de genes diferencialmente expressos em insulinomas benignos, quando comparados a ilhotas normais, através de técnicas de subtração de cDNAs, associadas a PCR e técnicas de microarranjos de oligos de DNA.
2. Estabelecimento e caracterização de culturas primárias e culturas precoces de insulinomas humanos, com o objetivo de obtenção de um modelo celular para futuros estudos funcionais dos genes identificados como diferencialmente expressos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material biológico

3.1.1. Pâncreas

Os pâncreas humanos normais utilizados no isolamento de ilhotas foram captados através de sistema de rodízio já estabelecido e coordenado pela Central de Transplante de São Paulo. A remoção dos pâncreas foi realizada pelos cirurgiões (Dr. Tércio Genzini e Dr. Marcelo Perosa de Miranda) a partir de doadores cadáveres, após consentimento prévio, livre e informado da família.

3.1.2. Insulinomas

As amostras dos adenomas de células β pancreáticas foram obtidas durante a ablação cirúrgica de pacientes internados, sob a supervisão da Equipe Médica de Diabetes do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da FMUSP (Dr. Daniel Giannella Neto), tendo sido gentilmente fornecidos pelo Serviço de vias biliares e pâncreas da Segunda Clínica Cirúrgica do Hospital das Clínicas da FMUSP (Prof. Dr. Marcel C. C. Machado).

A tabela 1 mostra os dados clínicos, bioquímicos e histopatológicos dos pacientes com insulinoma.

3.1.3. Linhagens Celulares

As linhagens humanas utilizadas neste trabalho foram: A172, glioblastoma não invasivo; T98G, glioblastoma invasivo; NCI-H23, adenocarcinoma de pulmão; TT, carcinoma de tireóide; LNCaP clone FGC, carcinoma de próstata; HepG2, hepatocarcinoma; ZR75-1, carcinoma ductal; SKmel 25, melanoma; HeLa, adenocarcinoma de cérvix; Hs1-TES, testículo normal; Hs732-PL, placenta normal, U937, linfoma histiocítico e IM9, linhagem linfóide.

Tabela 1- Dados clínicos, bioquímicos e histopatológicos dos pacientes com insulínoma.

PACIENTES	CLÍNICO	BIOQUÍMICOS					HISTOPATOLÓGICOS										
		TPD (meses)	GLI (mg/dl)	INS (Uui/ml)	PC (ng/ml)	I/G	IMH (TNE)			IMH (ESP)				TT (cm)	CH	M	
IP																	
GLS	1		54	14	9,8	0,26	+++	+++	++	-	NA	NA	NA	2,0	NA	Não	
MMA	36		52	87	4,9	1,67	+++	+++	+++	NA	-	NA	NA	0,7	NA	Não	
AS	24		29	64	9,8	2,2	+++	+++	++	NA	-	+FOCAL	NA	5,0	NA	Não	
GVHK	24		31				NA	NA	NA		NA			1,5		Não	
GFV	4		39	28	NA	0,61	+	NA	-	NA	NA	-	NA	1,5	NA	Não	
AA	168		55	23	1,7	0,42	+	+++	+	NA	-	-	NA	1,5	NA	Sim	
AQS	12		20	51	NA	2,55	+++	+++	+++	NA	-	-	-	1,5	NA	Não	
JASD	12		28	13	2,6	0,45	+++	+++	+++	-	-	-	-	1,0	II	Não	
ASDP	60		47	13	4,3	0,28	+++	+++	+++	NA	-	-	-	2,0	II	Não	
LLM	24		35	17	2,9	0,49	+	NA	+	NA	-	NA	NA	1,0	I	Não	
IAP	48		34	13	3,3	0,39	+++	+++	+++	NA	-	-	NA	0,8	NA	Não	
JPS	24		21	56	9,8	2,67	+	+	+	+	-	-	NA	1,7	I	Não	
CAPC	6		30	47	NA	1,57	+++	NA	+++	NA	NA	-	NA	0,6	NA	Não	
LNA	12		26	22	NA	0,58	NA	NA	+++	NA	+	-	-	1,4	NA	Não	
RLG	18		33	98	6,4	2,97	NA	NA		NA	NA	NA	NA	0,7	NA	Não	
TLI	6		59	155	7,4	2,63	+++	+++	+	-	+++	NA	NA	2,0	NA	Não	

IP, iniciais dos pacientes; TPD, tempo presumido de doença; GLI, glicemia; INS, insulina; PC, peptídeo-C; I/G, relação INS/GLI; IMH TNE, imunohistoquímica para tumor neuroendócrino; IMH ESP, imunohistoquímica específica; CRO, cromogranina A; SIN, sinaptofisina; GAS, gastrina; GLU, glucagons; SOM, somatostatina; PP, polipeptídeo pancreático; TT, tamanho do tumor; CH, classificação histológica (grau I,II ou III); M, metástase; NA, não analisado.

3.2. Soluções

Todas as soluções utilizadas foram feitas a partir de reagentes de grau de pureza para análise, seguindo formulações descritas em manuais de laboratório (Ausubel et al., 1999, Sambrook et al., 1989).

3.3. Isolamento e purificação de ilhotas pancreáticas normais

As técnicas de isolamento e purificação de ilhotas pancreáticas humanas foram realizadas de acordo com as técnicas, utilizadas no Clinical Islet Isolation Laboratory da Universidade de Edmonton, Canadá (Shapiro et al., 2000), adaptadas em nosso laboratório.

Após sua retirada, o pâncreas foi mantido em solução gelada e estéril UW (University of Wisconsin-Transplant Technology Inc.) até o momento do processamento.

Primeiramente, o pâncreas foi distendido em uma câmara de distensão utilizando a solução da enzima Liberase (ROCHE) (0,5 mg/ml), através de cateteres localizados no ducto de Wirsung direcionados para a cabeça e cauda do órgão. Os cateteres foram, então, removidos e o pâncreas foi dividido em oito partes, que foram, posteriormente, mergulhadas na solução de Liberase contida numa câmara sob agitação manual constante para completa dissociação do tecido. O material resultante da digestão foi coletado e lavado várias vezes em meio MEM (Cultilab). Ao final da etapa de lavagem, a suspensão de células foi submetida a um gradiente contínuo de Ficoll (Biochrom AG), tendo como maior densidade 1,100 e a menor 1,077, em um processador de células (COBE 2991 – Gambro do Brasil Ltda.) para a purificação das ilhotas. Após a centrifugação no COBE, as frações foram coletadas, diluídas em meio de cultura (M199 contendo 0,5% de soro) e centrifugadas por 1 minuto a 450 rcf a 4^o C, depois foram submetidas a mais duas lavagens por 1 minuto a 350 e 245 rcf

respectivamente, para remoção do Ficoll. Os sedimentos, foram ressuspensos em meio CMRL 1066 (Mediatech-Cellgro) acrescido de 10% de soro fetal bovino. Posteriormente, foram coletadas amostras de cada sedimento, as quais foram coradas com difeniltiocarbazona (Ditizona: Sigma Chemical Co.), um corante específico para zinco que se encontra complexado a insulina, para avaliação da pureza e do número de ilhotas pancreáticas. As frações foram distribuídas em frascos de cultura e cultivadas em meio CMRL 10% suplementado com Soro Fetal Bovino (Cultilab) a 37°C em atmosfera úmida de 2,5% de CO₂.

3.4. Extração de RNA e preparo dos cDNAs

O RNA total foi extraído a partir de ilhotas pancreáticas normais e de amostras de carcinomas neuroendócrinos de células beta pancreáticas, pelo método do isotiocianato de guanidina, descrito por (Chirgwin et al., 1979). Este método emprega lise celular com isotiocianato de guanidina e purificação por ultracentrifugação do RNA em colchão de cloreto de cério.

As amostras de ilhotas e dos tumores de células β foram lisadas com solução de isotiocianato de guanidina 4M, citrato de sódio 25mM e β -mercaptoetanol 0,1M. Os lisados foram transferidos para tubos de polialômero contendo solução de cloreto de cério 5,7M e acetato de sódio 25mM (pH 5,0) e centrifugados a 130.000 rcf por 17h a 20°C. O RNA, sedimentado no fundo dos tubos, foi ressuspensão em água bidestilada estéril ou em água estéril tratada com DEPC (Dietilpirocarbonato) (Sigma Chemical Co.). A concentração do RNA na amostra foi determinada pela absorbância das preparações a 260nm, utilizando, como valor padrão, 1 ABS 260nm = 40 μ g/ml de RNA e o grau de pureza pela relação ABS 260/280nm, que deve ser próxima a 2,0 para ácidos

nucléicos. A seguir, as amostras foram congeladas a -70°C até posterior utilização.

As amostras de RNA foram utilizadas para a realização de RT-PCR e PCR através do kit "Smart PCR cDNA Library Construction Kit" (Clontech). Este kit faz uso da atividade terminal transferase 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 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. Os cDNAs incompletos, os RNAs ribossômicos e o DNA genômico não são amplificados, pois não possuem sítios de anelamento para estes iniciadores, garantido a síntese de cDNAs completos de alta qualidade.

3.5. Isolamento de genes diferencialmente expressos

3.5.1. Construção de bibliotecas de cDNA subtraídas de acordo com o protocolo de RDA ("Representational Difference Analysis")

A construção da biblioteca de subtração foi feita seguindo o protocolo descrito por Hubank & Schatz, 1999 (figura 5). Entretanto, as etapas de purificação com fenol-clorofórmio foram substituídas por purificação em colunas GFX (GE Healthcare).

Resumidamente, os cDNAs dos insulinomas e de ilhotas pancreáticas normais foram digeridos com a endonuclease de

restrição MboI, que reconhece uma sequência de 4 nucleotídeos, com a finalidade de reduzir a complexidade das sequências. A próxima etapa foi a ligação coesiva dos fragmentos gerados a adaptadores de DNA não fosforilados. Os fragmentos foram amplificados por PCR na fase exponencial da reação, para evitar artefatos e distorções na abundância relativa de cada transcrito. Esta amplificação visou gerar uma grande massa de fragmentos. Após a remoção dos adaptadores pela digestão com MboI, uma parte dos cDNAs foi reservada para ser usada como *driver* e outra parte ligada a novos adaptadores semelhantes aos primeiros, constituindo as amostras *tester*. Como as extremidades dos adaptadores não estavam fosforiladas, apenas uma das fitas de cada adaptador foi ligada covalentemente ao grupamento 5'- fosfato dos fragmentos de cDNA. A outra fita foi perdida durante as etapas de desnaturação das amostras.

A seguir, as amostras *tester* correspondentes aos cDNAs dos insulinomas foram combinadas com amostras *driver* das ilhotas pancreáticas humanas normais, em uma relação 1:100, para a primeira hibridização *forward*. Para a primeira hibridização *reverse*, a amostra *tester* correspondeu ao cDNA das ilhotas pancreáticas normais. Os cDNAs foram desnaturados e completamente re-anelados lentamente a 67°C por 20 h. Os genes presentes igualmente nas duas populações de cDNAs, tendem a formar duplo-híbridos *tester-driver*, uma vez que o *driver* está presente em excesso. Enquanto isso, os genes que estão somente presentes na amostra *tester* só formam híbridos *tester-tester*. Na etapa seguinte, os adaptadores foram preenchidos com Taq DNA polimerase, completando-os apenas nas duas fitas dos híbridos *tester-tester*. As amostras do cDNA foram então submetidas à reações de PCR com iniciadores para os adaptadores. Como o sítio do iniciador foi criado somente nas extremidades das fitas dos híbridos *tester-tester*, apenas estes foram amplificados,

favorecendo a amplificação de genes presentes somente nas amostra "tester". O produto desta PCR, que foi denominado DPI (*Differential Product I*), já possui enriquecimento para genes diferencialmente expressos. Este produto foi digerido e ligado a novos adaptadores, semelhantes aos primeiros. Foi repetido um novo ciclo de hibridização, usando-se a relação *tester:driver* 1:800, gerando, assim, o segundo produto diferencial, denominado DPII. Este produto foi clonado, transformado em bactérias e os clones de cDNAs obtidos foram seqüenciados.

Figura 5 – Representação esquemática do procedimento de RDA ("Representational Difference Analysis").

3.5.2. Caracterização dos produtos subtraídos

3.5.2.1. Preparo dos microarranjos de DNA com 1536 clones de cDNA

As bactérias crescidas após a transformação foram repicadas (~1µl) em placas de 96 poços contendo 14 µl da mistura de reação: 1275 µl de água Milli-Q, 150 µl do tampão NH₄ 10x, 45 µl de MgCl₂ 50 mM, 19 µl de dNTP (10mM) (Invitrogen), 2,52 µl dos *primers* Lud F e 2R (100 µM) e 5 µl da enzima Taq 5U/µl (Fermentas) para cada 100 reações. As reações foram incubadas no termociclador 9600 Perkin Elmer a 95°C por 4 min para lisar as bactérias e, em seguida, submetidas à 40 ciclos do programa: 95°C por 45 seg, 57°C por 45 seg e 72°C por 2 min. Finalmente, as reações foram incubadas à temperatura de 72°C para extensão final por 5 min. A amplificação foi confirmada em gel de agarose 1% em tampão TAE 1x.

O produto deste PCR foi aplicado em membranas de nylon Hybond-XL (GE Healthcare) através do sistema manual "ExpresionTM DNA Arraying System" (Bioinformática). Posteriormente, a membrana foi incubada em uma solução de NaOH 0,6N por 10 min para desnaturar as amostras e em uma solução de Tris-HCl 0,5 M, pH 7,5 por 5 min para a neutralização. O cDNA foi, então, fixado na membrana em forno mantido a 80°C por 2 horas.

3.5.2.2. Marcação das sondas radioativas

Para a marcação radioativa das sondas, utilizou-se o Kit "Ready-to-go DNA labelling beads (-dCTP)" (GE Healthcare), através da reação de "random primer extension" (Feinberg & Vogelstein, 1984).

Neste kit, aproximadamente 45 µl de solução contendo 50 ng do cDNA a ser marcado é desnaturado e utilizado para ressuspender “beads” contendo todos os componentes necessários para a reação de marcação, como os nucleotídeos (com exceção do dCTP [α^{32}] – GE Healthcare, que é adicionado em seguida), *random primers*, enzima Klenow (Fermentas) e tampão. Durante a incubação a 37°C, os *primers* anelam em sítios randômicos no DNA, permitindo que a Klenow sintetize as fitas complementares, incorporando nucleotídeo marcado durante o processo. As sondas foram, então, purificadas em colunas “Microspin” S-300 (GE Healthcare).

3.5.2.3. Hibridização das membranas

As membranas foram pré-hibridizadas com uma solução de SSPE 5x, formamida 50%, SDS 1x, Denhardt 5x e DNA de esperma de salmão desnaturado 100 µg/ml, durante 1 hora a 42°C. Posteriormente, as membranas foram hibridizadas utilizando a mesma solução de pré-hibridização acrescida da sonda marcada radiativamente durante aproximadamente 16 horas à 42°C.

As membranas foram, então, lavadas duas vezes sob agitação com a solução de SSC 2x e SDS 0,1% por 15 min cada, e, posteriormente, foram submetidas à 4 lavagens de 30 min cada à 56°C com a solução de SSC 0,1x e SDS 0,1%. Estas membranas foram expostas por aproximadamente 24 h a telas do PhosphorImager (Storm).

3.5.2.4. Sequenciamento

Para o sequenciamento, foi utilizado o kit BigDye Terminator v3.1 sequencing kit (Applied Biosystems), conforme protocolo do fabricante. O seqüenciador utilizado foi o ABI 3700.

3.5.3. CodeLink “bioarrays”

A plataforma *CodeLink UniSet Human II Bioarrays*, é constituída por 20.000 oligonucleotídeos derivados de genes humanos depositados no GenBank, RefSeq e UniGene até o final do ano de 2002. Cada oligonucleotídeo possui 20 bases, tendo sido desenhado de forma a ser específico para o gene analisado.

3.5.3.1. Purificação do RNA

Seguindo as recomendações do fabricante dos *Bioarrays* (GE Healthcare), os RNAs de ilhotas pancreáticas humanas normais e dos insulinomas foram novamente purificados através do Kit RNeasy (Qiagen). O Kit se baseia em uma membrana de sílica-gel que, mediante alta concentração de sal, promove a ligação de moléculas de RNA maiores que 200bp. Uma vez estando o RNA ligado à membrana, basta uma eluição em H₂O-MilliQ para que este seja recuperado.

3.5.3.2. Síntese do cDNA

Para a síntese da primeira fita do cDNA, foi adicionado à reação diferentes concentrações de mRNAs de genes bacterianos (concentração final de 1:2.000.00 dos genes *araB* e *entF*, 1:600.000 dos genes *fixB* e *gnD* e 1:200.000 dos genes *hisB* e *leuB*) que funcionaram como controles da marcação das sondas, hibridização das lâminas e sensibilidade do experimento. Para cada sonda foi montada uma reação contendo 2µg de RNA total, 2µl do mRNA de controle (bacteriano), 1µl de T7oligo(dT) primer (5mM) e H₂O-MilliQ para um volume final de 12µl. As amostras foram incubadas a 70°C por 10 min para desnaturar possíveis estruturas secundárias dos RNAs e, logo em seguida, submetidas ao gelo. Adicionou-se, então, 2µl do tampão de primeira fita, 4µl de dNTP (5mM), 1µl de inibidor de Rnase e 1µl de transcriptase reversa e as amostras foram incubadas a 42°C por 2 horas.

Para a síntese da segunda fita, foi adicionado à reação: 63µl de H₂O-MilliQ, 10µl de tampão para segunda fita (10x), 4µl de um mix de dNTPs (5mM), 2µl do “mix” de DNA polimerase e 1µl de RNaseH. O tubo foi gentilmente agitado e então incubado por 2 h a 16°C.

3.5.3.3. Purificação do cDNA dupla-fita

Para a purificação do cDNA dupla-fita, foi utilizado o kit QIAquick Spin (Qiagen), que assim como o kit RNeasy (descrito anteriormente), baseia-se em uma membrana de sílica-gel que se liga ao DNA em alta concentração de sal.

3.5.3.4. Síntese do cRNA

As amostras do item anterior foram ressuspensas em 13,5µl de uma solução contendo 9,5µl de H₂O-MilliQ e 4,0µl de tampão de reação T7. Em seguida, adicionou-se, a cada amostra, 4µl de solução T7 ATP, 4µl de T7 GTP, 4µl de T7 CTP, 4µl de T7 UTP, 7,5µl de biotina-11-UTP (10mM) e 4µl de mix da enzima T7 (10x). Para a síntese pela enzima T7, a amostra foi incubada por 14h a 37°C.

3.5.3.5. Fragmentação do cRNA

Para a fragmentação do cRNA, 10µg de cRNA de cada amostra, preparados no item anterior, foram ajustados para um volume de 10µl através da adição de H₂O-MilliQ. Adicionou-se, então, 5µl do tampão de fragmentação 5x (fornecido pelo fabricante do CodeLink) e as amostras foram incubadas em um termociclador por 20 min a 94°C e, em seguida, 5 min a 0°C.

3.5.3.6. Hibridização

Para cada bioarray preparou-se 260µl de uma solução de hibridização contendo 78µl do componente do tampão A (fornecido

pelo fabricante), 130µl do componente do tampão B (fornecido pelo fabricante) e 27µl de H₂O-MilliQ, ao qual foi adicionado 25µl do cRNA fragmentado. As soluções foram agitadas por 5 seg e então incubadas a 90°C por 5 min para desnaturação do cRNA. Em cada bioarray, foram aplicados 250µl da solução de hibridização e as câmeras de hibridização foram então seladas com adesivos próprios. Os *bioarrays* foram incubados, sob agitação, por cerca de 20 h, a 37°C e 300rpm.

3.5.3.7. Lavagem e marcação com Cy5-Estreptavidina

Após a hibridização, o adesivo que selava a câmara de hibridização, foi removido e o bioarray colocado em um reservatório contendo uma solução de TNT 0,75x à temperatura ambiente. Posteriormente, foi transferido para um recipiente contendo solução de TNT 0,75x a 46°C, onde foi mantido por exatamente 1 h.

O bioarray foi removido da solução de TNT 0,75x e colocado em um outro reservatório contendo uma solução de Cy5-Estreptavidina. Para evitar a degradação do fluoróforo, o reservatório foi protegido da luz e os *bioarrays* foram mantidos nesta solução por 30 min. Em seguida, o bioarray foi colocado em um novo reservatório, contendo o tampão TNT 1x, onde foi mantido por 5 min, também protegido da luz. Esse procedimento foi realizado mais 3 vezes, sempre utilizando uma nova solução de TNT 1x a cada lavagem.

Terminada a quarta lavagem, o bioarray foi colocado em um reservatório contendo uma solução 0,05% Tween 20, e agitado com movimentos para cima e para baixo por 5 vezes. Por fim, os *bioarrays* foram secos através de uma centrifugação a 644g por 3 min. Os *bioarrays* foram, então, armazenados em um recipiente apropriado, protegidos da luz até que fossem escaneados.

3.5.3.8. Aquisição e análise dos dados

Os *bioarrays* foram escaneados pelo escâner Axon GenePix (Axon Instrument) e os dados relativos às intensidades de fluorescência emitida pelos *spots* foram coletados pelo programa GenePix Pro (Axon Instruments). Após a coleta dos dados, o programa invalidou automaticamente os dados referentes aos *spots* que haviam apresentado alguma irregularidade durante a confecção do bioarray e o programa *CodeLink System Software* normalizou os dados em relação à mediana e conferiu se os controles positivos e negativos apresentaram o sinal esperado.

3.6. Confirmação da expressão diferencial dos genes

3.6.1. “Primers”

Os *primers* gene-específicos foram gerados, utilizando-se o programa Primer 3.0 (disponibilizado pelo Whitehead/MIT center for Genome Research, Cambridge, MA, localizado no site frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). As seqüências dos *primers* estão organizadas na tabela abaixo:

Tabela 2. Sequências de “primers” “forward” e “reverse” referentes aos genes isolados pela técnica de RDA.

GENES	<i>Primers Forward</i>	<i>Primers Reverse</i>
FLJ13072	GAAAATGCAGGGAGGACAAC	ATACACTGCGGAAGACATCCAT
KIAA1075	AGTTGAGCCCCGAAGGAGAT	TCCTACTCTGAATCTCTGCT
KRT 18	CCTGCTGAACATCAAGGTCAA	CTGGCTTAATGCCTCAGAACTT
PACSIN2	AGGTGCTGCAGCCAGAGTTA	CCGTAGCACAGAAATGAGGATT
FLJ12914	GCCCCTGCTTAAATATCACAA	GGGACTACCACCTTCACAGTT
SERPINA3	GAGTCAAAATCACCCCTCCTTT	ACCTTCCAAGGATAAGCAGACA
HMGIC	CTGTTGTTGGTCGCAGCTAA	GGGATCACAGAGGCTGTTATGT
FLJ39164	CTGGGGTGTGTAGACAGACAGA	GCTGACCACACGTAAGTGTCTAT
DKFZP762	ACAGCCAAGAGGACCAGAGA	CTTCAAGTCAGGCCATCCAT
HTCF4	TGGCTTTTCTTCCTCCTTCA	CCCTTAAAGAGCCTCCATC
PPP1CB	AAGGCTGGGGAGAAAATGAT	CTGTTTCGAGGTGGAGTGACA
FBOX2	CACGATGAGAGCGTCAAGAA	CCCATAGTCGGTGAAGGTGT
PP1131	CGACTACCTGTGTGGCAAGA	CAGTCCAGAGTCCAACAGCA
FLJ14932	ATCAAGCTGCAGCCAAAAGT	CCAAGTTCCCTTTGAGACCA
EF1D	TTTGGCAGTGACAATGAGGA	TCCTCCTCCAGCAAGTCTGT
KIAA0927	GCCTCAGCCAAATTCATGTT	ACCTTTCAGAAGCTGGCAAA
FLJ10073	AAGTTGTCCAGGTTCTTGCTGT	AAGTTGTCCAGGTTCTTGCTGT

3.6.2. RT-PCR semi-quantitativo

Para a reação de transcrição reversa, 1µg de cada amostra de RNA foi incubado em uma reação contendo 4 µl do tampão *first strand* 5x (Tris-HCl 250 mM pH 8,3, KCl 375Mm, MgCl₂ 15mM), 40U de RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 U/µl) por 10 min a 37°C. Adicionou-se, então, 1 µl de oligo-dT (500 µg/ml) (Invitrogen) e incubou-se a 70°C por 2 min. Finalmente, foi acrescentado a esta reação um mix contendo: 2µl de dNTP (10 mM), 1 µl do tampão First strand 5x, 1µl de DTT (100 Mm), 200U de

SuperScript II (200U/ul) (Invitrogen) e 40U de RNaseOUT (Invitrogen) e incubado a 42^oC por 2 h. Para a remoção do RNA complementar ao cDNA, foi adicionado 1 µl de RNase H (Invitrogen) de *E. coli* e incubou-se a 37^oC por 30 min.

Para a reação de PCR, foi preparado um “mix” para cada amostra contendo tampão de PCR NH4 1x, dNTP 0,2 mM, MgCl₂ 1,5 mM, 1µl do cDNA, e Taq polimerase 0,5 U/10 µl (Fermentas). O mix foi dividido em tubos separados contendo *primers* específicos para cada cDNA. As condições de PCR foram: 95^oC por 1 minuto, 95^oC por 30 seg, 55^oC por 30 seg, 72^oC por 1 minuto e 72^oC por 6 min para extensão final e para o controle interno (GAPDH) foram 94^oC por 1 minuto, 94^oC por 30 seg, 65^oC por 30 seg, 68^oC por 1 minuto e 72^oC por 5 min. O número de ciclos de cada par de *primers* foi escolhido dentro da fase exponencial. Um total de 23 ciclos foi usado para o GAPDH, 32 ciclos para os genes HTCF-4, EIDF1D, PPP1CB, KIAA0927; 35 ciclos para FLJ13072, FLJ12914, FLJ14932, Krt 18, PACSIN2 e PP1131; 40 ciclos para SerpinA3, FBOX2, DKFZP762P211 e 45 ciclos para KIAA1075, FLJ10073 e FLJ39164.

3.6.3. Real-Time PCR

Nos experimentos de Real-Time PCR, utilizou-se os mesmos cDNAs sintetizados para os experimentos de RT-PCR. As reações de amplificação e quantificação dos produtos formados foram realizadas no termociclador ABI 5700 (Roche) do Departamento de Bioquímica (IQ-USP).

3.6.3.1. Padronização dos “primers”

Os *primers* utilizados foram desenhados com o auxílio do programa PrimerExpress (Applied Biosystems), que os desenha com as características necessárias para os experimentos de Real-Time PCR no termociclador ABI 5700. As principais características destes oligos são: amplificar fragmentos cujo tamanho máximo não exceda

100bp, possuir quantidade moderada de CG (40-60%), não possuir a capacidade de anelamento entre si e/ou formação de estrutura secundária, permitir temperatura de anelamento entre 58°C e 60°C de acordo com o algoritmo *nearest neighbor* (Breslauer et al., 1986), sendo selecionados *primers* que se anelassem em exons diferentes para evitar uma eventual amplificação de DNA genômico.

Tabela 3. Sequências de “primers” “forward” e “reverse” referentes aos genes diferencialmente expressos em insulinomas benignos identificados pela plataforma de “bioarrays” CodeLink.

GENES	<i>Primers Forward</i>	<i>Primers Reverse</i>
HPRT	GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA	TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT
SPARCL1	GAAACGTCAAGTGAAGGCAACAT	TTTCCCTGTTGGTCTGCCCTTA
PRSS11	GCAGGAAGATCCCAACAGTTTG	CGGAAGCTTGCGAAACAATT
STAT4	GAGGGCTGTACATGGTGACT	GGCAATGAGCTGGTCTCCAA
ECRG4	TTTGACGAAGCGAAATTTGAAG	TCATCATAGTGACGTTGGTAGTAATCG
ASCL1	AGCAGGAGCTTCTCGACTTCA	AGATGCAGGTTGTGCGATCA
IGFALS	AGGTGCTCACGCTAGACCACAA	CGGAGACAGTTCCCAGAGAGGTT

3.6.3.2. Confirmação da expressão diferencial

Todas as reações de Real-Time PCR foram realizadas em duplicatas, sendo utilizados 3µl dos cDNAs sintetizados anteriormente, 3µl do mix de *primers* na concentração definida no item anterior e 6µl do SYBER Green Dye (ABI). O aparelho ABI 5700 trabalha com placas de 96 wells, e para todas as reações foi utilizado o programa de 1 ciclo de 10 min a 95°C e 40 ciclos de 30 seg a 95°C, 1 minuto a 60°C e 1 minuto a 72°C.

Na análise inicial dos dados, realizada através do programa ABI-Manager SDS, foi definido, manualmente, um “threshold” que estivesse na fase exponencial de amplificação do gene (Figura 6).

Conforme pode ser observado na figura 6, foi selecionado o *threshold*, e da intersecção deste com a curva de amplificação é obtido o Ct daquela amostra ("Threshold cycle", que é definido como o ciclo onde a fluorescência se encontra estatisticamente acima do *background*). Assim, temos que para um determinado *threshold*, quanto maior a concentração do cDNA correspondente ao transcrito, mais rapidamente a sua curva de amplificação irá atingir o "threshold" e menor será o seu Ct. Conseqüentemente, quanto menor a sua concentração, maior o seu Ct. Portanto, podemos dizer que a diferença de expressão de um gene, que está sendo analisado em diferentes amostras, pode ser dada pela diferença dos seus Cts frente a um "threshold" (Figura 7).

Figura 6: Saída gráfica do programa ABI-Manager SDS, que mostra a fluorescência detectada em função do número de ciclos. No exemplo mostrado, para um "threshold" de 0,3 é obtido um Ct de 19,6.

Figura 7: Gráfico da Fluorescência em função do número de ciclos. O Ct é dado pela intersecção do “threshold” com a curva de amplificação e o ΔCt pela diferença entre o Ct das duas curvas que estão sendo comparadas.

Quando se analisam duas ou mais amostras em um experimento de Real-Time PCR, tem-se frequentemente uma variação da concentração de cDNA entre elas, portanto, para que os dados possam ser comparados, é necessário que estes sejam previamente normalizados. Assim, para cada cDNA analisado, foram realizadas duas reações, sendo uma utilizando *primers* para o gene analisado e, a outra, utilizando *primers* para um controle interno.

De posse dos Cts, foi calculada, inicialmente, a média dos Cts das duplicatas (fórmula 1) e o seu desvio padrão (fórmula 2). Como a expressão do gene foi analisada em relação a um controle interno, calculou-se, então, a diferença entre a Média dos Cts da amostra ($M_{amostra}$) e a Média dos Cts do controle ($M_{controle}$). Essa diferença foi definida como ΔCt (fórmula 3). Propagando a incerteza, temos que o desvio dessa diferença foi calculado segundo a fórmula 4.

Em seguida, foi calculado o $\Delta\Delta Ct$ que consiste na diferença do ΔCt de cada amostra em relação ao ΔCt de uma amostra que é

tomada como referência, dadas as diferentes amostras analisadas para um determinado *primer*.

Como, em uma reação de PCR, a quantidade de produto formado é duplicada a cada ciclo, os $\Delta\Delta Ct$ encontrados indicam diferenças entre ciclos e não refletem diretamente a diferença de produto entre as amostras, visto que uma diferença $\Delta\Delta Ct=1$ ciclo, por exemplo, indica que a quantidade de produto entre estas amostras é de duas vezes, e não uma vez. Assim, partindo do princípio de que a cada ciclo a quantidade de produto é dobrada, para calcularmos a diferença de produto entre as amostras ("ratio") é necessário que o ganho de cada ciclo (2 vezes) seja elevado à potência do inverso de $\Delta\Delta Ct$, ou seja, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (fórmula 6) (Pfaffl, 2001).

A partir desses cálculos, foi possível analisar a diferença de formação do produto do PCR, que está diretamente ligado à expressão do gene entre as amostras analisadas.

$$\begin{aligned}(1) \quad M(\text{média}) &= \frac{Ct + Ct'}{2} \\(2) \quad \sigma(\text{desvio}) &= \sqrt{\frac{2(Ct^2 + Ct'^2) - (Ct + Ct')^2}{4}} \\(3) \quad \Delta Ct &= M_{\text{amostra}} - M_{\text{controle}} \\(4) \quad \sigma_{\text{final}} &= \sqrt{\sigma_{\text{amostra}}^2 + \sigma_{\text{controle}}^2} \\(5) \quad \Delta\Delta Ct &= \Delta Ct_{\text{amostra}} - \Delta Ct_{\text{amostra de referência}} \\(6) \quad \text{ratio}_{\text{relativo a amostra de referência}} &= 2^{-\Delta\Delta Ct}\end{aligned}$$

Fórmulas: Fórmulas utilizadas para análise dos dados do Real-time. As fórmulas dos desvios e da média (1, 2 e 4) já estão adaptadas para um espaço amostral $n=2$ e, em todas as amostras, Ct e Ct' são relativos ao Ct encontrado para uma determinada amostra e sua duplicata.

3.6.3.3. Análise Estatística

A análise estatística dos resultados de comparação quanto ao nível de expressão dos genes estudados entre as amostras de insulinomas e ilhotas normais foi realizada com o programa *MiniTab Release 14 Statistical Software*, através do teste T com variâncias desiguais desconhecidas.

3.7. Estabelecimento da linhagem celular de insulinoma humano

3.7.1. Insulinoma

Uma amostra de tecido tumoral proveniente de um insulinoma (GLS) medindo 2 x 1,5 cm, de um paciente de 54 anos do sexo masculino apresentando hiperinsulinemia. O tumor foi removido cirurgicamente da região da cauda do pâncreas. Segundo análise anátomo-patológica, o diagnóstico foi de uma neoplasia neuroendócrina de pâncreas de baixo grau de malignidade, margens cirúrgicas livres, ausência de metástases para linfonodos e presença de microadenomas múltiplos no parênquima pancreático. A análise imunohistoquímica revelou marcação positiva para enolase, cromogranina A, sinaptofisina (marcadores de diferenciação endócrina) e insulina; e negativa para glucagon e gastrina, indicando ser um insulinoma.

3.7.2. Cultura primária

Para a cultura primária, os fragmentos de insulinomas foram lavados em tampão fosfato (PBSA) e dissociados com o auxílio de uma tesoura. Posteriormente, o material foi transferido para um tubo Falcon de 15 ml e desmembrado mecanicamente com pipeta Pasteur de ponta grossa. Após decantação dos fragmentos maiores, o sobrenadante foi centrifugado a 1.000 rpm por 5 min e o

precipitado formado foi plaqueado em uma garrafa para cultura de 25 cm² em meio CMRL 10% de soro fetal bovino (Sobrenadante 1).

O precipitado oriundo da decantação foi ressuspenso em uma solução de Liberase (0,5 mg/ml), incubado a 37°C por 10 min e novamente desmembrado com uma pipeta Pasteur. Após nova decantação, o sobrenadante foi centrifugado e plaqueado como descrito acima (Sobrenadante 2).

O procedimento de incubação enzimática foi repetido no precipitado da segunda decantação por 30 min e o sobrenadante foi novamente centrifugado e plaqueado (Sobrenadante 3) em meio CMRL suplementado com 10% SFB.

As culturas foram mantidas em CMRL 1066 com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino). O meio de cultura utilizado foi suplementado com 1,2 g/L de Bicarbonato de Sódio, 25 mg/L de Ampicilina e 100 mg/L de Estreptomicina. O pH e a temperatura foram mantidos na faixa fisiológica através da incubação em estufa com atmosfera de 2% de CO₂ e a 37°C. Estoques celulares foram congelados em meio contendo 20% de SFB e 10% de DMSO (dimetilsulfóxido) (MERCK) mantidos a -190°C em reservatório contendo nitrogênio líquido. O meio de cultura foi renovado a cada três dias e a cultura foi subdividida quando as células atingiam 80 – 90% de confluência. As culturas foram repicadas semanalmente, por tripsinização, caracterizando uma “passagem”.

3.7.3. Teste de atividade funcional

Os insulinomas foram avaliados quanto à capacidade de secreção de insulina basal (sem estímulo com glicose) ou após estímulo com glicose. A cultura do insulinoma GLS na quinta passagem foi centrifugada (10 min. a 1.500 rpm) e ressuspensa em meio CMRL contendo 0,1% de soro fetal bovino e 5,6 mM de glicose. Esta suspensão foi distribuída em placas de 24 poços (1x10⁵ células) e incubada em meio contendo 2,8 mM ou 20 mM de

glicose e o sobrenadante recolhido para dosagem de insulina pela técnica de eletroquimioluminescência (Elecsys, Roche) na Central de Radioimunoensaio de São Paulo (CRIESP).

3.7.4. Imunofluorescência

As células foram cultivadas sobre lamínulas e, posteriormente, fixadas e permeabilizadas com metanol gelado por 10 min a -20°C , seguido por 3 lavagens com PBSA gelado. Em seguida, as células foram incubadas por 1 h à temperatura ambiente em solução de bloqueio (BSA 2% em PBSA). Após incubação de 1 hora a 37°C com o anticorpo primário, as células foram lavadas 4 vezes com PBSA e incubadas por 1 hora a 37°C com o anticorpo secundário, e então lavadas (4 vezes) com PBSA. As lamínulas foram montadas com o meio de montagem VECTASHIELD (Vector Laboratories) ou p-fenilenodiamina (Sigma). Utilizou-se o anticorpo monoclonal anti-insulina humana (ICN Laboratories) e o anticorpo secundário anti-mouse conjugado com Texas Red (Molecular Probes).

3.7.5. Crescimento em suspensão de agarose

Alíquotas contendo 10^4 e 10^3 células das culturas dos insulinomas foram distribuídas em placas de 24 poços recobertas por agarose 0,6% em DME (Gibco BRL) suplementado com 10% de soro fetal bovino. Posteriormente, as células foram recobertas por agarose 0,3% em DME-SFB. Após completa gelificação, a placa foi incubada em câmara úmida, 2% CO_2/ar e 37°C . A cada 3 dias foi trocado o meio de cultura e observado ao microscópio o surgimento de colônias celulares.

3.7.6. Ensaio de tumorigênese

Foram injetados, subcutaneamente, 1.10^6 células do insulinoma GLS diluídas em PBSA na região dorsal de 4 camundongos imunodeprimidos do tipo *nude* (como controle, foi

injetado solução salina em 1 camundongo). O crescimento dos tumores foi analisado a cada 3 dias, com o auxílio de um paquímetro. A glicemia dos camundongos foi analisada através de reflectometria (Aparelho Precision Plus Electrodes da MediSense) em amostras de sangue retiradas da cauda dos camundongos.

3.7.7. Imunohistoquímica

O tumor e órgãos, como baço, pulmão e fígado, foram retirados dos camundongos para análise imunohistoquímica.

Para a realização da imunohistoquímica, foram realizados cortes de 3µm de blocos de parafina. Antes da realização da técnica de imunohistoquímica, as lâminas foram colocadas em estufa a 60°C por 30 min, para iniciar o processo de desparafinização. Após este período, passaram em três banhos de xilol, cada um com duração de nove min. Em seguida, o xilol foi substituído por concentrações decrescentes de etanol, etanol absoluto por cinco min (2 vezes) e etanol 96%, por três min (2 vezes). Finalizado este processo, as lâminas foram lavadas em água destilada e imersas em solução salina Tris-tamponada (TBS).

Após a desparafinização, as lâminas foram submetidas à técnica do microondas, utilizada para aumentar a exposição antigênica, uma vez que durante o processo de parafinização pode ocorrer o "mascaramento" de antígenos no tecido, dificultando sua detecção. Para tanto, as lâminas foram imersas em tampão citrato (2,1g de ácido cítrico mono hidratado - Merck - dissolvidos em água destilada para 1000 mL, pH 6,0) e levadas ao forno microondas (Sanyo) com potência de 2.400 watts durante 15 min. As lâminas foram então resfriadas em água corrente e lavadas em água destilada para a retirada do tampão citrato, permanecendo posteriormente em TBS.

As lâminas de tecidos incluídos em parafina foram submetidas à imunohistoquímica através de método da

estreptavidina-biotina /fosfatase alcalina (Noronha et al., 1993). Este método consiste, inicialmente, no bloqueio de avidina e biotina endógenas por 15 min e, posteriormente, no bloqueio antigênico inespecífico com soro não imune de cavalo (Vector), por 30 min. Após os bloqueios, os cortes foram incubados com o anticorpo primário monoclonal anti-insulina humana (1:20) (Zymed) e o anticorpo primário policlonal anti-glucagon humano (1:50) (Zymed). Todas as incubações foram realizadas durante uma noite a 4°C, em câmara úmida. No dia seguinte, as lâminas foram incubadas com anticorpos secundários biotinilados anti-camundongo (Vector) e anti-coelho (Vector), respectivamente, por 45 min. Após este período, os cortes foram incubados com o complexo estreptavidina-biotina-fosfatase alcalina (Dako) por 30 min.

Para revelação da reação, os cortes foram incubados com uma solução composta por naftol AS-MX-fosfato (Sigma) diluído em dimetilformamida (Merck), acrescida de solução tris 0,1 M (Merck), levamisol 1 M (Sigma) e corante *fast red* (Dako). O levamisol foi usado para bloquear a fosfatase alcalina endógena. A revelação foi acompanhada ao microscópio óptico e interrompida com TBS. Após a revelação, as lâminas foram contra-coradas com hemalumbre de Mayer (Merck), lavadas em água destilada e montadas com Glicergel (Dako), previamente aquecido.

O controle negativo do método foi realizado omitindo-se o anticorpo primário.

3.7.8. Estudo de proliferação celular

Para estudos de proliferação celular, 10^4 células/poço foram plaqueadas em placas de 24 poços e incubadas para aderir, em meio completo, por 24 horas. Após este período, as células foram pré-incubadas em meio de cultura suplementado com 0,1% de soro fetal bovino por mais 24 h. A incubação final de 48 h foi realizada em meio suplementado com 0,1% de soro fetal bovino e os fatores

de crescimento e hormônios testados, como o Fator de Crescimento Epidérmico (EGF), Fator de crescimento similar à insulina (IGF) e Prolactina. Após dois dias de estímulo, as células foram coletadas por tripsinização, fixadas em formaldeído 3,7% e posteriormente contadas em um contador de células eletrônico CELM CC-530. Todos os tratamentos foram feitos em triplicata.

4. RESULTADOS

4.1. Construção das bibliotecas subtraídas de cDNA

4.1.1. Geração das representações

Com o objetivo de isolar genes diferencialmente expressos em insulinomas humanos, quando comparados com amostras de ilhotas pancreáticas normais, inicialmente, foi utilizada a técnica de subtração baseada em PCR, denominada RDA ("Representational Difference Analysis").

Para tentar minimizar o número de genes que seriam particulares para um determinado paciente, foram utilizados, na subtração, cDNAs preparados a partir de "pools" de RNAs de 3 insulinomas (insulinomas CAPC, LNA e RLG) e de 2 preparações de ilhotas normais (Ilhota 1 e 2).

Observou-se na figura 8A uma diferença de intensidade de aproximadamente 2X entre as bandas referentes aos RNAs ribossomais 28S e 18S, demonstrando a boa qualidade dos RNAs. A partir destes RNAs foram obtidos transcritos de alto peso molecular (MboI-) (Figura 8B).

Para facilitar a amplificação, por PCR, dos diferentes segmentos de cDNA que representam genes diferencialmente expressos entre as duas populações, independente do seu tamanho, e preparar as moléculas de cDNA para a ligação dos adaptadores, os cDNAs foram submetidos à digestão completa com a endonuclease de restrição MboI, que reconhece uma sequência de 4 nucleotídeos, clivando o DNA em fragmentos de extremidades coesivas. Como pode ser observado na figura 8, o tamanho dos cDNAs foi reduzido de 400 pb-8Kb para 400pb-~2Kb.

Figura 8 - Fracionamento em gel de agarose dos RNAs e cDNAs das amostras de Ilhotas humanas (normal) e dos Insulinomas (tumoral).

A) Fracionamento em gel de agarose das amostras de RNA das preparações de Ilhotas 1 e 2 e dos Insulinomas CAPC, RLG e LNA.

B) Gel de agarose mostrando a qualidade dos cDNAs de ilhotas (Normal) e de insulinomas (Tumoral) sintetizados a partir do Kit Smart cDNA synthesis (Clontech); antes e após a digestão com MboI

Observou-se que a digestão com MboI para a geração de representações foi completa, causando um deslocamento do arraste de cDNA total.

PM- Padrão de pesos moleculares

4.1.2. Geração do primeiro e do segundo produto diferencial (DP1 e DP2)

A eficiência dos diversos ciclos de subtração pode ser estimada através da análise do perfil de fracionamento dos respectivos produtos em géis de agarose, onde se espera observar uma redução do arraste difuso, característico do cDNA de partida digerido. Concomitantemente, observa-se uma intensificação de um padrão bandeado definido, indicativo do enriquecimento progressivo de fragmentos correspondentes a transcritos diferencialmente expressos.

A figura 9 mostra uma comparação entre o fracionamento em gel de agarose do primeiro e do segundo produto diferencial (DP1 e DP2) das duas bibliotecas. Como pode ser observado, o segundo produto diferencial apresentou um padrão mais bandeado e menos complexo que o primeiro, provavelmente em função de uma eficiente subtração diferencial dos genes expressos. Também foi possível observar uma diferença no padrão de bandejamento entre as amostras *Forward* (F) e *Reverse* (R) do DP2, sugerindo o enriquecimento em genes diferencialmente expressos.

Figura 9 - Fracionamento em gel de agarose 2% dos produtos provenientes do primeiro (DP1) e do segundo (DP2) produto diferencial.

Canaletas F referem-se aos produtos do DP1 e DP2 da biblioteca *Forward* e canaletas R aos produtos da biblioteca *reverse*.

PM - Padrão de pesos moleculares

4.1.3. Rastreamento dos clones subtraídos da biblioteca *forward*

As ESTs geradas durante a subtração foram clonadas em um vetor de expressão em bactérias pBluescript II SK-, transformadas, por eletroporação, em *E. coli* DH10B e utilizadas para a realização de PCR de colônia (Figura 10).

Foram obtidos, aproximadamente, 400 clones de cada biblioteca, os quais foram amplificados por PCR e aplicados em membranas de nylon, utilizando-se o sistema manual "ExpreCISION™ DNA Arraying System" (BIOINFORMÁTICA). Para maior segurança, todos os clones originados a partir das bibliotecas foram aplicados em duplicatas.

As membranas foram hibridizadas com sondas dos cDNAs das ilhotas normais e dos insulinomas utilizados na preparação da biblioteca subtraída. Como demonstrado na figura 11, não foi observada uma grande diferença de intensidade de marcação entre as duas membranas.

Como resultado, foram escolhidos 48 clones da biblioteca *forward*, através da observação do pesquisador, que se mostraram um pouco mais expressos na membrana sondada com o cDNA de insulinoma.

Neste trabalho, não foi analisada a biblioteca reversa, isto é, os genes regulados na amostra de ilhotas pancreáticas normais. Como as ilhotas pancreáticas são formadas por diversos tipos celulares, e não somente células beta, seria necessário uma análise mais aprofundada para nos certificarmos de que estes genes estavam sendo induzidos realmente na célula beta ou seriam expressos por algum outro tipo celular.

Figura 10 - Fracionamento em gel de agarose 1% do produto de amplificação de alguns clones selecionados randomicamente das bibliotecas *forward* (a) e *reverse* (b).

Figura 11 –Rastreamento de clones subtraídos da biblioteca *forward* e *reverse* em macroarranjos de ~800 clones em duplicata.

(N) Membrana hibridizada com sonda sintetizada a partir do cDNA de ilhotas pancreáticas normais.

(T) Membrana hibridizada com sonda sintetizada a partir do cDNA de insulinomas humano.

- Os clones posicionados na mesma direção nas duas membranas, são equivalentes;
- Setas em vermelho correspondem ao gene *Serpina3*;
- Setas em azul ao gene *FLJ13072*

4.1.4. Confirmação da expressão diferencial dos clones de cDNAs e sequenciamento

4.1.4.1. Sequenciamento

Os 48 clones selecionados foram seqüenciados e as seqüências comparadas com o banco de dados do Genebank, através do programa <http://www.genome.ucsc.edu/BLAT>. Observou-se uma alta taxa de redundância, o que resultou em um total de 17 clones. Dentre os dezessete clones, oito apresentaram homologia com proteínas hipotéticas, tais como: FLJ13072, FLJ12914, FLJ14932, FLJ10073, FLJ39164, KIAA1075 (Tensina 2), KIAA0927 e DKFZP762P2111; um apresentou homologia com um RNA desconhecido PP1131 e os outros oito apresentaram homologia com diversas proteínas conhecidas, como a Serpina 3, um inibidor de protease, HTCF-4 (Fator de transcrição de células T) envolvido em transativação de transcrição, HMGIC (High Mobility Group) um membro de uma família de fatores de transcrição acessórios envolvido em transformação e proliferação de células de mamífero, PACSIN2 (Protein Kinase C and Casein Kinase Substrate in Neuron 2) proteína adaptadora citoplasmática envolvida na organização do citoesqueleto de actina e na regulação do tráfego vesicular, PPP1CB (Protein Phosphatase 1-beta) envolvida na desfosforilação de várias proteínas, EF1B (Elongation Factor 1, Beta) responsável pela entrega de aminoacil tRNAs ao ribossomo, e a proteína Fbox2 (Neural F-Box protein) envolvida em processos de ubiquitinação.

RT-PCR Semiquantitativo

Para confirmação da expressão diferencial, optou-se pela técnica de RT-PCR semi-quantitativo em vista da dificuldade em conseguir as quantidades necessárias de RNA para a realização do Northern blot. RNA total de ilhotas normais e de adenoma e seus

respectivos cDNAs, foram preparados como descrito em Material e Métodos. Como controle interno dos RT-PCRs, utilizou-se o gene gliceraldeído 3-fosfato (GAPDH).

Através do fracionamento em gel de agarose, mostrado na figura 12, verificou-se que os genes *Serpina3*, *HTCF-4* e a proteína hipotética *FLJ14932* estão mais expressos na amostra de ilhotas normais, quando comparados com o insulinoma. Este resultado foi surpreendente, pois todos os genes selecionados estavam mais expressos na membrana hibridizada com o cDNA de insulinoma. Somente o gene *FLJ13072* mostrou expressão diferencial em insulinoma (Figura 13), conforme o predito pelo RDA. Os genes restantes não confirmaram sua expressão diferencial em nenhuma das amostras.

Figura 12 - Fracionamento em gel de agarose 2% mostrando a expressão diferencial dos genes Serpina3, FLJ14932 e HTCF4, na amostra de ilhotas pancreáticas normais, através de RT-PCR semi-quantitativo.

Gel mostrando a expressão diferencial dos genes FLJ14932, HTCF-4 e serpina3 na amostra de ilhotas (normal) quando comparada ao insulinoma (tumoral) (6 e 5 e 4x mais expressos nas ilhotas normais, respectivamente). Como controle interno foi utilizado o GAPDH.

Figura 13 - Fracionamento em gel de agarose 2% mostrando a expressão diferencial do gene FLJ13072, na amostra de insulinomas, através de RT-PCR semi-quantitativo. Como controle interno foi utilizado o GAPDH.

4.1.5. Análise Bioinformática do gene FLJ13072

Como o objetivo de nosso trabalho é a busca por marcadores moleculares de insulinomas benignos, resolveu-se analisar o gene referente à proteína hipotética FLJ13072, por ser um gene ainda não caracterizado e por ser expresso, exclusivamente, na amostra tumoral.

O clone, isolado por RDA, possui um inserto de 283 bp e 100% de homologia com um cDNA humano de aproximadamente 3,2 Kb que foi clonado dentro de um projeto japonês (NEDO) de sequenciamento de cDNAs humanos em larga escala (cdna.ims.u-tokyo.ac.jp). Esta seqüência, denominada FLJ13072, foi depositada no GeneBank sob o número de acesso AK023134, alinhando na banda 19q13.11 do cromossomo 19 humano.

A análise da seqüência nucleotídica deste clone de cDNA sugere que o mesmo consiste de uma seqüência parcial, correspondente a um transcrito longo de um gene até então desconhecido, baseado numa série de análises de Bioinformática. A tradução conceitual desta seqüência no sentido "sense" revelou, na fase +1, um códon de parada de tradução (nt 338) não precedido de um códon de início de tradução na mesma fase, o que sugere truncamento na extremidade 5' do cDNA. A detecção de inúmeros códons de parada em fase com o primeiro reforça a idéia de que esta fase aberta de leitura corresponde a um fragmento da região codificante deste transcrito. Além disto, observa-se um sinal de poliadenilação canônico seguido de 18 nucleotídeos no final desta seqüência de cDNA (nt 3155), indicando que esta seqüência de cDNA possivelmente está completa na extremidade 3'.

Quando esta seqüência foi alinhada contra o genoma humano, através do programa BLAT (genome.uscs.edu) (Figura 14A), observou-se que este cDNA era constituído de 7 exons, sendo o último mais longo (2,4 Kb). Foi verificado, também, maior

densidade de ESTs que alinham com a extremidade 3' deste cDNA. Este achado é comum na extremidade 3' da maioria dos genes, uma vez que as metodologias mais utilizadas para a geração de ESTs produzem bibliotecas onde a extremidade 3' dos transcritos é representada muito mais freqüentemente. Além disto, quando alinhadas contra o clone FLJ13072, a extremidade 3' de nenhuma destas ESTs se estende além do último nucleotídeo da seqüência do clone FLJ13072, reforçando a idéia de que este clone de cDNA está completo na sua extremidade 3'.

Por outro lado, o alinhamento da extremidade 5' deste cDNA se sobrepõe com o alinhamento de um outro cDNA depositado durante o andamento deste trabalho. Este clone, depositado sob o número de acesso BC049000, é oriundo de um projeto americano (MGC) de clonagem, sequenciamento e catalogamento de cDNAs de mamífero em larga escala (mgc.nci.nih.gov), apresentando uma fase aberta de leitura completa que alinha com a extremidade 5' do clone FLJ13072, exceto por um evento de *splicing* alternativo no 28º (último) exon do mesmo. A seqüência da extremidade 5' deste clone de cDNA (BC049000) é bastante rica em GC (74,5% no primeiro exon) e também alinha com uma ilha CpG na seqüência de gDNA, compatível com o padrão comum de primeiro exon e região promotora de genes de mamíferos. Entretanto, não é possível afirmar, com precisão, se o códon de metionina inicial presente neste cDNA corresponde, de fato, ao primeiro códon traduzido, pois não foi possível encontrar um códon de parada de tradução "upstream" e em fase com o primeiro códon ATG (nt 298). A região 3' deste cDNA, por sua vez, muito provavelmente encontra-se incompleta, pois não foi possível encontrar uma seqüência consenso de poliadenilação na extremidade da mesma.

Estas duas seqüências de cDNA (AK023134 e BC049000) sugerem, portanto, a existência de um mRNA longo, de aproximadamente 7,0 Kb, que é codificado por este locus que

abrange cerca de 110 Kb de DNA genômico. O NCBI (ncbi.nlm.nih.gov) apresenta uma sequência predita para este transcrito de tamanho semelhante (7,1 Kb), que é revista periodicamente (depositada sob o número de acesso XM_117117), entretanto, nenhum transcrito completo foi depositado para este gene até o momento. Alinhamentos de ESTs distribuídos ao longo deste trecho de DNA genômico (37,902-38,012 Mb do cromossomo 19) indicam que diversas variantes de *splicing* podem ser transcritas a partir deste gene, bem como a existência de um provável ortólogo em camundongo, a julgar pelas seqüências de cDNA de camundongo que alinham no mesmo locus humano.

A proteína predita referente ao gene FLJ13072, é constituída por 1.177 aminoácidos, com um peso molecular estimado de 132,6 kDa. Esta proteína apresenta domínios conservados de helicase (Figura 14B), podendo estar envolvida em eventos de transcrição, tradução, reparo de DNA e remodelamento de cromatina e outros domínios, como o Tudor, ainda de função desconhecida.

Através da análise em bancos de dados do SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) (Figura 14C), foi encontrada a "tag" correspondente a este gene em biblioteca de glioblastoma humano, melanoma, carcinoma de rim, colangiocarcinoma, ependimoma, meduloblastoma, linfonodo normal e "Stem Cells" embrionárias com uma representação variando de 4 a 1 "tag" por 200.000.

Search query: CTTAGTTGTG

Color Code
Tags per 200,000	<2	<4	<8	<16	<32	<64	<128	<256	>512

Library	Total Tags in Library	Tags per 200,000	Color Code
SAGE_Skin_melanoma_B_DB2	41338	4
SAGE_Brain_glioblastoma_CL_H54+EGFRvIII	56982	3
SAGE_Liver_cholangiocarcinoma_B_K1	60319	3
SAGE_Brain_ependymoma_B_H580	68614	2
SAGE_Brain_medulloblastoma_B_H972	85376	2
SAGE_Lymph_Node_normal_B_1	99426	2
SAGE_Brain_glioblastoma_B_R20	101053	1
SAGE_Embryonic_stem_cell_H9_normal_p38_CL_SHES1	151735	1
C SAGE_Kidney_carcinoma_B_D2	100281	1

Figura 14 – Análise, por Bioinformática, do gene FLJ13072

- A) Análise pelo Blat da sequência descrita para FLJ13072
- B) Busca por domínios conservados nas predições, onde foi observado presença de domínios de helicase.
- C) Análise por SAGE (Northern virtual), onde a "tag" correspondente ao gene FLJ13072 foi encontrada em bibliotecas de melanoma, glioblastoma, carcinoma de rins, "Stem Cells" embrionárias humanas e etc, com uma expressão que varia de 4 a 1 "tag" por 200.000.

4.1.6. Análise comparativa da expressão de FLJ13072 em diversas linhagens celulares humanas

A expressão do gene FLJ13072 em diversas linhagens celulares tumorais e normais, foi investigada através de RT-PCR semi-quantitativo, como mostrado na figura 15. Um resultado interessante, foi o fato de ter sido expresso em somente três linhagens celulares tumorais (carcinoma de célula B, de tireóide e de pulmão) e, porém com muito baixa expressão. O nível de expressão nestas linhagens foi 6x menor quando comparado ao insulinoma. Nenhum sinal foi detectado nas linhagens normais de testículo, rim e placenta.

As medidas densitométricas foram normalizadas, utilizando-se o *software ImageQuant* e como referência foi utilizado o nível de expressão do "housekeeping gene" Gliceraldeído 3- fosfato desidrogenase (GAPDH).

Figura 15 – Expressão do gene FLJ13072 em diversas linhagens celulares tumorais e normais humanas.

Fracionamento em gel de agarose 2% dos produtos do RT-PCR semi-quantitativo para o gene FLJ13072 em diversas linhagens celulares humanas. A expressão do gene foi observada em somente três linhagens celulares tumorais (carcinoma de célula B, de tireóide e de pulmão). Como controle negativo foi utilizado água ao invés de amostra.

4.2. CodeLink Bioarrays

Como os resultados obtidos pela técnica de RDA não mostraram um perfil gênico satisfatório do insulinoma, optou-se por outro tipo de análise em larga escala, a plataforma *CodeLink UniSet Human II Bioarrays* (GE Healthcare), constituída por 20.000 oligonucleotídeos derivados de genes depositados no GenBank, RefSeq e UniGene até o final do ano de 2002. Cada oligonucleotídeo possui 20 bases, sendo desenhado de forma a ser específico para o gene analisado.

Foram realizadas duplicatas biológicas das lâminas, utilizando como sondas duas amostras diferentes de ilhotas normais e dois tumores caracterizados histopatologicamente como sendo carcinomas neuroendócrinos grau I e grau II (insulinomas JPS e JASD), considerados como sendo insulinomas de baixo e médio grau de diferenciação, respectivamente (Figura 16).

Após a hibridização, os dados foram normalizados em relação à mediana das intensidades dos sinais de hibridização, pelo programa *CodeLink System Software*. Por se tratarem de duplicatas biológicas, observou-se uma variação entre as amostras controles, portanto, com o objetivo de se obter uma análise mais confiável, os dados correspondentes a cada lâmina dos insulinomas foram comparados com os dados das duas lâminas de ilhotas pancreáticas normais, isto é, Insulinoma 1 X Ilhota 1, Insulinoma 1 X Ilhota 2, Insulinoma 2 X Ilhota 1 e Insulinoma 2 X Ilhota 2 e os genes selecionados foram aqueles que apresentaram um índice de expressão maior ou igual a 2X nos insulinomas e nas ilhotas pancreáticas normais nas quatro análises.

Esta análise resultou na seleção de 397 e 519 genes que estavam 2 ou mais vezes expressos em insulinomas e ilhotas pancreáticas normais, respectivamente. Dentre os 397 genes isolados nos insulinomas, 174 (43,8%) são referentes a proteínas

hipotéticas ainda não caracterizadas e 16,6% estão envolvidos em proliferação celular.

A figura 17 mostra uma distribuição funcional dos genes encontrados na plataforma CodeLink como sendo mais expressos nos insulinomas.

Figura 16: Imagem obtida dos bioarrays pelo escâner. Imagens dos *bioarrays* que foram hibridizados com sondas provenientes da amostra de ilhotas normais e com sondas provenientes da amostra de insulinomas.

Figura 17 – Distribuição funcional dos genes mais expressos em insulinomas benignos identificados utilizando a plataforma CodeLink Bioarrays.

Os genes foram selecionados a partir de um nível de indução de 2 vezes ou mais nos insulinomas.

A classificação foi feita pelo programa FatiGO Data mining with Gene Ontology (fatigo.bioinfo.cnio.es).

As tabelas a seguir mostram os genes conhecidos mais expressos nas amostras de insulinomas, classificados em sub-grupos, de acordo com os processos biológicos nos quais atuam determinados pelo vocabulário do "Gene Ontology" (GO) (<http://fatigo.bioinf.cnio.es>).

Tabela 4. Tabela representando os genes mais expressos nas amostras de insulinomas, através da plataforma CodeLink, divididos de acordo com seus processos biológicos (GO).

GO	GENES	NI (vezes)	Localização
PROLIFERAÇÃO CELULAR	Midkine (neurite growth-promoting factor 2) (MDK)	4,08	11p11.2
	Stromal antigen 3 (STAG3 gene)	2,43	7q22
	Transforming growth factor, beta 1 (TGFB1)	1,89	19q13.2
	Vascular RAB-GAP/TBC-Containing (VRP)	13,96	2q11.2
	Polymerase (DNA directed), mu (POLM)	27,93	7p13
	Cysteine-rich protein 1 (intestinal) (CRIP1)	23,81	X
	MAD2 mitotic arrest deficient-like 2 (yeast)	4,56	1p36
	mRNA (~95%) for major centromere autoantigen CENP-B	14,26	20p13
	Interleukin 2 receptor gamma chain	3,23	Xq13.1
	Histone deacetylase 4 (HDAC4)	6,46	2q37.2
	Deleted in lymphocytic leukemia, 2 (DLEU2)	41,89	13q14.3
	Aminopeptidase A	10,65	4q25
	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1 (SERPINF1)	4,51	17p13.1
	Transducer of ERBB2, 2 (TOB2)	2,96	22q13.2-q13.31
	Type-2 phosphatidic acid phosphatase alpha-2 (PAP2-a2)	4,77	X
	Endothelin receptor type A (EDNRA)	5,3	4q31.21
	RAD52 homolog (S. cerevisiae) (RAD52), transcript variant alpha	5,91	12p13-p12.2
	SB1.8/DXS423E=mitosis-specific chromosome segregation protein SMC1 homolog [human, HT1080 and M426 fibroblast cell lines, mRNA, 5190 nt]	2,7	Xp11.22-p11.21
	Colony stimulating factor 1 receptor, formerly McDonough feline sarcoma viral (v-fms) oncogene homolog (CSF1R)	6,82	5q33-q35
	Low density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5)	23,33	11q13.4
	CD3E antigen, epsilon polypeptide (TiT3 complex) (CD3E)	4,81	11q23
	Core-binding factor, runt domain, alpha subunit 2; translocated to, 2 (CBFA2T2), transcript variant 2	2,9	20q11
	TUMOR NECROSIS FACTOR RECEPTOR SUPERFAMILY, MEMBER 12 (TRANSLOCATING CHAIN-ASSOCIATION MEMBRANE PROTEIN) (TNFRSF12)	2,57	1p36.2
	Vascular endothelial growth factor B (VEGFB)	3,37	11q13
	N-MYC DOWNSTREAM REGULATED GENE 1 (NDRG1)	8,26	8q24
ADESÃO CÉL-CÉL.	PROTOCADHERIN ALPHA 10 (PCDHA10), TRANSCRIPT VARIANT 3	2,9	5q31
	PROTOCADHERIN 16 (PCDH16)	4,22	11p15.4
	Protocadherin beta 3 (PCDHB3)	3,62	5q31
	Intercellular adhesion molecule 2 (ICAM2)	5	17q23-q25

RESULTADOS

GO	GENES	NI (vezes)	Localização
	Integrin alpha 8 subunit	3,4	10p12.32
	Nephronophthisis 1 (juvenile) (NPHP1), transcript variant 1	2,56	2q13
	Lectin-like NK cell receptor (OCIL), transcript variant 1	2,38	12p13
	Dachsous 1 (Drosophila) (DCHS1)		
	Intercellular adhesion molecule 5, telencephalin (ICAM5)	12,04	19p13.2
	Protocadherin 20 (PCDH20)	9,3	13q21
	Plakophilin 2 (PKP2), transcript variant 2b	10,06	12p11
	Attractin (ATRN), transcript variant 3	2,45	20p13
ADESÃO CÉL-MATRIZ	Integrin alpha 8 subunit	3,4	10p12.32
	Parvin, gamma (PARVG)	3,02	22q13.2-q13
MIGRAÇÃO	Lymphatic Endothelium-Specific Hyaluronan Receptor Lyve-1	2,9	11p15
	Nitric Oxide Synthase	3,16	7q36
	Thrombospondin 4 (THBS4)	11,76	5q13
CRESCIMENTO CELULAR	V-FOS FBJ Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog (FOS)	11,03	14q24.3
	Protease, Serine, 11 (IGF BINDING) (PRSS11)	9,59	10q26.3
	Angiopoietin 2 (ANGPT2)	9,29	8p23.1
	Hepsin (Transmembrane Protease, Serine 1) (HPN)	5,59	9q11-q13.2
ONCOGÊNESE	Matrix GLA Protein (MGP)	31,63	12p13.1-p12.3
	MEIS1, Myeloid Ectropic Viral Integration Site 1 Homolog (MOUSE) (MEIS1)	3,01	2p14-p13
	Secreted Frizzled-Related Protein 4 (SFRP4)	76,87	7p14.1
	WNT1 Inducible Signaling Pathway Protein 2 (WISP2)	2,9	20q12-q13.1
	Achaete-scute complex-like 1 (Drosophila) (ASCL1)	6,51	12q22-q23
	Tumor Protein D52 (TPD52)	11,9	8q21
	ATP-Binding Cassette, Sub-Family B (MDR/TAP), Member 6 (ABCB6), Nuclear Gene Encoding Mitochondrial Protein	3,9	2q36
	Transforming, Acidic Coiled-Coil Containing Protein 2 (TACC2)	47,73	10q26
	V-FOS FBJ Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog (FOS)	11,03	14q24.3
	Core Binding Factor Beta Isoform PEBP2B	5,78	16q22.1

RESULTADOS

GO	GENES	NI (vezes)	Localização
RESPOSTA IMUNE	FC FRAGMENT OF IGG, HIGH AFFINITY IA, RECEPTOR FOR (CD64) (FCGR1A)	5,67	1q21.2-q21.3
	VITRONECTIN (SERUM SPREADING FACTOR, SOMATOMEDIN B, COMPLEMENT S-PROTEIN) (VTN)	16,2	17q11
	MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX, CLASS II, DM BETA (HLA-DMB)	2,08	6p21.3
	SRC FAMILY ASSOCIATED PHOSPHOPROTEIN 1 (SCAP1)	15,83	17q21.32
	SMALL INDUCIBLE CYTOKINE SUBFAMILY B (CYS-X-CYS), MEMBER 14 (BRAK) (SCYB14)	27,71	5q31
	INTERLEUKIN 2 RECEPTOR GAMMA CHAIN	3,23	Xq13.1
	COMPLEMENT PROTEIN COMPONENT C7	29,34	1p36.3-p34.1
DIFERENCIAÇÃO	MIDKINE (NEURITE GROWTH-PROMOTING FACTOR 2) (MDK)	4,08	11p11.2
	ACHAETE-SCUTE COMPLEX-LIKE 1 (Drosophila) (ASCL1)	6,51	12q22-q23
	PAX (PAX8e)=PAIRED BOX {alternatively spliced}	2	2q12-q14
	N-MYC DOWNSTREAM REGULATED GENE 1 (NDRG1)	8,26	8q24
	HISTONE DEACETYLASE 4 (HDAC4)	6,46	2q37.2
	FOUR AND A HALF LIM DOMAINS 1 (FHL1)	5,24	Xq28
	NOTCH LIGANT DELTA-2	5,07	15q14
APOPTOSE	TRANSFORMING GROWTH FACTOR, beta 1 (TGFB1)	1,89	19q13.2
	TUMOR NECROSIS FACTOR RECEPTOR SUPERFAMILY, Member 12	2,57	1p36.2
	MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN TAU (MAPT), Transcript Variant 1	4,78	17q21.1
REMODELAMENTO DE CROMATINA	SUPT5H PROTEIN	4,65	19q13
	SWI/SNF RELATED, MATRIX ASSOCIATED, ACTIN DEPENDENT REGULATOR OF CHROMATIN, SUBFAMILY D, MEMBER 2 (SMARCD2)	2,36	17q23-q24

RESULTADOS

GO	GENES	NI (vezes)	Localização
TRANSDUÇÃO DE SINAL	MAP-KINASE ACTIVATING DEATH DOMAIN (MADD), TRANSCRIPT VARIANT 1	3,16	11p11.2
	INTERLEUKIN-2 RECEPTOR	3,2	Xq13.1
	MIDKINE (NEURITE GROWTH-PROMOTING FACTOR 2) (MDK)	4	11p11.2
	GLYCOPROTEIN IB (PLATELET), BETA POLYPEPTIDE (GP1BB)	4	22q11.21
	PH DOMAIN CONTAINING PROTEIN IN RETINA 1 (PHRET1)	3,33	0
	MAL, T-CELL DIFFERENTIATION PROTEIN (MAL), TRANSCRIPT VARIANT D	23,52	2cen-q13
	ANTI-MULLERIAN HORMONE RECEPTOR, TYPE II (AMHR2)	5,2	12q13
	GPR6 G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR GENE	6,3	6q21
	UNC-5 HOMOLOG D (C. ELEGANS) (UNC5D)	3,2	8p11.23- p11.22
	P13-KINASE ASSOCIATED P85	2	nulo
	RHOPHILIN 1 (GRBP)	4,4	8q24.3
	HEPG2 3' REGION MBOI CDNA, CLONE HMD3F12M3"	2,2	nulo
	RAB26, MEMBER RAS ONCOGENE FAMILY (RAB26)	4,4	16p13.3
	LYMPHOID ENHANCER FACTOR-1 (LEF1)	2,5	4q23-q25
	GUANINE NUCLEOTIDE EXCHANGE FACTOR FOR RAP1; M-RAS-REGULATED GEF (KIAA0277)	6,3	7p21.3
	PHOSPHOLIPASE D2 (PLD2) MRNA, SPLICE VARIANT HPLD2A	2,5	0
	PHOSPHODIESTERASE 4B, CAMP-SPECIFIC (PHOSPHODIESTERASE E4 DUNCE HOMOLOG, DROSOPHILA) (PDE4B)	8,3	1p31
	CAMP-SPECIFIC PHOSPHODIESTERASE 8B (PDE8B)	7	5q13.2
	PURINERGIC RECEPTOR (FAMILY A GROUP 5) (P2Y5)	4,4	13q14
	APICAL PROTEIN-LIKE (XENOPUS LAEVIS) (APXL)	6,7	Xp22.3
	RHO GUANINE NUCLEOTIDE EXCHANGE FACTOR (GEF) 12 (ARHGEF12)	11,15	11q23.3
	RAB9B, MEMBER RAS ONCOGENE FAMILY (RAB9B)	2	Xq22.1-q22.3
	G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR 92 (GPR92)	4,36	0
	PAS DOMAIN CONTAINING SERINE/THREONINE KINASE (PASK)	24	2q37.3
	REGULATING SYNAPTIC MEMBRANE EXOCYTOSIS 2 (RIMS2)	3,5	8q22.3
	CLONE OR2V2 OLFACTORY RECEPTOR GENE	3	0
	TYPE-2 PHOSPHATIDIC ACID PHOSPHATASE ALPHA-2 (PAP2-A2)	4,8	0
	"HUMAN MRNA FOR P55PIK	4,1	0
	CLONE F2896 PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE TD14	4,9	3p21.3
	LINK GUANINE NUCLEOTIDE EXCHANGE FACTOR II (LOC51195)	2,7	17q21.1
	G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR (TYMSTR)	5	3p21
	NEUROGRANIN (PROTEIN KINASE C SUBSTRATE, RC3) (NRGN)	7,2	11q24
	G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR 19 (GPR19)	2,4	12p12.3
	GTP-BINDING PROTEIN RHO7 (RHO7)	13,2	17q21
	G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR KINASE 5 (GPRK5)	12,3	10q24-qter

RESULTADOS

GO	GENES	NI (vezes)	Localização
	INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR BINDING PROTEIN, ACID LABILE SUBUNIT (IGFALS)	14,7	16p13.11
	CEREBRAL CAVERNOUS MALFORMATIONS 1 (CCM1)	3,2	7q21-q22
	FIBROBLAST GROWTH FACTOR 14 (FGF14)	3,5	13q34
	REGULATOR OF G-PROTEIN SIGNALLING 9 (RGS9)	4,2	17q23-q24
	VERY LOW DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR (VLDLR)	2,6	9p24
	SIGNAL TRANSDUCER AND ACTIVATOR OF TRANSCRIPTION 4 (STAT4)	7	2q32.2-q32.3
	MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE KINASE 4 (MAP2K4)	2,1	17p11.2
	SECRETIN RECEPTOR (SCTR)	2,6	2q14.1
	MEMBRANE PROTEIN, PALMITOYLATED 1 (55KD) (MPP1)	2	Xq28
	PURINERGIC RECEPTOR P2X, LIGAND-GATED ION CHANNEL, 1 (P2RX1)	133,1	17p13.3
	FIBROBLAST GROWTH FACTOR 9 (GLIA-ACTIVATING FACTOR) (FGF9)	8,3	13q11-q12
	5-HYDROXYTRYPTAMINE (SEROTONIN) RECEPTOR 2B (HTR2B)	4,6	2q36.3-q37.1
	CHOLINERGIC RECEPTOR, NICOTINIC, ALPHA POLYPEPTIDE 5 (CHRNA5)	4,7	15q24
	HDELTA2 MRNA FOR NOTCH LIGAND DELTA-2	5	15q14
	MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE KINASE KINASE 3 (MAP3K3)	2,2	17q22
	UNACTIVE PROGESTERONE RECEPTOR, 23 KD (P23)	17,4	12
	SERINE/THREONINE KINASE WITH DBL- AND PLECKSTRIN HOMOLOGY DOMAINS (TRAD)	5,1	3q21.3
	WINGLESS-TYPE MMTV INTEGRATION SITE FAMILY, MEMBER 14 (WNT14)	2,2	1q42
	GPR6 G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR GENE	6,3	6q21
EMBRIOGÊNESE, MORFOGÊNESE	SEX COMB ON MIDLEG-LIKE 2 (DROSOPHILA) (SCML2)	4,4	Xp22
	ZINC FINGER PROTEIN 145 (KRUPPEL-LIKE, EXPRESSED IN PROMYELOCYTIC LEUKEMIA) (ZNF145)	14,3	11q23.1
	AMYLOID BETA (A4) PRECURSOR-LIKE PROTEIN 1 (APLP1)	8,7	19q13.1
	T-BOX 19 (TBX19)	4,2	1q23-q24
	HOMEO BOX (EXPRESSED IN ES CELLS) 1 (HESX1)	15,3	3p21.2-p21.1
	MATRIX METALLOPROTEINASE 19 (MMP19), TRANSCRIPT VARIANT RASI-9	8,7	12q14

RESULTADOS

GO	GENES	NI (vezes)	Localização
METABOLISMO DE LÍPÍDEOS	COLIPASE, PANCREATIC (CLPS)	5,16	6pter-p21.1
	APOLIPOPROTEIN D (APOD)	5,4	3q26.2-qter
	HYDROXYSTEROID (17-BETA) DEHYDROGENASE 8 (HSD17B8)	2,89	6p23.1
	LOW DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR-RELATED PROTEIN 5 (LRP5)	23,33	11q13.4
	UDP-GAL:BETAGLCNAC BETA 1,4-GALACTOSYLTRANSFERASE, POLYPEPTIDE 4 (B4GALT4)	3,42	3q13.3
	PEROXISOME PROLIFERATIVE ACTIVATED RECEPTOR, GAMMA (PPARG)	2,17	3p25
	BUTYROPHILIN (BTF5)	5,91	6p22.1
	TYPE-2 PHOSPHATIDIC ACID PHOSPHATASE ALPHA-2 (PAP2-A2)	4,77	0
	PHOSPHOLIPASE D2 (PLD2) MRNA, SPLICE VARIANT HPLD2A	2,54	0
METABOLISMO DE DNA	SIMILAR TO COLLAP SIN RESPONSE MEDIATOR PROTEIN 1, CLONE MGC:14264 IMAGE:4130354	3,91	4p16.1-p15
	URIDINE PHOSPHORYLASE (UP)	1,92	7
	LYMPHOID ENHANCER FACTOR-1 (LEF1)	2,5	4q23-q25
	HT001 PROTEIN (HT001)	4,08	3q22.1
	CAMP-SPECIFIC PHOSPHODIESTERASE 8B (PDE8B)	7,09	5q13.2
	POLYMERASE (DNA DIRECTED), MU (POLM)	27,93	7p13
	DTDP-D-GLUCOSE 4,6-DEHYDRATASE (TDPGD)	7,63	13q32.1
	MIX-LIKE HOMEBOX PROTEIN 1 (MILD1)	2,3	1q41
	HOMEO BOX D4 (HOXD4)	4,44	2q31.1
METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS	HISTONE DEACETYLASE 4 (HDAC4)	6,46	2q37.2
	GAMMA-GLUTAMYLTRANSFERASE-LIKE ACTIVITY 1 (GGTLA1)	7,41	22q11.23
	SOLUTE CARRIER FAMILY 7 (CATIONIC AMINO ACID TRANSPORTER, Y+ SYSTEM), MEMBER 8 (SLC7A8)	5,36	14q11.2
	SOLUTE CARRIER FAMILY 7 (CATIONIC AMINO ACID TRANSPORTER, Y+ SYSTEM), MEMBER 9 (SLC7A9)	59,14	0
METABOLISMO DE CARBOIDRATOS	NITRIC OXIDE SYNTHASE	3,16	7q36
	ATP-BINDING CASSETTE, SUB-FAMILY C (CFTR/MRP), MEMBER 8 (ABCC8)	5,26	11p15.1
	PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYKINASE 1 (SOLUBLE) (PCK1)	3,75	20q13.31
	6-PHOSPHOFRUCTO-2-KINASE, FRUCTOSE-2,6-BIPHOSPHATASE 2, HEART FORM, ENZYME INVOLVED IN THE REGULATION OF GLYCOLYSIS, CATALYZES THE SYNTHESIS AND DEGRADATION OF FRUCTOSE-2,6-BISPHOSPHATE	15,55	nulo
	SIALYLTRANSFERASE 4B (BETA-GALACTOSIDASE ALPHA-2,3-SIALYTRANSFERASE) (SIAT4B)	4,49	16q22.3

RESULTADOS

GO	GENES	NI (vezes)	Localização
GENES NÃO CLASSIFICADOS PELO PROGRAMA	PLECKSTRIN AND SEC7 DOMAIN CONTAINING 4 (PSD4)	4,52	2q13
	ESOPHAGEAL CANCER RELATED GENE 4 PROTEIN (ECRG4)	15,03	2q12.1
	INTERLEUKIN 17D (IL17D)	5,54	13q12.11
	SAC1 SUPPRESSOR OF ACTIN MUTATIONS 1-like (yeast) (SACM1L)	3,95	3p21.3
	PROSTATE ANDROGEN-REGULATED TRANSCRIPT 1 (PART1)	81,53	5q12.1
	SIMILAR to ENDOTHELIAL CELL ADHESION MOLECULE (ESAM)	9,79	11q24.2
	SOLUTE CARRIER FAMILY 9 (sodium/hydrogen exchanger), isoform 9	2,29	nulo
	RHO GUANINE NUCLEOTIDE EXCHANGE FACTOR (GEF) 4 (ARHGEF4), transcript variant 2	11,02	2q22
	DISINTEGRIN-like AND METALLOPROTEASE (reprolysin type) WITH THROMBOSPONDIN type 1 motif, 13 (ADAMTS13), transcript variant 1	10,26	9q34
	ENDOPLASMIC RETICULUM OXIDOREDUCTIN 1-L BETA, A MEMBER OF THE ENDOPLASMIC RETICULUM OXIDOREDUCTIN FAMILY, INDUCED DURING THE UNFOLDED PROTEIN RESPONSE, OXIDIZES PROTEIN DISULFIDE ISOMERASE (PDIP) PROMOTING DISULFIDE BOND FORMATION	7,12	nulo
	HSPC171 protein (HSPC171)	7,71	16q23.1
	FUKUTIN RELATED PROTEIN (FKRP)	2,8	19q13.33
	OSTEOGLYCIN (osteoinductive factor, mimecan) (OGN), transcript variant 1	120,16	9q22
	TPR domain containing STI2 (STI2)	3,23	3p21.33
	LEUKOCYTE IgG RECEPTOR (Fc-gamma-R)	28,26	1q23
	DIPEPTIDYLPEPTIDASE 6 (DPP6), transcript variant 2	3,45	7q36.1-q36.2
	FER-1-like 4 (C. elegans) (FER1L4)	7,21	20q11.21
	TUMOR PROTEIN p53 INDUCIBLE NUCLEAR PROTEIN 1 (TP53INP1)	6,33	12p12.1-p11.2
	PUTATIVE Rab5-INTERACTING PROTEIN	2,15	20q11.22
	INTEGRAL NUCLEAR ENVELOPE INNER MEMBRANE PROTEIN (LBR) gene, exon 11	2,41	nulo
	ENOLASE 3, (beta, muscle) (ENO3), transcript variant 1	8,45	17pter-p11
	"PROTEIN WITH LOW SIMILARITY TO S. CEREVISIAE YEA4P, WHICH IS A UDP-N-ACETYLGLUCOSAMINE TRANSPORTER INVOLVED IN DRUG SUSCEPTIBILITY AND RESISTANCE"	2,27	nulo
	KRAKEN-like (dJ222E13.1)	14	22q13.2-q13.31
	MAGIC ROUNDABOUT (FLJ20798)	113,78	11q24.2
	G PROTEIN COUPLED RECEPTOR INTERACTING PROTEIN, COMPLEMENT-C1Q TUMOR NECROSIS FACTOR-RELATED (ZSIG37)	2,53	17q25.3
	AUTOSOMAL DOMINANT POLYCYSTIC KIDNEY DISEASE PROTEIN 1 (PKD1)	4,59	16
	PROTEIN ""A"" (A), TRANSCRIPT VARIANT A-1	4,86	12p13

RESULTADOS

GO	GENES	NI (vezes)	Localização
	RHO GUANINE NUCLEOTIDE EXCHANGE FACTOR (GEF) 15	3,15	17p12
	ERO1-like beta (S. cerevisiae) (ERO1LB)	7,49	1q42.2-q43
	"RAE1 RNA EXPORT 1 HOMOLOG (S. POMBE), AN RNA-BINDING PROTEIN THAT SHUTTLES BETWEEN NUCLEUS AND CYTOPLASM, LIKELY FUNCTIONS IN THE NUCLEAR EXPORT OF MRNA, MAY BE INVOLVED IN CYTOSKELETAL ATTACHMENT OF MRNPS AND THEIR CYTOPLASMIC TRANSPORT"	2,00	nulo
	ATPase, H+ transporting, lysosomal 13kDa, V1 subunit G isoform 2 (ATP6V1G2), transcript variant 1	2,48	6p21.3
	BBP-like protein 2 (BLP2), transcript variant 1	1,91	15q26.3
	ETV6 gene	3,74	nulo
	MOST2	6,18	9q33.3
	"MEMBER OF THE ZINC-CONTAINING ALCOHOL DEHYDROGENASE FAMILY, HAS LOW SIMILARITY TO DITHIOLETHIONE-INDUCIBLE GENE-1 (RAT DIG1), WHICH IS A PROTEIN WITH NADP DEHYDROGENASE ACTIVITY THAT MAY INHIBIT TUMORIGENESIS THROUGH A CELLULAR DETOXIFICATION RESPONSE"	2,92	nulo
	MATRIX METALLOPROTEINASE 23A (MMP23A)	2,3	1p36.3
	"MEMBER OF THE MITOCHONDRIAL CARRIER PROTEIN FAMILY OF MEMBRANE TRANSPORTERS, HAS MODERATE SIMILARITY TO S. CEREVISIAE OAC1P, WHICH IS A MITOCHONDRIAL OXALOACETATE TRANSPORTER"	7,08	nulo
	NADH:UBIQUINONE OXIDOREDUCTASE MLRQ subunit homolog (LOC56901)	9,9	nulo
	CARBOXYPEPTIDASE, vitellogenic-like (CPVL), transcript variant 1	30,97	7p15-p14
	TBP-associated factor (hTAFII130)	20,1	0
	SPARC-like 1 (SPARCL1) gene	43,23	nulo
	REGUCALCIN (senescence marker protein-30) (RGN), transcript variant 1	9,47	Xp11.3
	SEC31-like 2 (S. cerevisiae) (SEC31L2), transcript variant 1	3,76	10q24.2
	IMMUNE ASSOCIATED NUCLEOTIDE 4 like 1 (mouse) (IAN4L1)	5,47	7q36
	OTASE gene, 5' UTR, exon 1 and joined CDS, variant 1	3,68	nulo
	HEMOGLOBIN, beta (HBB)	3718,38	11p15.5
	SYNAPTIC NUCLEI EXPRESSED GENE 2 (SYNE-2)	4,09	14q23.1-q23.2
	"INTERFERON-INDUCED TRANSMEMBRANE PROTEIN 1, A PUTATIVE RECEPTOR SIGNALING PROTEIN THAT PLAYS A ROLE IN THE TRANSDUCTION OF ANTIPROLIFERATIVE AND HOMOTYPIC ADHESION SIGNALS"	3,59	nulo
	B cell RAG associated protein (GALNAC4S-6ST)	6,94	10q26
	CYCLIN D BINDING MYB-like transcription factor 1 (DMTF1)	2,59	0
	MEMBRANE-SPANNING 4-DOMAINS, SUBFAMILY A, MEMBER 7 (MS4A7)	33,54	11q12.1
	mRNA for RETROTRANSPOSON	6,88	nulo
	PUTATIVE EMU1 (LOC129080)	5,25	22q11.23

RESULTADOS

GO	GENES	NI (vezes)	Localização
	ETL PROTEIN (ETL)	5,46	1p33-p32
	TESTIS-SPECIFIC TESTIS TRANSCRIPT Y 1 (TTY1) MRNA	2,29	Y
	NESH PROTEIN (NESH)	10,67	17q21.3
	FENESTRATED-ENDOTHELIAL LINKED STRUCTURE PROTEIN; PV-1 PROTEIN (PV1)	45,17	19p13.2
	HISTONE ACETYLASE COMPLEX SUBUNIT (SPT3)	3,06	0
	RBP1-LIKE PROTEIN (BCAA), TRANSCRIPT VARIANT 2	3,05	1q42.1-q43
	SIX TRANSMEMBRANE PROSTATE PROTEIN	4,23	10q24
	BLADDER CANCER OVEREXPRESSED PROTEIN (BLOV1)	2,00	5q31

NI- Nível de Indução

Dentre os genes isolados pelo RDA, o gene SerpinA3, confirmou ser diferencialmente expresso em ilhotas normais, através do CodeLink, com um nível de indução de 80 vezes. Já o gene HTC4 se mostrou super-expresso em somente uma das amostras de ilhotas normais. Os outros genes confirmaram não ter diferença de expressão entre as duas amostras. Os genes FLJ13072 e FLJ14937 não se encontravam representados nas lâminas de CodeLink.

4.3. Validação, por Real-Time PCR, da expressão diferencial dos genes identificados através da plataforma CodeLink

Para a confirmação dos dados dos *bioarrays* por Real-Time PCR, foram escolhidos 6 genes identificados através da plataforma CodeLink como sendo diferencialmente expressos em insulinomas benignos, quando comparados com ilhotas normais. O gene "Human Achaete-Scute homologue 1" (ASCL1), com um nível de indução de 6,5 vezes nos insulinomas, é um fator de transcrição envolvido na diferenciação neuroendócrina pulmonar (Ball et al., 1993); o gene "Esophageal Cancer-related gene 4" (ECRG4), induzido 15 vezes nos tumores, é um candidato a gene supressor de tumor (Bi et al., 2001); o gene "Signal Transducer and Activator of Transcription 4" (STAT4), induzido 7 vezes, faz parte da família de proteínas STATs, que compreendem um grupo de fatores de transcrição citoplasmáticos, os quais são ativados constitutivamente, sendo detectados em um número considerável de linhagens celulares de câncer humano e tumores primários (Calo et al., 2003); o gene SPARC-like protein 1 (SPARC1), induzido 43 vezes, é uma glicoproteína ligante de cálcio, designada também "Hevin", que possui 62% de identidade com a proteína de matriz extracelular, "Secreted protein, acidic, cysteine-rich" (SPARC) (Girard & Springer, 1995); o gene "Protease, Serine 11" (PRSS11), induzido

9,6 vezes, é uma serina protease com um domínio ligante de IGF (Insulin-like Growth Factor) (Zumbrunn & Trueb, 1996) e o gene Insulin-like Growth Factor Binding Protein, Acid Labile Subunit (IGFALS), induzido 14,7 vezes, é uma proteína ligante de IGF (Leong et al., 1992).

Foram utilizadas 11 amostras de insulinomas benignos e quatro amostras de ilhotas pancreáticas humanas normais como controle. Como controle interno da reação, foi utilizado o gene "housekeeping" Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HPRT) (Jolly et al., 1983). Para cada gene, foram realizados dois experimentos, sendo cada reação em duplicata. O índice de expressão dos genes nos tumores foi comparado com as amostras de ilhotas normais. Por se tratarem de amostras de ilhotas pancreáticas provenientes de diferentes pacientes e por terem sido submetidas a um processo de isolamento extremamente complexo, as amostras controles apresentaram uma grande variação, quanto ao nível de expressão de cada gene. Em função disto, o nível de indução dos genes foi calculado comparando-se a média do nível de expressão destes nos insulinomas com a média das amostras controles.

A análise estatística foi realizada comparando as médias dos níveis de expressão dos genes nas amostras tumorais e normais, utilizando o teste t com variâncias desiguais desconhecidas. A diferença foi considerada significativa quando o p era menor que 0,05.

A diferença de expressão dos genes SPARCL1, PRSS11, ASCL1, STAT4 e ECRG4 entre as amostras tumorais e normais foi estatisticamente significativa, porém o mesmo não foi observado quanto ao gene IGFALS (Figuras 18 a 23).

Figura 18- Representação gráfica da validação por REAL-TIME PCR do gene SPARCL1 nas amostras tumorais.

Diagrama de caixa comparando as médias da expressão do gene SPARCL1 nas amostras de insulinomas e ilhotas normais. A caixa representa 50% dos dados centrais, as linhas verticais são os valores mínimo e máximo e o traço horizontal dentro da caixa é a mediana. O símbolo verde refere-se às médias da expressão do gene e a linha verde a diferença entre elas.

*P< 0,05

Figura 19- Representação gráfica da validação por REAL-TIME PCR do gene PRSS11 nas amostras tumorais.

Diagrama de caixa comparando as médias da expressão do gene PRSS11 nas amostras de insulinomas e ilhotas normais. A caixa representa 50% dos dados centrais, as linhas verticais são os valores mínimo e máximo e o traço horizontal dentro da caixa é a mediana. O símbolo verde refere-se às médias da expressão do gene e a linha verde a diferença entre elas.

*P< 0,05

Figura 20- Representação gráfica da validação por REAL-TIME PCR do gene STAT4 nas amostras tumorais.

Diagrama de caixa comparando as médias da expressão do gene STAT4 nas amostras de insulinomas e ilhotas normais. A caixa representa 50% dos dados centrais, as linhas verticais são os valores mínimo e máximo e o traço horizontal dentro da caixa é a mediana. O símbolo verde refere-se às médias da expressão do gene e a linha verde a diferença entre elas.

*P< 0,05

Figura 21- Representação gráfica da validação por REAL-TIME PCR do gene ECRG4 nas amostras tumorais.

Diagrama de caixa comparando as médias da expressão do gene ECRG4 nas amostras de insulinomas e ilhotas normais. A caixa representa 50% dos dados centrais, as linhas verticais são os valores mínimo e máximo e o traço horizontal dentro da caixa é a mediana. O símbolo verde refere-se às médias da expressão do gene e a linha verde a diferença entre elas.

*P< 0,05

Figura 22- Representação gráfica da validação por REAL-TIME PCR do gene ASCL1 nas amostras tumorais.

Diagrama de caixa comparando as médias da expressão do gene ASCL1 nas amostras de insulinomas e ilhotas normais. A caixa representa 50% dos dados centrais, as linhas verticais são os valores mínimo e máximo e o traço horizontal dentro da caixa é a mediana. O símbolo verde refere-se às médias da expressão do gene e a linha verde a diferença entre elas.

*P< 0,05

Figura 23- Representação gráfica da validação por REAL-TIME PCR do gene IGFALS nas amostras tumorais.

Diagrama de caixa comparando as médias da expressão do gene IGFALS nas amostras de insulinosas e ilhotas normais. A caixa representa 50% dos dados centrais, as linhas verticais são os valores mínimo e máximo e o traço horizontal dentro da caixa é a mediana. O símbolo verde refere-se às médias da expressão do gene e a linha verde a diferença entre elas.

4.4. Estabelecimento e caracterização da linhagem de insulinoma humano

Um dos problemas encontrados durante este projeto foi a falta de um modelo celular humano de insulinoma, portanto, propôs-se o estabelecimento e a caracterização de linhagens celulares derivadas de culturas primárias de insulinomas humanos, para utilização, como modelo *in vitro* de proliferação e diferenciação de células beta, além de ser extremamente útil como modelo para estudos funcionais de genes isolados de amostras de insulinomas.

4.4.1. Cultura celular do insulinoma GLS

Com o objetivo de investigar se as células do insulinoma GLS possuem a capacidade de crescimento *in vitro*, após o procedimento de dissociação do tumor, as células foram incubadas sob condições apropriadas de cultivo celular, como descrito em Material e Métodos. Após 4h de incubação, um número significativo de células de insulinoma começou a aderir em meio de cultura CMRL suplementado com 10% de soro fetal bovino. Após dez dias de cultivo (primeira passagem) observou-se a presença de dois tipos celulares distintos (Fig.24). Um dos tipos, representado por células alongadas, cresce em monocamada, com morfologia semelhante a fibroblastos (setas) e o outro, de células que cresciam em "clusters" de diferentes tamanhos e em diversas camadas celulares.

Na quarta passagem (31 dias de cultivo), todas as células apresentaram características de células mais alongadas, não sendo observada a formação dos "clusters". Apesar disto, observou-se marcação positiva para insulina em todas as células com um aspecto granular típico de células beta, como mostrado na figura 25. Nesta etapa, o índice de secreção de insulina basal mostrou-se abaixo do nível de detecção do método utilizado para análise.

A partir dos resultados obtidos, através da curva de crescimento foi possível calcular o tempo de dobramento através do programa Prism versão 3.03 (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA) (Figura 26A). O tempo de dobramento foi calculado a partir da aproximação de uma curva de regressão não linear sobre os dados do número de células obtidos entre os dias 0 e 2 da curva de crescimento. A figura 26B mostra o gráfico utilizando-se o programa e, através de regressão não-linear, o tempo de dobramento das células foi calculado como sendo de aproximadamente 23h.

Figura 24. Microscopia de campo claro mostrando a cultura de células proveniente do insulinoma GLS na primeira passagem.

A) Um “cluster” de células de insulinoma é mostrado após 10 dias de cultivo (aumento de 200x)

B) Observam-se “clusters” de células de diversos tamanhos circundadas por células mais alongadas com morfologia semelhante a fibroblastos (setas) (aumento de 100x).

Figura 25. Imunofluorescência da cultura de células do insulinoma GLS, na quarta passagem, marcadas com anticorpo anti-insulina humano.

A e B) Observou-se que as células tinham um aspecto mais alongado, semelhante a fibroblastos, porém mostraram marcação positiva para insulina.

Figura 26. Gráficos representando a curva de crescimento da cultura de células do insulinoma GLS.

- A) Gráfico obtido pelo programa Prism versão 3.03, mostrando a curva de crescimento do insulinoma GLS.
- B) Gráfico mostrando a curva de regressão não linear, em que o tempo de dobramento foi calculado no período entre 0 e 2 (48 h) dias.

4.4.2. Caracterização da cultura do insulinoma GLS quanto ao seu caráter tumorigênico

A tumorigenicidade de um tipo celular é demonstrada pela capacidade destas células de crescer em substrato semi-sólido e de gerar tumores quando transplantadas *in vivo* como um xenotransplante em um animal imunodeprimido ou implantadas em um hospedeiro isógeno.

Para isto, foi feito o ensaio de cultivo em meio semi-sólido, onde foi analisada a capacidade das células de crescer em suspensão de agarose, observando-se a formação de colônias. Após dez dias de cultivo em meio semi-sólido, houve formação de colônias de diversos tamanhos (Fig. 27), mostrando o potencial tumorigênico desta cultura.

Para o ensaio *in vivo* (em camundongos), células do insulinoma GLS humano (1×10^6 células) na oitava passagem (62 dias de cultivo) foram injetadas, por via subcutânea, em quatro camundongos atímicos "nude", analisando-se a cada três dias o crescimento do tumor e a glicemia do camundongo. Como controle, foi injetada solução salina em um camundongo.

O gráfico apresentado na figura 28A mostra uma comparação entre o volume do tumor e o nível glicêmico de um dos camundongos escolhido como exemplo, em diversos dias após o transplante. Observou-se o aparecimento do tumor a partir do dia 42 após o transplante, sendo que, concomitante ao crescimento deste, houve uma diminuição da glicemia do camundongo, levando-o ao óbito no dia 87. O gráfico 28B mostra que o camundongo controle permaneceu normoglicêmico (70-120 mg/dl) durante todo o período analisado. Todos os camundongos transplantados seguiram o mesmo comportamento exemplificado acima.

Estes dados mostram que apesar da cultura utilizada para a injeção nos camundongos estar na oitava passagem e não ter sido detectada secreção de insulina *in vitro*, as células foram capazes de

formar tumor e provocar hipoglicemia nos animais, confirmando tratar-se de uma cultura que ainda apresenta características de um insulinoma.

Posteriormente, os tumores foram dissecados e fixados para imunohistoquímica, assim como, outros órgãos, como: o fígado, baço e pulmão, para observar a eventual formação de metástases. A figura 29 mostra marcação para insulina (marrom) em todas as células do corte histológico do tumor, confirmando tratar-se de um insulinoma. Não houve marcação para glucagon nestas células e também não foi possível detectar a presença de metástases nos órgãos analisados.

Figura 27. Crescimento das células do insulinoma GLS em suspensão de agarose. A e B) Foi observada a formação de colônias celulares de diversos tamanhos em substrato semi-sólido (Aumento de 10X).

Figura 28. Gráficos mostrando a relação entre o crescimento do tumor e o nível glicêmico em camundongos "nude" injetados com células provenientes da cultura do insulinoma GLS na passagem 8.

- A) Nível glicêmico do camundongo controle (injetado com solução salina)
- B) Volume do tumor em função da glicemia do camundongo injetado com as células do insulinoma GLS.

Figura 29. Imunohistoquímica para insulina humana de um corte de tecido proveniente do tumor retirado do camundongo “nude”.

A marcação na cor castanha mostra as células positivas para insulina.

4.4.3. Estudo da atividade proliferativa da cultura do insulinoma GLS frente a estímulos com mitógenos

O papel dos fatores de crescimento e seus receptores na biologia tumoral está bem documentado (Tahara et al., 1996, Nilsson et al., 1993, Friess et al., 1996 e Wang et al., 1997). Apesar disso, o controle do crescimento de tumores gastrointestinais neuroendócrinos ainda é muito pouco compreendido (Wulbrand et al., 1998).

Em função disto, o objetivo deste experimento foi analisar os fatores de crescimento que estão envolvidos na proliferação da cultura proveniente do insulinoma GLS.

Primeiramente, foi realizada uma curva dose-resposta de soro, para verificar a concentração mínima necessária para a sobrevivência das células e que não interferisse na atividade dos fatores de crescimento. Para tanto, as células foram incubadas com as concentrações de 10, 1, 0,5, 0,1 e 0% de soro fetal bovino por 48h (Figura 30). Foi observado que não houve uma alteração significativa no crescimento das células nestas das concentrações, porém observou-se uma alteração morfológica nas células que foram mantidas na ausência de soro. Optou-se, então, pela utilização da concentração de 0,1% de soro para os experimentos seguintes.

Nos próximos ensaios, as células foram mantidas com fatores de crescimento por 48 h e posteriormente, foi realizada a contagem destas.

O gráfico apresentado na figura 31 mostra o comportamento das células frente ao tratamento com diversas concentrações de EGF (Epidermal Growth Factor). Este fator está envolvido, principalmente na proliferação de células de origem mesodérmica e ectodérmica, particularmente fibroblastos e queratinócitos. Após

48h de estímulo, não houve um crescimento significativo das células nestas concentrações de EGF.

Outro fator de crescimento testado foi o IGF-I (Insulin-Like Growth Factor-I), que é um fator estruturalmente relacionado à insulina, envolvido na proliferação de diversos tipos celulares (Wulbrand et al., 2000).

No presente trabalho, foi observado um crescimento significativo das células estimuladas com 20 e 200 ng/ul de IGF-I ($P < 0,01$ e $P < 0,05$, respectivamente), quando comparadas com o controle (células cultivadas somente em meio de cultura com 0,1% de SFB) (Fig.32). Outro fator utilizado foi a prolactina, um hormônio conhecido pelo envolvimento na proliferação, principalmente de células beta pancreáticas, células mamárias e do sistema imune.

A prolactina utilizada foi uma prolactina recombinante produzida em nosso laboratório (Pereira et al., 2001), em células de inseto, através do sistema de expressão de baculovírus.

Foi observado um crescimento significativo das células tratadas com 100 ng/ul de prolactina quando comparado com o controle (células tratadas com o sobrenadante da cultura de células de inseto infectadas com o baculovírus selvagem) (Fig.33).

Concentrações maiores de IGF e Prolactina não causaram morte celular ou um efeito proliferativo mais pronunciado.

As significâncias das diferenças na contagem das células foram analisadas por "one-way ANOVA" e o teste de "Tuckey" utilizando o programa PRISM versão 3.03.

Figura 30. Curva dose-resposta para soro da cultura de células do insulinoma GLS.

Gráfico de barras mostrando a contagem de células do insulinoma GLS após incubação com meio de cultura CMRL suplementado com 10; 1; 0,5; 0,1% e sem suplementação de soro por 48h.

Todos os tratamentos foram realizados em triplicata.

Figura 31. Efeito do fator de crescimento EGF (Epidermal Growth fator) na proliferação de células do insulinoma GLS.

Gráfico de barras demonstrando a contagem de células do insulinoma após o tratamento com 0,2, 2, 20, 200 e 2000 ng/ml de EGF em meio de cultura suplementado com 0,1% de SFB por 48h. Todos os tratamentos foram feitos em triplicata.

Figura 32. Efeito do fator de crescimento IGF-I (Insulin-like Growth factor) na proliferação de células do insulinoma GLS.

Gráfico de barras demonstrando a contagem de células do insulinoma após o tratamento com 2, 20, 200 ng/ul de IGF-I em meio de cultura suplementado com 0,1% de SFB por 48h. Todos os tratamentos foram feitos em triplicata.

** $P < 0,01$

* $P < 0,05$

Figura 33. Efeito do hormônio Prolactina humana recombinante (rhPRL) na proliferação de células do insulinoma GLS.

Gráfico de barras demonstrando a contagem de células do insulinoma após o tratamento com 20 e 100 ng/ml de Prolactina em meio de cultura contendo 0,1% de SFB. Todos os tratamentos foram feitos em triplicata.

** $P < 0,01$

5. DISCUSSÃO

O desenvolvimento do câncer é um processo multi-estágios, que resulta no acúmulo de diversas lesões genéticas que são necessárias para a completa expressão do fenótipo maligno. Para células normais levarem à formação de tumores invasivos, elas devem adquirir propriedades como auto-suficiência quanto aos sinais de crescimento, supressão da apoptose, potencial de replicação ilimitado, angiogênese sustentada, invasão de tecido e metástase, os quais podem ser característicos de todos os cânceres humanos (Hanahan & Weinberg, 2000).

Para a maioria dos cânceres humanos, a identidade das alterações responsáveis pela iniciação e progressão da tumorigênese permanece desconhecida.

A caracterização das mudanças na expressão gênica e ativação de vias celulares que contribuem para a carcinogênese do pâncreas endócrino pode identificar marcadores para um diagnóstico precoce, facilitar uma classificação prognóstica mais acurada dos tumores neuroendócrinos pancreáticos, e levar à descoberta de novos alvos moleculares para terapia (Maitra et al., 2003). Em função disto, no presente trabalho foi realizada uma análise global da expressão gênica de insulinomas benignos, comparada com amostras altamente enriquecidas de ilhotas pancreáticas humanas normais. Esta análise foi abordada experimentalmente através da construção de bibliotecas subtraídas baseadas em PCR, como a "Representational Difference Analysis" (RDA) e; "Microarrays" (plataforma CodeLink), onde foram analisados aproximadamente 20.000 transcritos humanos.

Uma característica particular que reforça este estudo foi a utilização de ilhotas pancreáticas humanas isoladas como controle de células beta normais, ao invés de utilizar o pâncreas total, que

contém menos de 2% de ilhotas pancreáticas. Esta abordagem permitiu uma comparação mais cuidadosa das células endócrinas neoplásicas com seu correlativo normal, ao invés de um excesso de tecido não endócrino, descrito na maior parte dos artigos publicados.

5.1. Construção da biblioteca de RDA

As técnicas de hibridização subtrativa baseadas em PCR, apesar de serem amplamente utilizadas, não foram eficientes para as nossas amostras, pois além do alto número de moléculas "background" geradas, obteve-se, também, diversos clones quiméricos. Além do RDA, foram realizadas, anteriormente, diversas tentativas utilizando outras técnicas de subtração como, o SSH ("Suppressive Subtraction Hybridization") (Gurskaya et al., 1996) e o MOS ("Mirror Orientation Selection") (Rebrikov et al., 2000), porém o resultado também não foi satisfatório.

A razão mais provável para este problema se deve à dificuldade em se trabalhar com RNA de origem pancreática. Por ser um órgão rico em RNases, o pâncreas torna o processo de extração de um RNA de boa qualidade muito difícil, o que ocasionaria perda de transcritos na preparação dos cDNAs. Outro problema é a dificuldade em tratar os RNAs com DNase I, para eliminar qualquer contaminação por DNA genômico presente nesta amostra. Como o tratamento com esta enzima ocorre em uma temperatura de 37⁰C e esta é a temperatura ótima para a ação das RNases, o RNA acaba sendo degradado e como estas técnicas de subtração se baseiam em amplificações por PCR, ocorre uma alta amplificação do DNA genômico, gerando uma alta incidência de clones falso positivos.

Outro problema observado, foi a hibridização das membranas de nylon contendo os cDNAs subtraídos das bibliotecas dos tumores e ilhotas normais onde não houve uma diferença significativa de

intensidade de marcação entre os *spots*. Este fato provavelmente se deve ao grande número de clones quiméricos formados durante a clonagem, o que levaria a uma somatória dos sinais de hibridização de todas as sondas presentes naquele clone. Esta alta taxa de quiméricos seria devido à metodologia utilizada para tentar aumentar a eficiência de clonagem, com as mesmas condições de temperatura para anelamento utilizada para a ligação dos adaptadores, o que provavelmente levou a um grande número de concatâmeros de diversos clones.

A construção da biblioteca subtrativa permitiu isolar 17 sequências potencialmente diferencialmente expressas nos insulinomas, porém somente um gene confirmou ser super-expresso no tumor, o cDNA FLJ13072. Três genes isolados na biblioteca de insulinoma benigno (HTCF4, Serpina3 e FLJ14937), confirmaram sua expressão diferencial na amostra de ilhotas pancreáticas normais.

Desta forma, optou-se por empregar outra metodologia de análise para a identificação de genes diferencialmente expressos, a plataforma de *bioarrays* CodeLink (GE Healthcare).

5.2. Plataforma de “Bioarrays” CodeLink

A plataforma *CodeLink UniSet Human II Bioarrays* (GE Healthcare) é constituída por 20.000 oligonucleotídeos derivados de genes depositados no GenBank, RefSeq e UniGene até o final do ano de 2002. Cada oligonucleotídeo possui 30 bases, sendo desenhado de forma a ser específico para o gene analisado (Ramakrishnan et al., 2002).

Uma das vantagens do CodeLink é que cada lâmina é recoberta por uma matriz em gel, onde são aplicadas as sondas de oligonucleotídeos com 30 bases. Esta matriz gelificada tridimensional fornece um ambiente aquoso que permite que o oligonucleotídeo se mantenha distante da superfície da lâmina

forneendo o máximo de interação entre o oligonucleotídeo aplicado e o RNA marcado. Isto resulta em uma maior especificidade do oligo e maior sensibilidade do array. Outra vantagem é que nas técnicas de "microarrays" convencionais é utilizada uma marcação com dois fluoróforos diferentes (Cy3 e Cy5), sendo que cada fluoróforo possui uma eficiência de incorporação diferente. Com o objetivo de contornar este problema, no CodeLink, são hibridizadas duas lâminas utilizando somente um fluoróforo (Cy5) para a marcação dos RNAs.

Através da plataforma de *bioarrays* CodeLink, foram identificados 397 genes super-expressos em insulinomas benignos, quando comparados a ilhotas normais. Porém foram escolhidos 6 genes para validação por REAL-TIME PCR. Utilizou-se como critério para a escolha dos genes, o alto nível de indução nas amostras de insulinomas, genes com função ainda não totalmente caracterizada e o interesse do laboratório.

A validação dos candidatos a genes diferencialmente expressos clonados nas bibliotecas de RDA foi feita através de RT-PCR utilizando-se GAPDH como controle interno, uma vez que este "housekeeping gene" tem sido utilizado, em inúmeros trabalhos, como referência de gene cuja expressão se mantém constante. Entretanto, a análise dos dados resultantes da hibridização dos "bioarrays" evidenciou que, apesar do controle interno de GAPDH ter sido validado para diversos tipos de amostras e tecidos, no nosso caso em especial, ele apresentou maior expressão na amostra de insulinoma, quando comparado com a amostra de ilhota total normal. A partir deste ponto, passamos a utilizar, como controle interno, o gene HPRT (hipoxantina fosforibosil transferase) que, além de ser também um outro "housekeeping gene" também bastante utilizado, se mostrou, nos "arrays", como não diferencialmente expresso entre as amostras utilizadas. Contudo, esta diferença entre os dois tipos de controle provavelmente não

deve provocar mudanças significativas na interpretação dos dados, uma vez que aqueles genes cuja expressão diferencial foi validada utilizando GAPDH, também continuam o sendo quando uma nova normalização é feita utilizando-se HPRT.

5.3. Genes super-expressos nos insulinomas

5.3.1. STAT4

Proteínas da família das STATs ("Signal Transducers and Activators of Transcription") , compreendem um grupo de fatores de transcrição citoplasmáticos que, uma vez ativadas por citocinas, fatores de crescimento e hormônios, participam de eventos celulares normais, tais como, diferenciação, proliferação, processos anti-apoptóticos, apoptose e angiogênese (Darnell, 1997; Horvath, 2000). Porém, STATs constitutivamente ativadas, tem sido observadas em um número considerável de linhagens celulares de câncer humano e em tumores primários. Embora as STATs não estejam diretamente envolvidas na regulação do ciclo celular e no reparo a danos ao DNA, elas participam na tumorigênese por meio da desregulação das vias de sinalização das quais fazem parte (Bowman et al., 2000; Bowman & Jove, 1999).

As STATs são ativadas por fosforilações consecutivas em resíduos de tirosina e serina que possibilitam a dimerização, translocação nuclear e o reconhecimento dos sítios específicos nos promotores dos genes cuja transcrição regulam (Bromberg & Darnell, 2000). Receptores de membrana que não possuem uma atividade enzimática intrínseca, tais como receptores de citocinas, sinalizam via STAT por meio de proteínas da família das "Janus Tyrosine Kinase" (JAK), com as quais estão constitutivamente associados (Briscole et al., 1996; Schindler, 2002; Takeda & Akira, 2000).

Os genes das STATs humanas foram identificados em três clusters cromossômicos: STAT 1 e 4 no cromossomo 2, STAT 2 e 6 no cromossomo 12 e STAT3 e 5 a e b, no cromossomo 17 (Ihle, 2001). Apesar das diferenças funcionais entre as diferentes STATs, estudos cristalográficos e de comparação de seqüências protéicas revelam domínios estruturais comuns entre elas (Becker et al., 1998; Chen et al., 1998).

As proteínas STATs podem ser divididas em dois grupos segundo sua função específica (Calo et al., 2003). No primeiro grupo, estão incluídas as STATs 2, 4 e 6 as quais são ativadas por um pequeno grupo de citocinas, estando envolvidas no desenvolvimento de células T e na sinalização por Interferon gamma. O outro grupo inclui as STATs 1, 3 e 5 as quais são ativadas em diferentes tecidos por uma série de ligantes, estando envolvidas na sinalização por Interferon, no desenvolvimento da glândula mamária e na resposta a prolactina e ao hormônio de crescimento e na embriogênese. Este último grupo tem um papel importante no controle da progressão do ciclo celular e na apoptose, contribuindo, portanto, para a oncogênese (Bromberg, 2002).

A ativação constitutiva de diferentes STATs tem sido observada em um grande número de linhagens celulares e tumores primários incluindo, leucemias, linfomas, mieloma múltiplo, tumores de cabeça e pescoço, cérebro, mama, pulmão, pâncreas e próstata (Bowman et al., 2000; Bowman & Jove, 1999; Bowman et al., 1999; Bromberg, 2002; Coffey et al., 2000; Garcia et al., 2001; Huang et al., 2000; Lin et al., 2000; Schaefer et al., 2002; Song & Grandis, 2000). Esta ativação das STATs pode ser desencadeada pela expressão de proteínas de fusão que levam à uma ativação persistente de proteínas com atividade tirosina-quinase, como JAK2, receptor de PDGF ou ABL (Lin et al., 2000; Shuai et al., 1996).

O crescente envolvimento das STATs na oncogênese humana, está abrindo novas possibilidades em relação ao estudo e

identificação de novos alvos moleculares para o desenvolvimento de futuras terapias para o câncer. Embora não tenha uma ação direta no desenvolvimento do tumor, o fato de estarem no centro da sinalização via tirosina-quinase implica que as STATs possuem um importante papel na promoção do ciclo celular, na inibição da apoptose e, conseqüentemente, na progressão tumoral (Bowman et al., 2000).

No presente trabalho, foi observado que somente STAT4 estava super-expressa nas amostras tumorais (7X). Este resultado nos levou a investigar a expressão de genes envolvidos no mecanismo de ativação das STATs, as vias de sinalização derivadas desta ativação e os mecanismos que influenciam sua atividade. Como mencionado anteriormente, as STATs são ativadas por citocinas, fatores de crescimento e hormônios. Neste trabalho foi observada a super-expressão de citocinas, como um membro da família de Interleucinas: IL17 (5,5X) e um receptor de interleucina, "Interleukin 2 receptor gamma" (3,2X). Entre os receptores de fatores de crescimento descritos como ativadores das proteínas STATs, verificou-se que o CSF-1R (Colony-stimulating factor receptor 1) (Catlett-Falcone et al., 1999), que possui uma atividade intrínseca tirosina-quinase, está super-expresso 7X nos tumores. As proteínas STATs, também podem ser ativadas pelo não-receptor tyrosine kinase SRC (Turkson et al., 1998), o qual foi induzido 16X nas amostras tumorais. Outro exemplo de estímulo tumorigênico conhecido por ativar as STATs é o grupo de receptores transmembranas de sete passagens (serpentina) (Williams, 1999). Foi observado que o receptor de serotonina (HTR2B) mostrou super-expressão de 4,6X nos insulinomas. Finalmente, este mesmo trabalho descreve que o Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGFB) estava induzido 3,4X, de acordo com estudos sugerindo a participação das proteínas STATs em oncogênese através da super-regulação de indutores de angiogênese (Niu et al.,

2002). Apesar do conhecido envolvimento das proteínas da família das STATs em tumorigênese, estes resultados mostram pela primeira vez o envolvimento de STAT4 em tumores e sugerem que esta proteína e os componentes de sua via de sinalização podem ter um importante papel na proliferação dos insulinomas.

5.3.2. PRSS11

Os Fatores de Crescimento similares à Insulina (IGFs), seus receptores correspondentes e suas proteínas ligantes são importantes na carcinogênese para diversos tumores, porém seu padrão de expressão nos tumores neuroendócrinos do trato gastroenteropancreático ainda é muito pouco conhecido (Wulbrand et al., 2000). IGF-1 e seus receptores são membros do chamado sistema IGF que contém 3 ligantes (insulina, IGF-1 e IGF-2), 3 receptores (receptor de insulina e receptores do tipo I e II de IGF (IGF-1R e IGF-2R)), 10 proteínas ligantes de IGF (IGFBP-1 a IGFBP-10) e diversas proteases que clivam as IGFBPs (Jones & Clemmons, 1995; Oh et al., 1996). Os efeitos de IGF-1 e IGF-2, são mediados pela ligação à seus receptores (Brogi et al., 1994). Enquanto que a insulina está envolvida no controle da homeostase metabólica, IGF-1 e IGF-2 são essenciais para o crescimento normal e desenvolvimento (Wulbrand et al., 2000). O distúrbio deste balanço regulatório pode levar à formação e progressão de tumores.

Um gene candidato a ser um componente do sistema de sinalização de IGF, identificado como sendo super-expresso nos insulinomas, foi o PRSS11 (Serina protease 11). Esta proteína possui uma alta similaridade de seqüência (58%) com a família Htra de serinas proteases de bactéria (Lipinska et al., 1988). Ela é sintetizada em uma forma precursora, com um típico peptídeo sinal, sugerindo sua função como uma enzima proteolítica após a secreção. Ao contrário das proteases bacterianas relacionadas, a proteína humana contém um domínio, na sua região N-terminal,

que mostra uma similaridade de seqüência com o domínio conservado de ligação ao IGF, que é conservado em todos os membros da família de IGFBP, levando a se especular que PRSS11 pode representar uma das proteases específicas para IGFBPs (Parker et al., 1995) ou mesmo para o próprio IGF que é sintetizado como uma pró-enzima e ativado por clivagem proteolítica.

O cDNA correspondente a PRSS11 foi primeiramente isolado de uma biblioteca de cDNA subtraída construída durante uma procura sistemática para genes reprimidos após transformação oncogênica em fibroblastos transformados com SV40 (Schenker et al., 1994). PRSS11 foi expresso na maioria dos tecidos humanos, porém sua síntese foi completamente inibida em fibroblastos transformados por SV40 e em diversas linhagens celulares tumorais (Zumbrunn & Trueb, 1997). Estudos mais recentes mostraram a repressão deste gene em câncer de ovário e durante a progressão em melanomas humanos (Baldi et al., 2002; Chien et al., 2004).

Contradizendo estes dados, o presente trabalho mostrou a indução do gene PRSS11 nas amostras analisadas dos insulinomas benignos, sugerindo que, provavelmente, o papel deste gene seria tecido-específico, necessitando de uma abordagem mais ampla que possibilitará o entendimento da sua função biológica no desenvolvimento dos insulinomas.

5.3.3. ASCL1

Proteínas hélice-alça-hélice básicas (bHLH) fazem parte de diversas famílias de reguladores transcricionais envolvidas no desenvolvimento fetal e câncer (Ledent et al., 2002).

Existem pelo menos 125 proteínas bHLH humanas reconhecidas que podem ser subdivididas em 45 famílias. Dentre estas famílias encontra-se a "achaete-scute homologs", as proteínas E, atonal, NeuroD, neurogenin, proteínas Id, HES (hairy-enhancer of split), proteínas relacionadas a Hes e outras (Ledent et al., 2002).

A maioria das proteínas bHLH ativa a transcrição, agindo de uma maneira tecido-específica nos motivos de reconhecimento E box no DNA, contendo uma seqüência central CANNTG. As proteínas bHLH tecido-específicas heterodimerizam com membros da família de proteínas E, como E12, E427, E2-2 e HEB. Estes dímeros ligados ao DNA recrutam co-ativadores transcrpcionais tais como p300 e pCAF, promovendo acetilação de histonas e assim, ativação transcricional (Sartorelli et al., 1999).

Durante a progressão tumoral, estes genes bhlh são ativados em um padrão refletindo seu programa de desenvolvimento, porém em uma situação fora do contexto embrionário normal. Esta expressão aberrante inicia ou mantém uma cascata de diferenciação, a qual pode levar ao estabelecimento de fenótipos agressivos (Ball, 2004).

A expressão de ASCL1 está extremamente aumentada em câncer de pulmão com características neuroendócrinas, especialmente carcinoma de células pequenas de pulmão, a forma mais letal de câncer de pulmão. Além disso, carcinoma de células não-pequenas de pulmão e carcinóide brônquico mostraram expressão de ASCL1 correlacionada com características neuroendócrinas. A perda de características neuroendócrinas está correlacionada com a perda da expressão de ASCL1, o qual mostra que a expressão constitutiva de ASCL1 é obrigatória para a manutenção do fenótipo neuroendócrino (Soderholm et al., 1999).

Além dos tumores de pulmão outros carcinomas com características neuroendócrinas apresentaram super-expressão do gene ASCL1, como tumores carcinóides do intestino anterior e intestino médio, em linhagens celulares de carcinoma pancreático (Nakamura & Ball, submetido) e recentemente Hu e colaboradores mostraram altos níveis de expressão de ASCL1 em modelos de carcinomas neuroendócrinos de próstata em camundongos (Hu et al., 2002).

No entanto, Chen et al., 1997 mostraram a perda de expressão do gene ASCL1 em adenocarcinomas pancreáticos, gastrinomas, tumores de ilhotas pancreáticas e adenomas de paratireóide. No presente trabalho foi observado a super-expressão do gene ASCL1 nos insulinomas, sugerindo um possível papel no processo tumorigênico destes tumores.

5.3.4. ECRG4

O gene "Esophageal Squamous Cell Carcinoma" (ECRG4) é um gene recentemente identificado como um candidato a um gene supressor de tumor. Este gene encontra-se localizado no cromossomo 2q14.1-14.3, sendo formado por 4 exons, estendendo-se por 13 kb e possuindo um mRNA completo de 772 pb. Análises por bioinformática mostraram que a proteína codificada por ECRG4 possui uma homologia de 31% com a região de IgG V de camundongo. Resultados de SAGE e de detecção por RT-PCR, mostraram que o gene ECRG4 está expresso no epitélio esofágico normal de adultos, porém apresentou-se reprimido em carcinomas de células escamosas de esôfago e em linhagens de células tumorais, sugerindo o envolvimento do gene ECRG4 no desenvolvimento dos tumores de células escamosas do esôfago (Bi et al., 2001). (Yue et al., 2003) demonstraram um processo de metilação aberrante das Ilhas CpG no promotor central do gene ECRG4, sugerindo que a perda ou baixa expressão deste gene estaria associada à esta alteração epigenética do gene.

Apesar do gene ECRG4 ter sido primeiramente descrito como um candidato a supressor de tumor nos tumores de células escamosas esofágicas, no presente trabalho, demonstramos a super-expressão deste gene nos insulinomas analisados, sugerindo um possível papel alternativo deste gene nestes tumores. Ensaios de super-expressão ou de inibição deste gene, através da técnica de Interferência de RNA, nas culturas celulares derivadas dos

insulinomas, poderão mostrar se ele possui influência na proliferação celular destes tumores, bem como contribuir para o entendimento de sua função biológica.

5.3.5. SPARCL1

SPARCL1 (também conhecida como Hevin, SC1, MAST9 e ECM2) é uma glicoproteína da matriz extracelular secretada pertencente à família das SPARC ('Secreted protein acidic and rich in cysteine').

SPARCL1 é uma proteína de 650 aminoácidos, que possui um peso molecular de 71 kDa (Hambrock et al., 2003) e é modificada pós-traducionalmente por glicosilação. Esta proteína contém três domínios principais: 1) um domínio ácido N-terminal conservado na família SPARC com uma estrutura ainda não perfeitamente caracterizada, porém altamente sensível à interação com Ca^{2+} ; 2) Um domínio semelhante a Folistatina que apresenta homologia de 56% com a proteína SPARC (Bradshaw & Sage, 2001), e é homólogo a um domínio repetido na folistatina, proteína que inibe diversos membros da super-família de TGF-beta. Os resíduos 440 a 495 deste módulo, assemelham-se a um inibidor serina protease da família Kazal, enquanto que a região N-terminal deste módulo é similar ao "b-hairpin" do EGF (Fator de crescimento epidérmico) (Hohenester et al., 1996). O domínio de folistatina contém a maioria dos resíduos de cisteína da proteína, com duas regiões de alta afinidade a Cu^{2+} . Estas regiões ligantes de Cu^{2+} parecem regular a proliferação celular de células endoteliais e angiogênese. Outros peptídeos deste domínio abolem adesões focais e inibem o ciclo celular (Motamed et al., 2002)., 2002); 3) um domínio extracelular ligante de Ca^{2+} , altamente conservado e único dentro da família SPARC, apresentando 61% de identidade entre SPARC e SPARCL1 (Sage et al., 2003), que se liga às células, inibindo

espalhamento e proliferação celular, e reverte a formação de adesão celular (Brekken & Sage, 2000).

A expressão de SPARCL1 foi descrita no adulto, sendo localizada, em particular, em células neuronais e da glia no cérebro (Mendis et al., 1994; Mendis et al., 1996) e em vênulas endoteliais. Sua associação com fibras de colágeno do tipo I, indica um potencial papel como componente modificador da matriz extracelular (Hambrock et al., 2003).

SPARCL1 é freqüentemente descrita como sendo um antagonista de adesão celular, porque inibe a ligação e o espalhamento de células endoteliais em substratos de fibronectina e reduz a formação de adesão focal por células endoteliais (Girard & Springer, 1995). Como resultado desta atividade anti-aderente, sugere-se que SPARCL1 module a migração celular, influenciando a metástase através da regulação da adesão celular.

Apesar da sua influência em migração celular, a produção de SPARCL1 aparece diminuída em diversos tumores, sugerindo que esta proteína seja um regulador negativo da proliferação, inibindo o ciclo celular em células HeLa (Bendik et al., 1998; Claeskens et al., 2000). Um fator de especulação poderia ser a fonte de SPARCL1 (células tumorais ou do estroma) e suas células-alvo no microambiente do tumor. Em carcinomas coloretais, por exemplo, SPARCL1 é um marcador endotelial super-expresso, o que tem levado alguns autores a sugerir um papel como agente pró-angiogênico (St Croix et al., 2000).

A base molecular para a capacidade de SPARCL1 de mediar interações célula-matriz e sinalização e toda sua versatilidade ainda permanece uma incógnita. Um possível modelo, baseado na interação de SPARCL1 com diferentes receptores e sua indução a um estágio de adesão intermediário (Murphy-Ullrich, 2001), uma situação típica de proteínas matricelular, está mostrado na figura 34. Neste esquema, a interação de SPARCL1 com receptores

celulares resulta na mediação de interações matriz/célula para uma função específica.

Surpreendentemente, SPARCL1 apresentou-se super-expresso nas amostras dos insulinomas benignos, sugerindo que, possivelmente, a interação desta proteína com fatores de crescimento próprios das células dos insulinomas, poderiam levar a um papel específico nestes tumores. O fato deste gene estar super-expresso em todos os tumores analisados, nos incentiva a aprofundar os estudos quanto ao seu papel molecular, com o objetivo de caracterizar um possível marcador para o insulinoma.

Figura 34. Proteínas matricelulares induzem um estágio de adesão intermediário (Murphy-Ullrich, 2001). Esquema hipotético para a interação de SPARCL1 com receptores da superfície celular afetando adesão, proliferação, e produção de matriz extracelular. SPARCL1 parece interagir com um (ou mais) dos quatro receptores/parceiros de ligação, levando à indução de um estágio intermediário de adesão. Consequências dessa interação estão listadas com sua cor correspondente. Figura adaptada do artigo de Sullivan et al., 2004

5.3.6. FLJ13072

O clone FLJ13072 corresponde a um novo gene ainda não caracterizado. A sequência protéica putativa deste gene apresenta um domínio conservado de helicase DEAD/DEAH.

Estudos em eucariotos e procariotos mostram que as helicases estão envolvidas em replicação, recombinação e reparo do DNA; na transcrição, tradução e *splicing* do RNA; e na

diferenciação, sugerindo que sua função seja crítica para o crescimento normal, desenvolvimento e, em alguns casos, para a sobrevivência (Altmann & Trachsel, 1993; Matson & Kaiser-Rogers, 1990). Estas moléculas estão envolvidas no desenrolamento do DNA dupla-fita e do RNA associadas à hidrólise dos nucleotídeos 5'-trifosfato. Algumas helicases possuem função dupla, como o gene humano ERCC2, que participa no reparo e transcrição (Schaeffer et al., 1994). Mutações em helicases do tipo *bona fide* resultam em defeitos em diversas funções celulares, tendo sido identificadas em *Xeroderma pigmentosum* (XP) (Naumovski & Friedberg, 1987) e síndrome de Cockayne (Lombard & Guarente, 1996). XP é caracterizada pela sensibilidade à radiações UV e por um aumento de freqüência em câncer de pele (Ellis et al., 1995).

As proteínas helicases são definidas por diversos motivos conservados, sendo que todos parecem ser necessários para suas funções (Pause et al., 1993; Pause & Sonenberg, 1992). Os domínios de ligação a nucleotídeos trifosfatos, codificados pelos Box A e B, estão presentes em todas helicases (Walker et al., 1982). O box B tem sido utilizado para definir sub-famílias de helicases, tais como a família de helicases DEAD e DEAH.

A função do gene FLJ13072 pode estar ligada à proliferação celular dos insulinomas. Esta hipótese pode ser corroborada pelo fato das proteínas da família de helicases DEAD/DEAH, como a proteína humana CHLR, apresentaram-se super-expressas em células em proliferação e em diversas linhagens celulares, sendo que linhagens com um menor tempo de replicação, apresentaram um maior nível da proteína CHLR (Amann et al., 1997).

5.4. Estabelecimento e caracterização de culturas primárias e precoces de insulinomas humanos

Uma das dificuldades encontradas neste trabalho foi a falta de linhagens celulares de células beta humanas. Por esta razão, um

dos objetivos propostos, foi o estabelecimento de culturas primárias e precoces de ilhotas pancreáticas humanas visando a utilização como modelos celulares para futuros estudos funcionais dos genes identificados.

Linhagens celulares de insulinomas animais como RINm5F (Gylfe & Hellman, 1986; Meglasson et al., 1986; Trautmann & Wollheim, 1987), Ins-1 (Frodin et al., 1995; Verspohl et al., 1995) ou HIT (Hill et al., 1987; Meglasson et al., 1986) são amplamente utilizadas em estudos de mecanismos fisiológicos e patofisiológicos envolvidos em metabolismo de glicose e no estabelecimento de modelos *in vitro* para o estudo de células beta pancreáticas. Numerosas tentativas foram feitas para se obter espontaneamente uma linhagem celular estável de insulinoma, porém com pouco sucesso, sendo que somente alguns poucos estudos mostram o uso destas linhagens celulares (Chick et al., 1973; Thivolet et al., 1988). Os tumores de células beta desdiferenciam muito rapidamente *in vitro* e perdem sua capacidade de sintetizar e secretar insulina (Poitout et al., 1996). Linhagens celulares de insulinomas humanos raramente são utilizadas em razão da dificuldade na obtenção e no cultivo por longos períodos (Baroni et al., 1999).

No presente trabalho, obtivemos culturas primárias de insulinomas e culturas precoces alcançando até a 11ª passagem.

Apesar do insulinoma ter sido diagnosticado como um carcinoma neuroendócrino de grau I (pouco diferenciado) (tabela 1), no presente trabalho, observou-se a formação de colônias quando as células foram cultivadas em substrato semi-sólido e a formação de tumor quando injetadas em camundongos *nude*, o que demonstra o alto grau tumorigênico desta cultura. Este fato mostra a dificuldade em se alcançar um diagnóstico acurado destes tumores através dos métodos utilizados atualmente, conforme citado no item INTRODUÇÃO.

Mesmo que a insulina tenha sido detectada nas culturas do insulinoma GLS por imunofluorescência, as células acabaram perdendo a capacidade de secreção de insulina *in vitro*. Porém, quando estas células foram injetadas por via subcutânea em camundongos *nude*, promoveram o crescimento de tumor e re-adquiriram a capacidade de secreção de insulina, tornando os camundongos hipoglicêmicos.

Corroborando estes dados, (Halban et al., 1987) mostraram que o rompimento do contato normal célula-célula está associado a uma secreção prejudicada de insulina em células beta normais, enquanto que a preservação ou o re-establishimento dos contatos intercelulares, estão associados com uma função normal. Weir e colaboradores também mostraram, em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos, que a adesão célula-célula regula a secreção hormonal das células beta (Weir et al., 1984). Recentemente, células beta de ratos apresentaram a capacidade de se fixar a uma matriz rica em laminina produzida por uma linhagem celular de carcinoma de rato (804G) e um aumento na resposta secretória a secretagogos foi observada (Bosco et al., 2000). Estes resultados demonstram que as interações célula-matriz podem melhorar a sensibilidade das células beta à glicose.

O papel dos fatores de crescimento e seus receptores na biologia tumoral está bem documentado (Friess et al., 1996; Tahara, 1994; Vergani et al., 1997; Wang et al., 1998)(Tahara et al., 1996, Nilsson et al., 1993, Friess et al., 1996 e Wang et al., 1997). Apesar disso, o controle do crescimento de tumores gastrointestinais neuroendócrinos ainda é muito pouco entendido (Wulbrand et al., 1998). Em função disto, neste trabalho, analisou-se a resposta proliferativa da cultura precoce do insulinoma GLS frente a diversos fatores de crescimento.

Um dos fatores testados foi o EGF (Epidermal Growth Factor). Este fator está envolvido, principalmente na proliferação de células

de origem mesodérmica e ectodérmica, particularmente fibroblastos e queratinócitos. Após 48h de estímulo, não houve um crescimento significativo das células em nenhuma das concentrações de EGF. Este fator de crescimento ativa a via de MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), a qual parece ser de menor importância para a proliferação de células beta (Hugl et al., 1998)(Hugl et al., 1998, 1999 e Dickson et al., 2001).

Outro fator utilizado foi o IGF-I (Insulin-Like Growth Factor-I), que é um fator estruturalmente relacionado à insulina e que foi capaz de induzir a proliferação de culturas de células do insulinoma. Enquanto a insulina está envolvida, principalmente, no controle da homeostase metabólica, IGF-I e IGF-II são essenciais para o crescimento normal e para o desenvolvimento celular (Baserga, 1997; Culig et al., 1996; Daughaday & Rotwein, 1989). O desequilíbrio desse balanço regulatório pode levar à formação do tumor e progressão. Por exemplo, IGF-I é 32 vezes mais expresso em amostras de câncer pancreático, quando comparado ao tecido pancreático normal (Bergmann et al., 1995). A importância de IGF-I na regulação do crescimento de tumores é apoiada, também, pelo fato de uma variedade de tumores humanos e linhagens celulares tumorais secretarem IGF-I e expressarem seu receptor, o que sugere uma estimulação autócrina de crescimento (Baserga et al., 1997).

As células do insulinoma também responderam ao estímulo com prolactina. A Prolactina é um hormônio conhecido por seu envolvimento na proliferação, principalmente, de células beta pancreáticas, células mamárias e do sistema imune. Este hormônio atua ativando a via das STATs, uma nova família de fatores de transcrição, transdutores de sinal e ativadores de transcrição (Nielsen & Billestrup, 1997). Amaral et al., 2003, mostraram, em ilhotas pancreáticas de ratos neonatos, que a prolactina pode estimular as vias de sinalização da IRSs/PI3-K e da SHC/ERK. Este

grupo foi capaz de mostrar a fosforilação do IRS-2 e sua associação com PI3-K induzida pelo tratamento com prolactina. Este hormônio induziu, também, a fosforilação da JAK2, SHC, ERK1 e 2, demonstrando, desta forma, que a prolactina pode ativar a via das MAPK.

No presente trabalho, observou-se o aumento da proliferação da cultura de células do insulinoma quando estimulada com IGF-I e Prolactina. Outros fatores de crescimento e inibidores das vias ativadas por eles precisam ser testados para se obter um painel de moléculas envolvidas na proliferação da cultura GLS e, futuramente, analisar quais os mecanismos de ativação destas vias.

Em resumo, estes resultados servem como um passo inicial para futuros estudos sobre a elucidação das vias de tumorigênese dos carcinomas neuroendócrinos pancreáticos, podendo permitir a identificação de novos alvos celulares para a terapia destes neoplasmas tão incomuns.

6. CONCLUSÕES

- Através da técnica de RDA, foram identificados 4 genes diferencialmente expressos, sendo que 3 em ilhotas normais, quando comparados ao insulinoma benigno: Serpina 3, HTCF-4 e a proteína hipotética FLJ14932, e somente a proteína FLJ13072 confirmou sua expressão diferencial nos insulinomas benignos.
- A expressão do gene FLJ13072 foi investigada em diversas linhagens celulares tumorais e normais, sendo expresso, em baixos níveis, somente em três linhagens celulares tumorais (carcinoma de célula B, de tireóide e de pulmão).
- Através do sistema CodeLink de *bioarrays*, foram obtidos 397 genes sendo super-expressos em níveis $\geq 2X$ insulinomas, quando comparados a ilhotas normais, sendo que 16% destes estão envolvidos em proliferação celular.
- Dentre os genes identificados pelo CodeLink como sendo super-expressos nos insulinomas, foram escolhidos seis para validação por REAL-TIME PCR, sendo que os genes SPARCL1 e PRSS11 mostraram-se super-expressos em todos os tumores benignos, e os genes STAT4, ECRG4, ASCL1 e IGFALS apresentaram-se super-expressos em 91, 82, 54 e 27% das amostras, respectivamente.
- As células do insulinoma GLS foram capazes de crescer "in vitro" com um tempo de dobramento de 23 horas.
- Apesar do insulinoma GLS ter sido diagnosticado, pelo anátomo-patológico, como sendo um tumor com baixo grau de malignidade, os experimentos de formação de tumor em camundongos "nude" e de crescimento em substrato semi-sólido mostrarem um alto grau de tumorigenicidade.
- Foi demonstrado que a cultura GLS responde a fatores de crescimento como o IGF-I, o qual tem sido identificado como

mitógeno em culturas primárias de células beta pancreáticas e a hormônios como a prolactina, sugerindo um papel deste hormônio na proliferação de células derivadas de insulinoma.

- Futura análise funcional dos genes identificados poderá permitir a construção de novas drogas anti-tumorais e/ou o desenho de estratégias alternativas de terapia gênica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amaral, MCE., Ueno, M., Carvalheira, JB., Carneiro, EM., Velloso, LA., Saad, MJA., Boschero, AC. (2003) Prolactin-Signal Transduction in neonatal rat pancreatic islets and interaction with the insulin-signaling pathway. **35**, 282-289.
- Ashcroft, F. M. & Ashcroft, S. J. H. (1992). The pancreatic β -cell: Editor's introduction. In: Ashcroft, F. M. & Ashcroft, S. J. H. (ed.), *Insulin: Molecular Biology to Pathology*, Oxford: Oxford University Press, pp. 3 – 4.
- Altmann, M. & Trachsel, H. (1993). Regulation of translation initiation and modulation of cellular physiology, *Trends Biochem Sci*, **18**, 429-32.
- Amann, J., Kidd, V.J. & Lahti, J.M. (1997). Characterization of putative human homologues of the yeast chromosome transmission fidelity gene, CHL1, *J Biol Chem*, **272**, 3823-32.
- Argetsinger, L.S., Hsu, G.W., Myers, M.G., Jr., Billestrup, N., White, M.F. & Carter-Su, C. (1995). Growth hormone, interferon-gamma, and leukemia inhibitory factor promoted tyrosyl phosphorylation of insulin receptor substrate-1, *J Biol Chem*, **270**, 14685-92.
- Atkinson, M.A. & Maclaren, N.K. (1994). The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus, *N Engl J Med*, **331**, 1428-36.
- Baldi, A., De Luca, A., Morini, M., Battista, T., Felsani, A., Baldi, F., Catricala, C., Amantea, A., Noonan, D.M., Albini, A., Natali, P.G., Lombardi, D. & Paggi, M.G. (2002). The HtrA1 serine protease is down-regulated during human melanoma progression and represses growth of metastatic melanoma cells, *Oncogene*, **21**, 6684-8.
- Ball, D.W. (2004). Achaete-scute homolog-1 and Notch in lung neuroendocrine development and cancer, *Cancer Lett*, **204**, 159-69.
- Ball, D.W., Azzoli, C.G., Baylin, S.B., Chi, D., Dou, S., Donis-Keller, H., Cumaraswamy, A., Borges, M. & Nelkin, B.D. (1993). Identification of a human achaete-scute homolog highly expressed in neuroendocrine tumors, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 5648-52.
- Baroni, M.G., Cavallo, M.G., Mark, M., Monetini, L., Stoehrer, B. & Pozzilli, P. (1999). Beta-cell gene expression and functional characterisation of the human insulinoma cell line CM, *J Endocrinol*, **161**, 59-68.
- Bartsch, D., Hahn, S.A., Danichevski, K.D., Ramaswamy, A., Bastian, D., Galehdari, H., Barth, P., Schmiegel, W., Simon, B. & Rothmund, M. (1999). Mutations of the DPC4/Smad4 gene in neuroendocrine pancreatic tumors, *Oncogene*, **18**, 2367-71.
- Baserga, R. (1997). The path less traveled by, *Endocrinology*, **138**, 2217-8.

- Baxter, R.C. (1988). Characterization of the acid-labile subunit of the growth hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein complex, *J Clin Endocrinol Metab*, **67**, 265-72.
- Becker, S., Groner, B. & Muller, C.W. (1998). Three-dimensional structure of the Stat3beta homodimer bound to DNA, *Nature*, **394**, 145-51.
- Bendik, I., Schraml, P. & Ludwig, C.U. (1998). Characterization of MAST9/Hevin, a SPARC-like protein, that is down-regulated in non-small cell lung cancer, *Cancer Res*, **58**, 626-9.
- Bergers, G. & Benjamin, L.E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch, *Nat Rev Cancer*, **3**, 401-10.
- Bergmann, U., Funatomi, H., Yokoyama, M., Beger, H.G. & Korc, M. (1995). Insulin-like growth factor I overexpression in human pancreatic cancer: evidence for autocrine and paracrine roles, *Cancer Res*, **55**, 2007-11.
- Bi, M.X., Han, W.D. & Lu, S.X. (2001). Using Lab On-line to Clone and Identify the Esophageal Cancer Related Gene 4, *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)*, **33**, 257-261.
- Boden, G. (1989). Glucagonomas and insulinomas, *Gastroenterol Clin North Am*, **18**, 831-45.
- Bonner-Weir, S. (1990). Morphology of endocrine pancreas, *In Becker KL (ed.): Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism*.
- Bosco, D., Meda, P., Halban, P.A. & Rouiller, D.G. (2000). Importance of cell-matrix interactions in rat islet beta-cell secretion in vitro: role of alpha6beta1 integrin, *Diabetes*, **49**, 233-43.
- Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J. & Jove, R. (2000). STATs in oncogenesis, *Oncogene*, **19**, 2474-88.
- Bowman, T. & Jove, R. (1999). STAT Proteins and Cancer, *Cancer Control*, **6**, 615-619.
- Bowman, T., Yu, H., Sebt, S., Dalton, W. & Jove, R. (1999). Signal Transducers and Activators of Transcription: Novel Targets for Anticancer Therapeutics, *Cancer Control*, **6**, 427-435.
- Bradshaw, A.D. & Sage, E.H. (2001). SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury, *J Clin Invest*, **107**, 1049-54.
- Brekken, R.A. & Sage, E.H. (2000). SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix, *Matrix Biol*, **19**, 569-80.
- Breslauer, K.J., Frank, R., Blocker, H. & Marky, L.A. (1986). Predicting DNA duplex stability from the base sequence, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 3746-50.
- Briscole, J., Kohlhuber, F. & Mullerz, M. (1996). JAKs and STATs branch out, *Trends Cell Biol*, **6**, 336-40.
- Broder, L.E. & Carter, S.K. (1973). Pancreatic islet cell carcinoma. I. Clinical features of 52 patients, *Ann Intern Med*, **79**, 101-7.

- Brogi, E., Wu, T., Namiki, A. & Isner, J.M. (1994). Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only, *Circulation*, **90**, 649-52.
- Bromberg, J. (2002). Stat proteins and oncogenesis, *J Clin Invest*, **109**, 1139-42.
- Bromberg, J. & Darnell, J.E., Jr. (2000). The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function, *Oncogene*, **19**, 2468-73.
- Brown, P.O. & Botstein, D. (1999). Exploring the new world of the genome with DNA microarrays, *Nat Genet*, **21**, 33-7.
- Buchanan, K.D., Johnston, C.F., O'Hare, M.M., Ardill, J.E., Shaw, C., Collins, J.S., Watson, R.G., Atkinson, A.B., Hadden, D.R., Kennedy, T.L. & et al. (1986). Neuroendocrine tumors. A European view, *Am J Med*, **81**, 14-22.
- Calo, V., Migliavacca, M., Bazan, V., Macaluso, M., Buscemi, M., Gebbia, N. & Russo, A. (2003). STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis, *J Cell Physiol*, **197**, 157-68.
- Catlett-Falcone, R., Dalton, W.S. & Jove, R. (1999). STAT proteins as novel targets for cancer therapy. Signal transducer an activator of transcription, *Curr Opin Oncol*, **11**, 490-6.
- Chambers, A.F., Groom, A.C. & MacDonald, I.C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites, *Nat Rev Cancer*, **2**, 563-72.
- Chandrasekharappa, S.C., Guru, S.C., Manickam, P., Olufemi, S.E., Collins, F.S., Emmert-Buck, M.R., Debelenko, L.V., Zhuang, Z., Lubensky, I.A., Liotta, L.A., Crabtree, J.S., Wang, Y., Roe, B.A., Weisemann, J., Boguski, M.S., Agarwal, S.K., Kester, M.B., Kim, Y.S., Heppner, C., Dong, Q., Spiegel, A.M., Burns, A.L. & Marx, S.J. (1997). Positional cloning of the gene for multiple endocrine neoplasia-type 1, *Science*, **276**, 404-7.
- Chen, H., Biel, M.A., Borges, M.W., Thiagalingam, A., Nelkin, B.D., Baylin, S.B. & Ball, D.W. (1997). Tissue-specific expression of human achaete-scute homologue-1 in neuroendocrine tumors: transcriptional regulation by dual inhibitory regions, *Cell Growth Differ*, **8**, 677-86.
- Chen, X., Vinkemeier, U., Zhao, Y., Jeruzalmi, D., Darnell, J.E., Jr. & Kuriyan, J. (1998). Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA, *Cell*, **93**, 827-39.
- Chick, W.L., Lauris, V., Soeldner, J.S., Tan, M.H. & Grinbergs, M. (1973). Monolayer culture of a human pancreatic beta-cell adenoma, *Metabolism*, **22**, 1217-24.
- Chien, J., Staub, J., Hu, S.I., Erickson-Johnson, M.R., Couch, F.J., Smith, D.I., Crowl, R.M., Kaufmann, S.H. & Shridhar, V. (2004). A candidate tumor suppressor HtrA1 is downregulated in ovarian cancer, *Oncogene*, **23**, 1636-44.

- Chin, E., Zhou, J., Dai, J., Baxter, R.C. & Bondy, C.A. (1994). Cellular localization and regulation of gene expression for components of the insulin-like growth factor ternary binding protein complex, *Endocrinology*, **134**, 2498-504.
- Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J. & Rutter, W.J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease, *Biochemistry*, **18**, 5294-9.
- Claeskens, A., Ongenae, N., Neefs, J.M., Cheyins, P., Kaijen, P., Cools, M. & Kutoh, E. (2000). Hevin is down-regulated in many cancers and is a negative regulator of cell growth and proliferation, *Br J Cancer*, **82**, 1123-30.
- Classon, M. & Harlow, E. (2002). The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer, *Nat Rev Cancer*, **2**, 910-7.
- Coffer, P.J., Koenderman, L. & de Groot, R.P. (2000). The role of STATs in myeloid differentiation and leukemia, *Oncogene*, **19**, 2511-22.
- Creutzfeldt, W., Creutzfeldt, C., Frerichs, H., Track, N.S. & Arnold, R. (1976). Histochemistry, ultrastructure and hormone content of human insulinomas, *Horm Metab Res*, **Suppl 6**, 7-18.
- Culig, Z., Hobisch, A., Cronauer, M.V., Radmayr, C., Hittmair, A., Zhang, J., Thurnher, M., Bartsch, G. & Klocker, H. (1996). Regulation of prostatic growth and function by peptide growth factors, *Prostate*, **28**, 392-405.
- Dai, J. & Baxter, R.C. (1994). Regulation in vivo of the acid-labile subunit of the rat serum insulin-like growth factor-binding protein complex, *Endocrinology*, **135**, 2335-41.
- Danforth, D.N., Jr., Gorden, P. & Brennan, M.F. (1984). Metastatic insulin-secreting carcinoma of the pancreas: clinical course and the role of surgery, *Surgery*, **96**, 1027-37.
- Darnell, J.E., Jr. (1997). STATs and gene regulation, *Science*, **277**, 1630-5.
- Daughaday, W.H. & Rotwein, P. (1989). Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations, *Endocr Rev*, **10**, 68-91.
- DeFronzo, R.A. (2004). Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus, *Med Clin North Am*, **88**, 787-835, ix.
- Delcore, R. & Friesen, S.R. (1994). Gastrointestinal neuroendocrine tumors, *J Am Coll Surg*, **178**, 187-211.
- Dietrich, W.F., Radany, E.H., Smith, J.S., Bishop, J.M., Hanahan, D. & Lander, E.S. (1994). Genome-wide search for loss of heterozygosity in transgenic mouse tumors reveals candidate tumor suppressor genes on chromosomes 9 and 16, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 9451-5.
- Ding, S.F., Habib, N.A., Delhanty, J.D., Bowles, L., Greco, L., Wood, C., Williamson, R.C. & Dooley, J.S. (1992). Loss of heterozygosity on

- chromosomes 1 and 11 in carcinoma of the pancreas, *Br J Cancer*, **65**, 809-12.
- Doherty, G.M., Doppman, J.L., Shawker, T.H., Miller, D.L., Eastman, R.C., Gorden, P. & Norton, J.A. (1991). Results of a prospective strategy to diagnose, localize, and resect insulinomas, *Surgery*, **110**, 989-96; discussion 996-7.
- Domene, H.M., Bengolea, S.V., Martinez, A.S., Ropelato, M.G., Pennisi, P., Scaglia, P., Heinrich, J.J. & Jasper, H.G. (2004). Deficiency of the circulating insulin-like growth factor system associated with inactivation of the acid-labile subunit gene, *N Engl J Med*, **350**, 570-7.
- Ellis, N.A., Groden, J., Ye, T.Z., Straughen, J., Lennon, D.J., Ciocchi, S., Proytcheva, M. & German, J. (1995). The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases, *Cell*, **83**, 655-66.
- Ellison, E.C., O'Dorisio, T.M. & Benson, G.D. (1986). Modulation of functional gastrointestinal endocrine tumors by endogenous and exogenous somatostatin, *Am J Surg*, **151**, 668-75.
- Fajans, S.S. & Vinik, A.I. (1989). Insulin-producing islet cell tumors, *Endocrinol Metab Clin North Am*, **18**, 45-74.
- Fata, J.E., Werb, Z. & Bissell, M.J. (2004). Regulation of mammary gland branching morphogenesis by the extracellular matrix and its remodeling enzymes, *Breast Cancer Res*, **6**, 1-11.
- Feinberg, A.P. & Tycko, B. (2004). The history of cancer epigenetics, *Nat Rev Cancer*, **4**, 143-53.
- Feinberg, A.P. & Vogelstein, B. (1984). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum, *Anal Biochem*, **137**, 266-7.
- Ferrara, N., Hillan, K.J., Gerber, H.P. & Novotny, W. (2004). Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer, *Nat Rev Drug Discov*, **3**, 391-400.
- Fidler, I.J. (2002). Critical determinants of metastasis, *Semin Cancer Biol*, **12**, 89-96.
- Folkman, J. (2002). Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis, *Semin Oncol*, **29**, 15-8.
- Fraker, D.L. & Norton, J.A. (1989). The role of surgery in the management of islet cell tumors, *Gastroenterol Clin North Am*, **18**, 805-30.
- Friedberg, E.C. (2003). DNA damage and repair, *Nature*, **421**, 436-40.
- Friess, H., Berberat, P., Schilling, M., Kunz, J., Korc, M. & Buchler, M.W. (1996). Pancreatic cancer: the potential clinical relevance of alterations in growth factors and their receptors, *J Mol Med*, **74**, 35-42.
- Frodin, M., Sekine, N., Roche, E., Filloux, C., Prentki, M., Wollheim, C.B. & Van Obberghen, E. (1995). Glucose, other secretagogues, and nerve growth factor stimulate mitogen-activated protein kinase in

- the insulin-secreting beta-cell line, INS-1, *J Biol Chem*, **270**, 7882-9.
- Garcia, R., Bowman, T.L., Niu, G., Yu, H., Minton, S., Muro-Cacho, C.A., Cox, C.E., Falcone, R., Fairclough, R., Parsons, S., Laudano, A., Gazit, A., Levitzki, A., Kraker, A. & Jove, R. (2001). Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells, *Oncogene*, **20**, 2499-513.
- Girard, J.P. & Springer, T.A. (1995). Cloning from purified high endothelial venule cells of hevin, a close relative of the antiadhesive extracellular matrix protein SPARC, *Immunity*, **2**, 113-23.
- Glickman, M.H., Hart, M.J. & White, T.T. (1980). Insulinoma in Seattle: 39 cases in 30 years, *Am J Surg*, **140**, 119-25.
- Goodge, K.A. & Hutton, J.C. (2000). Translational regulation of proinsulin biosynthesis and proinsulin conversion in the pancreatic beta-cell, *Semin Cell Dev Biol*, **11**, 235-42.
- Grant, C.S. (1993). Surgical management of malignant islet cell tumors, *World J Surg*, **17**, 498-503.
- 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. (1996). 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.
- Gylfe, E. & Hellman, B. (1986). Glucose-stimulated sequestration of Ca²⁺ in clonal insulin-releasing cells. Evidence for an opposing effect of muscarinic-receptor activation, *Biochem J*, **233**, 865-70.
- Halban, P.A., Powers, S.L., George, K.L. & Bonner-Weir, S. (1987). Spontaneous reassociation of dispersed adult rat pancreatic islet cells into aggregates with three-dimensional architecture typical of native islets, *Diabetes*, **36**, 783-90.
- Hambrock, H.O., Nitsche, D.P., Hansen, U., Bruckner, P., Paulsson, M., Maurer, P. & Hartmann, U. (2003). SC1/hevin. An extracellular calcium-modulated protein that binds collagen I, *J Biol Chem*, **278**, 11351-8.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer, *Cell*, **100**, 57-70.
- Hill, R.S., Oberwetter, J.M. & Boyd, A.E., 3rd. (1987). Increase in cAMP levels in beta-cell line potentiates insulin secretion without altering cytosolic free-calcium concentration, *Diabetes*, **36**, 440-6.
- Hohenester, E., Maurer, P., Hohenadl, C., Timpl, R., Jansonius, J.N. & Engel, J. (1996). Structure of a novel extracellular Ca(2+)-binding module in BM-40, *Nat Struct Biol*, **3**, 67-73.
- Horvath, C.M. (2000). STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals, *Trends Biochem Sci*, **25**, 496-502.

- Hu, Y., Ippolito, J.E., Garabedian, E.M., Humphrey, P.A. & Gordon, J.I. (2002). Molecular characterization of a metastatic neuroendocrine cell cancer arising in the prostates of transgenic mice, *J Biol Chem*, **277**, 44462-74.
- Huang, M., Page, C., Reynolds, R.K. & Lin, J. (2000). Constitutive activation of stat 3 oncogene product in human ovarian carcinoma cells, *Gynecol Oncol*, **79**, 67-73.
- Hugl, S.R., White, M.F. & Rhodes, C.J. (1998). Insulin-like growth factor I (IGF-I)-stimulated pancreatic beta-cell growth is glucose-dependent. Synergistic activation of insulin receptor substrate-mediated signal transduction pathways by glucose and IGF-I in INS-1 cells, *J Biol Chem*, **273**, 17771-9.
- Hunter, T. (2000). Signaling--2000 and beyond, *Cell*, **100**, 113-27.
- Ichimura, K., Bolin, M.B., Goike, H.M., Schmidt, E.E., Moshref, A. & Collins, V.P. (2000). Deregulation of the p14ARF/MDM2/p53 pathway is a prerequisite for human astrocytic gliomas with G1-S transition control gene abnormalities, *Cancer Res*, **60**, 417-24.
- Ihle, J.N. (2001). The Stat family in cytokine signaling, *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 211-7.
- Iwamura, Y., Futagawa, T., Kaneko, M., Nakagawa, K., Kawai, K., Yamashita, K., Nakamura, T. & Hayashi, H. (1992). Co-deletions of the retinoblastoma gene and Wilms' tumor gene and rearrangement of the Krev-1 gene in a human insulinoma, *Jpn J Clin Oncol*, **22**, 6-9.
- Jin, L., Wang, H., Narita, T., Kikuno, R., Ohara, O., Shihara, N., Nishigori, T., Horikawa, Y. & Takeda, J. (2003). Expression profile of mRNAs from human pancreatic islet tumors, *J Mol Endocrinol*, **31**, 519-28.
- Jolly, D.J., Okayama, H., Berg, P., Esty, A.C., Filpula, D., Bohlen, P., Johnson, G.G., Shively, J.E., Hunkapillar, T. & Friedmann, T. (1983). Isolation and characterization of a full-length expressible cDNA for human hypoxanthine phosphoribosyl transferase, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**, 477-81.
- Jones, J.I. & Clemmons, D.R. (1995). Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions, *Endocr Rev*, **16**, 3-34.
- Jones, P.A. & Baylin, S.B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer, *Nat Rev Genet*, **3**, 415-28.
- Kayton, M.L., Costouros, N.G., Lorang, D., Alexander, H.R., Hewitt, S.M., Cochran, C., Shalev, A., Harlan, D., Skarulis, M.C., Gorden, P. & Libutti, S.K. (2003). Peak stimulated insulin secretion is associated with specific changes in gene expression profiles in sporadic insulinomas, *Surgery*, **134**, 982-7; discussion 987-8.
- Kent, R.B., 3rd, van Heerden, J.A. & Weiland, L.H. (1981). Nonfunctioning islet cell tumors, *Ann Surg*, **193**, 185-90.
- Kerbela, R. & Folkman, J. (2002). Clinical translation of angiogenesis inhibitors, *Nat Rev Cancer*, **2**, 727-39.

- Klein, G. (2002). Perspectives in studies of human tumor viruses, *Front Biosci*, **7**, d268-74.
- Kloppel, G. (1997). Classification of neuroendocrine tumors, *Verh Dtsch Ges Pathol*, **81**, 111-7.
- Knudson, A.G. (2002). Cancer genetics, *Am J Med Genet*, **111**, 96-102.
- Kondo, K., Klco, J., Nakamura, E., Lechpammer, M. & Kaelin, W.G., Jr. (2002). Inhibition of HIF is necessary for tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein, *Cancer Cell*, **1**, 237-46.
- La Rosa, S., Sessa, F., Capella, C., Riva, C., Leone, B.E., Klersy, C., Rindi, G. & Solcia, E. (1996). Prognostic criteria in nonfunctioning pancreatic endocrine tumours, *Virchows Arch*, **429**, 323-33.
- Langerhans, P. (1869). Beiträge zur mikroskopischen anatomie der bauchspeicheldrüse, *Lange (Berlin)*, 31.
- Ledent, V., Paquet, O. & Vervoort, M. (2002). Phylogenetic analysis of the human basic helix-loop-helix proteins, *Genome Biol*, **3**, RESEARCH0030.
- Lengauer, C., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers, *Nature*, **396**, 643-9.
- Leong, S.R., Baxter, R.C., Camerato, T., Dai, J. & Wood, W.I. (1992). Structure and functional expression of the acid-labile subunit of the insulin-like growth factor-binding protein complex, *Mol Endocrinol*, **6**, 870-6.
- Lin, T.S., Mahajan, S. & Frank, D.A. (2000). STAT signaling in the pathogenesis and treatment of leukemias, *Oncogene*, **19**, 2496-504.
- Lipinska, B., Sharma, S. & Georgopoulos, C. (1988). Sequence analysis and regulation of the htrA gene of Escherichia coli: a sigma 32-independent mechanism of heat-inducible transcription, *Nucleic Acids Res*, **16**, 10053-67.
- Lobie, P.E., Wood, T.J., Sliva, D., Billestrup, N., Waters, M.J., Enberg, B. & Norstedt, G. (1994). The cellular mechanism of growth hormone signal transduction, *Acta Paediatr Suppl*, **406**, 39-46; discussion 47.
- Lombard, D.B. & Guarente, L. (1996). Cloning the gene for Werner syndrome: a disease with many symptoms of premature aging, *Trends Genet*, **12**, 283-6.
- Machado, M.C., Jukemura, J., da Cunha, J.E., Penteado, S., Bacchella, T., Abdo, E.E., Montagnini, A., Herman, P., Machado, M.A. & Pinotti, H.W. (1998). [Surgical treatment of insulinoma: study of 59 cases], *Rev Assoc Med Bras*, **44**, 159-66.
- Maitra, A., Hansel, D.E., Argani, P., Ashfaq, R., Rahman, A., Naji, A., Deng, S., Geradts, J., Hawthorne, L., House, M.G. & Yeo, C.J. (2003). Global expression analysis of well-differentiated pancreatic endocrine neoplasms using oligonucleotide microarrays, *Clin Cancer Res*, **9**, 5988-95.

- Maley, C.C., Galipeau, P.C., Li, X., Sanchez, C.A., Paulson, T.G. & Reid, B.J. (2004). Selectively advantageous mutations and hitchhikers in neoplasms: p16 lesions are selected in Barrett's esophagus, *Cancer Res*, **64**, 3414-27.
- Marks, V. & Teale, J.D. (1991). Tumours producing hypoglycaemia, *Diabetes Metab Rev*, **7**, 79-91.
- Matson, S.W. & Kaiser-Rogers, K.A. (1990). DNA helicases, *Annu Rev Biochem*, **59**, 289-329.
- Meglsson, M.D., Manning, C.D., Najafi, H. & Matschinsky, F.M. (1986). Glucose transport by radiation-induced insulinoma and clonal pancreatic beta-cells, *Diabetes*, **35**, 1340-4.
- Mendis, D.B., Shahin, S., Gurd, J.W. & Brown, I.R. (1994). Developmental expression in the rat cerebellum of SC1, a putative brain extracellular matrix glycoprotein related to SPARC, *Brain Res*, **633**, 197-205.
- Mendis, D.B., Shahin, S., Gurd, J.W. & Brown, I.R. (1996). SC1, a SPARC-related glycoprotein, exhibits features of an ECM component in the developing and adult brain, *Brain Res*, **713**, 53-63.
- Menegaux, F., Schmitt, G., Mercadier, M. & Chigot, J.P. (1993). Pancreatic insulinomas, *Am J Surg*, **165**, 243-8.
- Minn, A.H., Kayton, M., Lorang, D., Hoffmann, S.C., Harlan, D.M., Libutti, S.K. & Shalev, A. (2004). Insulinomas and expression of an insulin splice variant, *Lancet*, **363**, 363-7.
- Modlin, I.M., Lewis, J.J., Ahlman, H., Bilchik, A.J. & Kumar, R.R. (1993). Management of unresectable malignant endocrine tumors of the pancreas, *Surg Gynecol Obstet*, **176**, 507-18.
- Motamed, K., Funk, S.E., Koyama, H., Ross, R., Raines, E.W. & Sage, E.H. (2002). Inhibition of PDGF-stimulated and matrix-mediated proliferation of human vascular smooth muscle cells by SPARC is independent of changes in cell shape or cyclin-dependent kinase inhibitors, *J Cell Biochem*, **84**, 759-71.
- Munger, K. & Howley, P.M. (2002). Human papillomavirus immortalization and transformation functions, *Virus Res*, **89**, 213-28.
- Murphy-Ullrich, J.E. (2001). The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state?, *J Clin Invest*, **107**, 785-90.
- Naumovski, L. & Friedberg, E.C. (1987). The RAD3 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: isolation and characterization of a temperature-sensitive mutant in the essential function and of extragenic suppressors of this mutant, *Mol Gen Genet*, **209**, 458-66.
- Niu, G., Wright, K.L., Huang, M., Song, L., Haura, E., Turkson, J., Zhang, S., Wang, T., Sinibaldi, D., Coppola, D., Heller, R., Ellis, L.M., Karras, J., Bromberg, J., Pardoll, D., Jove, R. & Yu, H. (2002). Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis, *Oncogene*, **21**, 2000-8.

- Noronha, I.L., Weis, H., Hartley, B., Wallach, D., Cameron, J.S. & Waldherr, R. (1993). Expression of cytokines, growth factors, and their receptors in renal allograft biopsies, *Transplant Proc*, **25**, 917-8.
- Norton, J.A. (1994). Neuroendocrine tumors of the pancreas and duodenum, *Curr Probl Surg*, **31**, 77-156.
- Nowell, P.C. (2002). Tumor progression: a brief historical perspective, *Semin Cancer Biol*, **12**, 261-6.
- Oh, Y., Nagalla, S.R., Yamanaka, Y., Kim, H.S., Wilson, E. & Rosenfeld, R.G. (1996). Synthesis and characterization of insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP)-7. Recombinant human mac25 protein specifically binds IGF-I and -II, *J Biol Chem*, **271**, 30322-5.
- Ooi, G.T., Cohen, F.J., Tseng, L.Y., Rechler, M.M. & Boisclair, Y.R. (1997). Growth hormone stimulates transcription of the gene encoding the acid-labile subunit (ALS) of the circulating insulin-like growth factor-binding protein complex and ALS promoter activity in rat liver, *Mol Endocrinol*, **11**, 997-1007.
- Oren, M. (2003). Decision making by p53: life, death and cancer, *Cell Death Differ*, **10**, 431-42.
- Ortega, S., Malumbres, M. & Barbacid, M. (2002). Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer, *Biochim Biophys Acta*, **1602**, 73-87.
- Parker, A., Gockerman, A., Busby, W.H. & Clemmons, D.R. (1995). Properties of an insulin-like growth factor-binding protein-4 protease that is secreted by smooth muscle cells, *Endocrinology*, **136**, 2470-6.
- Pasieka, J.L., McLeod, M.K., Thompson, N.W. & Burney, R.E. (1992). Surgical approach to insulinomas. Assessing the need for preoperative localization, *Arch Surg*, **127**, 442-7.
- Pause, A., Methot, N. & Sonenberg, N. (1993). The HRIGRXXR region of the DEAD box RNA helicase eukaryotic translation initiation factor 4A is required for RNA binding and ATP hydrolysis, *Mol Cell Biol*, **13**, 6789-98.
- Pause, A. & Sonenberg, N. (1992). Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase: the mammalian translation initiation factor eIF-4A, *Embo J*, **11**, 2643-54.
- Pavelic, K., Hrascan, R., Kapitanovic, S., Karapandza, N., Vranes, Z., Belicza, M., Kruslin, B. & Cabrijan, T. (1995). Multiple genetic alterations in malignant metastatic insulinomas, *J Pathol*, **177**, 395-400.
- Pereira, C.A., Pouliquen, Y., Rodas, V., Massotte, D., Mortensen, C., Sogayar, M.C. & Menissier-de Murcia, J. (2001). Optimized insect cell culture for the production of recombinant heterologous proteins and baculovirus particles, *Biotechniques*, **31**, 1262, 1264, 1266, 1268.

- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res*, **29**, e45.
- Philippe, J. (1991). Structure and pancreatic expression of the insulin and glucagon genes, *Endocr Rev*, **12**, 252-71.
- Poitout, V., Olson, L.K. & Robertson, R.P. (1996). Insulin-secreting cell lines: classification, characteristics and potential applications, *Diabetes Metab*, **22**, 7-14.
- Polyak, K. & Riggins, G.J. (2001). Gene discovery using the serial analysis of gene expression technique: implications for cancer research, *J Clin Oncol*, **19**, 2948-58.
- Prives, C. & Hall, P.A. (1999). The p53 pathway, *J Pathol*, **187**, 112-26.
- Proye, C. (1987). Surgical strategy in insulinoma of adults. Clinical review, *Acta Chir Scand*, **153**, 481-91.
- Radford, D.M., Ashley, S.W., Wells, S.A., Jr. & Gerhard, D.S. (1990). Loss of heterozygosity of markers on chromosome 11 in tumors from patients with multiple endocrine neoplasia syndrome type 1, *Cancer Res*, **50**, 6529-33.
- Ramakrishnan, R., Dorris, D., Lublinsky, A., Nguyen, A., Domanus, M., Prokhorova, A., Gieser, L., Touma, E., Lockner, R., Tata, M., Zhu, X., Patterson, M., Shippy, R., Sendera, T.J. & Mazumder, A. (2002). An assessment of Motorola CodeLink microarray performance for gene expression profiling applications, *Nucleic Acids Res*, **30**, e30.
- Rebrikov, D.V., Britanova, O.V., Gurskaya, N.G., Lukyanov, K.A., Tarabykin, V.S. & Lukyanov, S.A. (2000). Mirror orientation selection (MOS): a method for eliminating false positive clones from libraries generated by suppression subtractive hybridization, *Nucleic Acids Res*, **28**, E90.
- Rindi, G., Paolotti, D., LaRosa, S. & Solcia, E. (1998). The tumours of the endocrine pancreas, *Eur J Histochem*, **42 Spec No**, 63-6.
- Rodriguez, B.L., Abbott, R.D., Fujimoto, W., Waitzfelder, B., Chen, R., Masaki, K., Schatz, I., Petrovitch, H., Ross, W., Yano, K., Blanchette, P.L. & Curb, J.D. (2002). The American Diabetes Association and World Health Organization classifications for diabetes: their impact on diabetes prevalence and total and cardiovascular disease mortality in elderly Japanese-American men, *Diabetes Care*, **25**, 951-5.
- Rotwein, P., Gronowski, A.M. & Thomas, M.J. (1994). Rapid nuclear actions of growth hormone, *Horm Res*, **42**, 170-5.
- Sage, E.H., Reed, M., Funk, S.E., Truong, T., Steadele, M., Puolakkainen, P., Maurice, D.H. & Bassuk, J.A. (2003). Cleavage of the matricellular protein SPARC by matrix metalloproteinase 3 produces polypeptides that influence angiogenesis, *J Biol Chem*, **278**, 37849-57.
- Sartorelli, V., Puri, P.L., Hamamori, Y., Ogryzko, V., Chung, G., Nakatani, Y., Wang, J.Y. & Kedes, L. (1999). Acetylation of MyoD directed by

- PCAF is necessary for the execution of the muscle program, *Mol Cell*, **4**, 725-34.
- Sawicki, M.P., Wan, Y.J., Johnson, C.L., Berenson, J., Gatti, R. & Passaro, E., Jr. (1992). Loss of heterozygosity on chromosome 11 in sporadic gastrinomas, *Hum Genet*, **89**, 445-9.
- Schaefer, L.K., Ren, Z., Fuller, G.N. & Schaefer, T.S. (2002). Constitutive activation of Stat3alpha in brain tumors: localization to tumor endothelial cells and activation by the endothelial tyrosine kinase receptor (VEGFR-2), *Oncogene*, **21**, 2058-65.
- Schaeffer, L., Moncollin, V., Roy, R., Staub, A., Mezzina, M., Sarasin, A., Weeda, G., Hoeijmakers, J.H. & Egly, J.M. (1994). The ERCC2/DNA repair protein is associated with the class II BTF2/TFIIH transcription factor, *Embo J*, **13**, 2388-92.
- Schenker, T., Lach, C., Kessler, B., Calderara, S. & Trueb, B. (1994). A novel GTP-binding protein which is selectively repressed in SV40 transformed fibroblasts, *J Biol Chem*, **269**, 25447-53.
- Schindler, C.W. (2002). Series introduction. JAK-STAT signaling in human disease, *J Clin Invest*, **109**, 1133-7.
- Service, F.J., McMahon, M.M., O'Brien, P.C. & Ballard, D.J. (1991). Functioning insulinoma--incidence, recurrence, and long-term survival of patients: a 60-year study, *Mayo Clin Proc*, **66**, 711-9.
- Shalev, A., Blair, P.J., Hoffmann, S.C., Hirshberg, B., Peculis, B.A. & Harlan, D.M. (2002). A proinsulin gene splice variant with increased translation efficiency is expressed in human pancreatic islets, *Endocrinology*, **143**, 2541-7.
- Shapiro, A.M., Lakey, J.R., Ryan, E.A., Korbutt, G.S., Toth, E., Warnock, G.L., Kneteman, N.M. & Rajotte, R.V. (2000). Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen, *N Engl J Med*, **343**, 230-8.
- Sherr, C.J. (2000). Cell cycle control and cancer, *Harvey Lect*, **96**, 73-92.
- Shuai, K., Halpern, J., ten Hoeve, J., Rao, X. & Sawyers, C.L. (1996). Constitutive activation of STAT5 by the BCR-ABL oncogene in chronic myelogenous leukemia, *Oncogene*, **13**, 247-54.
- Sliva, D., Wood, T.J., Schindler, C., Lobie, P.E. & Norstedt, G. (1994). Growth hormone specifically regulates serine protease inhibitor gene transcription via gamma-activated sequence-like DNA elements, *J Biol Chem*, **269**, 26208-14.
- Soderholm, H., Ortoft, E., Johansson, I., Ljungberg, J., Larsson, C., Axelsson, H. & Pahlman, S. (1999). Human achaete-scute homologue 1 (HASH-1) is downregulated in differentiating neuroblastoma cells, *Biochem Biophys Res Commun*, **256**, 557-63.
- Song, J.I. & Grandis, J.R. (2000). STAT signaling in head and neck cancer, *Oncogene*, **19**, 2489-95.

- St Croix, B., Rago, C., Velculescu, V., Traverso, G., Romans, K.E., Montgomery, E., Lal, A., Riggins, G.J., Lengauer, C., Vogelstein, B. & Kinzler, K.W. (2000). Genes expressed in human tumor endothelium, *Science*, **289**, 1197-202.
- Stefanini, P., Carboni, M., Patrassi, N. & Basoli, A. (1974). Beta-islet cell tumors of the pancreas: results of a study on 1,067 cases, *Surgery*, **75**, 597-609.
- Stringel, G., Dalpe-Scott, M., Perelman, A.H. & Heick, H.M. (1985). The occult insulinoma operative localization by quick insulin radioimmunoassay, *J Pediatr Surg*, **20**, 734-6.
- Subramanian, A., Teixeira, J., Wang, J. & Gil, G. (1995). A STAT factor mediates the sexually dimorphic regulation of hepatic cytochrome P450 3A10/lithocholic acid 6 beta-hydroxylase gene expression by growth hormone, *Mol Cell Biol*, **15**, 4672-82.
- Tahara, E. (1994). Cancer-stromal interaction through growth factor/cytokine networks implicated in growth of stomach cancer, *Princess Takamatsu Symp*, **24**, 187-94.
- Takeda, K. & Akira, S. (2000). STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses, *Cytokine Growth Factor Rev*, **11**, 199-207.
- Thivolet, C.H., Demidem, A., Haftek, M., Durand, A. & Bertrand, J. (1988). Structure, function, and immunogenicity of human insulinoma cells, *Diabetes*, **37**, 1279-86.
- Tlsty, T.D. & Hein, P.W. (2001). Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals, *Curr Opin Genet Dev*, **11**, 54-9.
- Trautmann, M.E. & Wollheim, C.B. (1987). Characterization of glucose transport in an insulin-secreting cell line, *Biochem J*, **242**, 625-30.
- Trump, D., Farren, B., Wooding, C., Pang, J.T., Besser, G.M., Buchanan, K.D., Edwards, C.R., Heath, D.A., Jackson, C.E., Jansen, S., Lips, K., Monson, J.P., O'Halloran, D., Sampson, J., Shalet, S.M., Wheeler, M.H., Zink, A. & Thakker, R.V. (1996). Clinical studies of multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1), *Qjm*, **89**, 653-69.
- Turkson, J., Bowman, T., Garcia, R., Caldenhoven, E., De Groot, R.P. & Jove, R. (1998). Stat3 activation by Src induces specific gene regulation and is required for cell transformation, *Mol Cell Biol*, **18**, 2545-52.
- Ueki, I., Ooi, G.T., Tremblay, M.L., Hurst, K.R., Bach, L.A. & Boisclair, Y.R. (2000). Inactivation of the acid labile subunit gene in mice results in mild retardation of postnatal growth despite profound disruptions in the circulating insulin-like growth factor system, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 6868-73.
- van Heerden, J.A., Edis, A.J. & Service, F.J. (1979). The surgical aspects of insulinomas, *Ann Surg*, **189**, 677-82.
- VanderKuur, J., Allevato, G., Billestrup, N., Norstedt, G. & Carter-Su, C. (1995). Growth hormone-promoted tyrosyl phosphorylation of SHC

- proteins and SHC association with Grb2, *J Biol Chem*, **270**, 7587-93.
- Vergani, G., Lahr, G., Wang, Z.M., Bartke, A. & Mayerhofer, A. (1997). Visualizing the expression of a human growth hormone (hGH) transgene in the liver: intrahepatic regional and intracellular differences of expression are associated with morphological alterations and hepatocellular proliferation, *Tissue Cell*, **29**, 611-6.
- Verheul, H.M., Voest, E.E. & Schlingemann, R.O. (2004). Are tumours angiogenesis-dependent?, *J Pathol*, **202**, 5-13.
- Verspohl, E.J., Tollkuhn, B. & Kloss, H. (1995). Role of tyrosine kinase in insulin release in an insulin secreting cell line (INS-1), *Cell Signal*, **7**, 505-12.
- Vogelstein, B. & Kinzler, K.W. (2004). Cancer genes and the pathways they control, *Nat Med*, **10**, 789-99.
- Vogelstein, B., Lane, D. & Levine, A.J. (2000). Surfing the p53 network, *Nature*, **408**, 307-10.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J. & Gay, N.J. (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold, *Embo J*, **1**, 945-51.
- Wang, S., Tying, S.K., Townsend, C.M., Jr. & Evers, B.M. (1998). Interferon-mediated activation of the STAT signaling pathway in a human carcinoid tumor, *Ann Surg Oncol*, **5**, 642-9.
- Warwick, R. (1979). Gray Anatomia (Rio de Janeiro), *Guanabara Koogan*.
- Weir, G.C., Halban, P.A., Meda, P., Wollheim, C.B., Orci, L. & Renold, A.E. (1984). Dispersed adult rat pancreatic islet cells in culture: A, B, and D cell function, *Metabolism*, **33**, 447-53.
- Wick, M. (2000). Neuroendocrine neoplasia: Current concepts, *AM J Clin Pathol*, **113**, 313-35.
- Wild, A., Langer, P., Ramaswamy, A., Chaloupka, B. & Bartsch, D.K. (2001). A novel insulinoma tumor suppressor gene locus on chromosome 22q with potential prognostic implications, *J Clin Endocrinol Metab*, **86**, 5782-7.
- Wilder, R., Allan, F. & Power, N. (1927). Carcinoma of island of pancreas, hyperinsulinism and hypoglycemia, *JAMA*, **89**, 348.
- Williams, J.G. (1999). Serpentine receptors and STAT activation: more than one way to twin a STAT, *Trends Biochem Sci*, **24**, 333-4.
- Wood, T.J., Sliva, D., Lobie, P.E., Pircher, T.J., Gouilleux, F., Wakao, H., Gustafsson, J.A., Groner, B., Norstedt, G. & Haldosen, L.A. (1995). Mediation of growth hormone-dependent transcriptional activation by mammary gland factor/Stat 5, *J Biol Chem*, **270**, 9448-53.
- Wulbrand, U., Remmert, G., Zofel, P., Wied, M., Arnold, R. & Fehmann, H.C. (2000). mRNA expression patterns of insulin-like growth factor system components in human neuroendocrine tumours, *Eur J Clin Invest*, **30**, 729-39.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Wulbrand, U., Wied, M., Zofel, P., Goke, B., Arnold, R. & Fehmann, H. (1998). Growth factor receptor expression in human gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours, *Eur J Clin Invest*, **28**, 1038-49.
- Yue, C.M., Deng, D.J., Bi, M.X., Guo, L.P. & Lu, S.H. (2003). Expression of ECRG4, a novel esophageal cancer-related gene, downregulated by CpG island hypermethylation in human esophageal squamous cell carcinoma, *World J Gastroenterol*, **9**, 1174-8.
- Zhuang, Z., Vortmeyer, A.O., Pack, S., Huang, S., Pham, T.A., Wang, C., Park, W.S., Agarwal, S.K., Debelenko, L.V., Kester, M., Guru, S.C., Manickam, P., Olufemi, S.E., Yu, F., Heppner, C., Crabtree, J.S., Skarulis, M.C., Venzon, D.J., Emmert-Buck, M.R., Spiegel, A.M., Chandrasekharappa, S.C., Collins, F.S., Burns, A.L., Marx, S.J. & Lubensky, I.A. (1997). Somatic mutations of the MEN1 tumor suppressor gene in sporadic gastrinomas and insulinomas, *Cancer Res*, **57**, 4682-6.
- Zumbrunn, J. & Trueb, B. (1996). Primary structure of a putative serine protease specific for IGF-binding proteins, *FEBS Lett*, **398**, 187-92.
- Zumbrunn, J. & Trueb, B. (1997). Localization of the gene for a serine protease with IGF-binding domain (PRSS11) to human chromosome 10q25.3-q26.2, *Genomics*, **45**, 461-2.
- zur Hausen, H. (2001). Oncogenic DNA viruses, *Oncogene*, **20**, 7820-3.

8. CURRICULUM VITAE

Outubro/2004

Dados Pessoais

Nome Karin Krogh
Nascimento 25/07/1972 - Mogi das Cruzes/SP - Brasil
CPF 50936727349

Formação Acadêmica/Titulação

- 2000 Doutorado em Ciências Biológicas (Bioquímica).
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Isolamento e Caracterização de Genes Diferencialmente Expressos em Insulinomas (Adenomas) Humanos
Orientador: Mari Cleide Sogayar
- 1997 - Mestrado em Biologia Celular e Molecular.
1999 Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Caracterização da Localização centrossomal da Miosina-Va e Análise de sua Expressão em Células Mitóticas e Interfásicas, Ano de obtenção: 1999
Orientador: Enilza Maria Espreafico
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 1996 - Especialização em Biologia Celular e Molecular.
1997 Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 1990 - Graduação em Farmácia Bioquímica.
1995 Universidade Federal do Maranhão, UFMA, São Luís, Brasil
-

Trabalhos resumidos publicados em anais de evento

KROGH, K., OLIVEIRA, L. R., LABRIOLA, L., AITA, C. A. M., LOJUDICE, F. H., SÁ, S. V., MACHADO, M. C., GENZINI, T., ELIASCHEWITZ, F. G., SOGAYAR, M. C. DIFFERENTIAL EXPRESSION OF STAT PROTEINS AND ITS SIGNALING PATHWAY ACTIVATORS IN HUMAN INSULINOMAS In: Pancreatic Cancer 2004: Advances and Challenges, 2004, San Francisco.

Pancreatic Cancer 2004 meetings. , 2004.

KROGH, K., COLIN, C., LABRIOLA, L., AITA, C. A. M., LOJUDICE, F. H., SÁ, S. V., CORREA, M. L. C., MACHADO, M. C., ELIASCHEWITZ, F. G., SOGAYAR, M. C. Identification of differentially expressed genes in human insulinoma and in normal islet cells In: 95th Annual Meeting of American Association for Cancer Research, 2004, Orlando.

95th Annual Meeting Proceedings. , 2004.

AITA, C. A. M., LOJUDICE, F. H., LABRIOLA, L., KROGH, K., OLIVEIRA, E. M. C., SILVA, I. C., GENZINI, T., NORONHA, I. L., ELIASCHEWITZ, F. G., SOGAYAR, M.

C.

First Brazilian Islet Allotransplantation in a Type I DM Patient In: 9th Congress of the International Pancreas and Islet Transplant Association, 2003, Dublin.

9th Congress of the International Pancreas and Islet Transplant Association. , 2003.

LABRIOLA, L., AITA, C. A. M., LOJUDICE, F. H., KROGH, K., OLIVEIRA, E. M. C., MIRANDA, M. P., NORONHA, I., GOLDBERG, A. C., ELIASCHEWITZ, F. G., SOGAYAR, M. C.

Human Prolactin and Laminin Stimulate Proliferation and Secretory Function of Human Islet Primary Cultures In: V COPEM-Congresso Paulista de Endocrinologia e Metabologia, 2003, São Paulo.

V COPEM. , 2003.

KROGH, K., COLIN, C., AITA, C. A. M., LOJUDICE, F. H., OLIVEIRA, E. M. C., MACHADO, M. C., GENZINI, T., ELIASCHEWITZ, F. G., SOGAYAR, M. C.

Cloning of Putative Tumor Invasion Suppressor Gene in Benign Insulinoma Identified by SSH In: XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2002, Caxambu.

XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. , 2002.

ENGLER, S. S. M., KROGH, K., CORREA, M. L. C., COLIN, C., AITA, C. A. M., OLIVEIRA, E. M. C., GENZINI, T., GUIA, M. M., ELIASCHEWITZ, F. G., SOGAYAR, M. C.

Insulin and Nestin (an Adult Pancreatic Stem Cell) in Long-Term Human Pancreatic Islet Cultures : Potential Therapeutic to Diabetes In: XI Congresso Brasileiro de Biologia Celular, 2002, Porto Alegre.

XI Congresso Brasileiro de Biologia Celular. , 2002.

KROGH, K., BENGSTON, M. H., SÁ, S. V., AITA, C. A. M., COLIN, C., MACHADO, M. C., ENGLER, S. S. M., OLIVEIRA, E. M. C., GENZINI, T., MIRANDA, M. P., NORONHA, I., GIANELLA NETO, D., ELIASCHEWITZ, F. G., SOGAYAR, M. C.

Identification of differentially expressed genes in human insulinomas In: Brazilian International Genome Conference, 2001, Angra dos Reis.

. , 2001.

KROGH, K., NASCIMENTO, A. A. C., MARIA, A., ESPREAFICO, E. M.

Dissecting the myosin-Va globular tail subdomains involved in targeting specific subcellular localization In: I International Symposium on Myosin-V, 2000, Parati-RJ.

. , 2000.

KROGH, K., ESPREAFICO, E. M.

Dissecting the myosin-Va globular tail subdomains involved in targeting specific subcellular localizations In: XXVIII Reunião Anual da SBBq, 1999, Caxambu-MG.

SBBQ. , 1999.

KROGH, K., TSAKRACLIDES, V., ESPREAFICO, E. M.

Myosin-V is localized in the centrosome of animal cells In: XXVII Reunião Anual da SBBq, 1998, Caxambu.

XXVII Reunião Anual da SBBq. , 1998.

ESPREAFICO, E. M., KROGH, K., COLING, D., KALINEC, G., KACHAR, B.

Myosin-V is localized in the centrosome and mitotic spindle of animal cells In: I Encontro Nacional do Pós-Graduação em Áreas de Biologia Estrutural, 1997, Campinas.

. , 1997.

KROGH, K., BRANDÃO, L. M.
Estudo Fitoquímico dos frutos da *Vismia reichardtiana* (O. Ktze) Ewan In: VI
Seminário Estudantil do Iniciação Científica, 1994, São Luis.
. , 1994.

KROGH, K., BRANDÃO, L. M.
Estudo Fitoquímico dos frutos da *Vismia reichardtiana* (O. Ktze) Ewan In: V
Seminário Estudantil de Iniciação Científica, 1993, São Luis.
. , 1993.

KROGH, K., BRANDÃO, L. M.
Separação dos Constituintes químicos dos frutos da *Vismia reichardtiana* (O.
Ktze) Ewan In: I Ciclo de Estudos de Farmácia, 1993, São Luis-MA.
. , 1993.

Artigos completos publicados em periódicos

ENGLER, S. S. M., CORREA-GIANNELLA, M. L. C., LABRIOLA, L., KROGH, K.,
COLIN, C., LOJUDICE, F. H., GENZINI, T., NORONHA, I. L., ELIASCHEWITZ, F. G.,
SOGAYAR, M. C.
Expression of islet cell markers in long-term human pancreatic nestin-positive cell
cultures.. *Journal of Endocrinology*. , 2004.

ELIASCHEWITZ, F. G., AITA, C. A. M., GENZINI, T., NORONHA, I. L., LOJUDICE,
F. H., LABRIOLA, L., KROGH, K., OLIVEIRA, E. M. C., MIRANDA, M. P., SOGAYAR,
M. C.
First Brazilian pancreatic islet transplantation in a patient with type 1 diabetes
mellitus. *Transplantation Proceedings*. United States: v.36, p.1117 - 1118, 2004.

ENGLER, S. S. M., GUIA, M. M., CORREA, M. L. C., OLIVEIRA, E. M. C., AITA, C.
A. M., KROGH, K., GENZINI, T., MIRANDA, M. P., RIBEIRO, M., NORONHA, I. L.,
ELIASCHEWITZ, F. G., SOGAYAR, M. C.
Microencapsulation and Tissue Engineering as a Therapeutic Alternative to
Diabetes. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. Brasil:, v.34, 2001.

TSAKRAKLIDES, V., KROGH, K., WANG, L., BIZARIO, J. C. S., LARSON, R. E.,
ESPRAAFICO, E. M., WOLENSKI, J.
Subcellular localization of GFP-myosin-V in live mouse melanocytes. *Journal Of
Cell Science*. United States of America: , v.112, p.2853 - 2865, 1999.

ESPRAAFICO, E., COLING, D. E., TSAKRAKLIDES, V., KROGH, K., WOLENSKI, J.
S., KALINEC, G., KACHAR, B.
Localization of myosin-V in the centrosome. *Proceedings of the National Academy
of Sciences of the USA*. United States: , v.95, p.8636 - 8641, 1998.

Artigos em revistas (Magazine)

AITA, C. A. M., SOGAYAR, M. C., LOJUDICE, F. H., OLIVEIRA, E. M. C., KROGH,

K., LABRIOLA, L., GENZINI, T., GOLDBERG, A. C., ELIASCHEWITZ, F. G.
Transplante- Alternativa Atraente. Revista Ciência Hoje. Brasil, p.34 - 40, 2004.