

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

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

Carlos Alberto Mayora Aita

Tese de Doutorado

PROF^a. DR^a. MARI CLEIDE SOGAYAR

SÃO PAULO

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

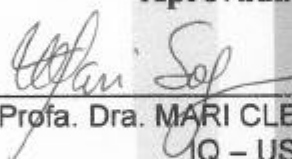
Quatro de Novembro de Dois Mil e Dois

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

**CARLOS ALBERTO MAYORA
AITA**

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

Aprovada por:



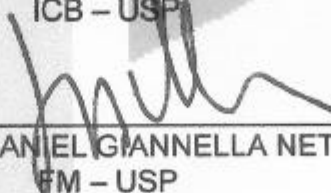
Prof. Dra. MARI CLEIDE SOGAYAR
IQ – USP
(Orientadora e Presidente)



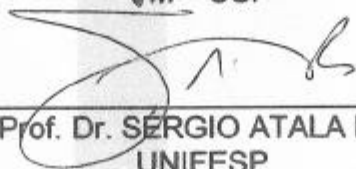
Prof. Dr. PAULO LEE HO
IB



Prof. Dra. CLAUDIMARA PERINI PACICCO LOFTI
ICB – USP



Prof. Dr. DANIEL GIANNELLA NETO
FM – USP



Prof. Dr. SÉRGIO ATALA DIB
UNIFESP

SÃO PAULO
16 DE DEZEMBRO 2002.

À Irenice, pelo seu amor e sua
companhia.

À minha família, por tudo.

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

AGRADECIMENTO

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

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

APOIO FINANCEIRO

CNPq-Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

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

FINEP - Financiadora de Estudos e Projetos

ICGEB -International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology

PRP-USP - Pró-Reitoria de Pesquisa - USP

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

Sumário

Resumo

Abstract

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras e Tabelas

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

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

Curriculum vitae

RESUMO

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

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

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

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

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

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

