

**Carla Demeterco
Fred Levine**

*Unidade de Endocrinologia Pediátrica,
Departamento de Pediatria,
Universidade Federal do Paraná,
Curitiba, Brasil; e UCSD Cancer
Center, La Jolla, California, EUA.*

RESUMO

A administração de insulina exógena tem sido a única forma de tratamento disponível para milhões de indivíduos portadores de diabetes mellitus do tipo 1 (insulino-dependente). Embora o transplante de pâncreas tenha sido empregado com sucesso para um número limitado de pacientes, ele ainda é considerado um procedimento invasivo com alto risco de complicações. Por outro lado, estudos preliminares onde o transplante de ilhotas pancreáticas foi realizado sem o emprego de glucocorticóides no esquema de imunossupressão demonstraram resultados extremamente promissores. Entretanto, o emprego de ilhotas pancreáticas, assim como o transplante de pâncreas, enfrenta o problema da escassez de órgãos disponíveis para transplante. Assim, um dos grandes objetivos da terapia gênica para diabetes é a geração de fontes ilimitadas de células que apresentem secreção normal de insulina em resposta ao estímulo da glicose, capazes de serem transplantadas sem a necessidade de imunossupressão sistêmica. Este artigo tem como finalidade revisar como a terapia gênica pode ser empregada na obtenção desta fonte de células, assim como discutir os últimos avanços no campo da biologia celular e molecular em relação ao crescimento e diferenciação da célula β . (**Arq Bras Endocrinol Metab 2001;45/1:96-107**)

Unitermos: Terapia gênica; Diabetes mellitus; Célula β .

ABSTRACT

Insulin injection has been the only treatment option for most of the millions of insulin-dependent diabetic individuals. Whole pancreas transplantation has been a successful approach for some patients. It is a complex operation with many potential complications. Recently, it was demonstrated that a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen led to remarkably successful islet transplantation. However, both pancreas and islet cell transplantation have to overcome the shortage of cadaveric pancreases that are available for transplantation. The ultimate goal of diabetes therapy is to generate an unlimited source of cells with glucose-responsive insulin secretion that can be transplanted without the need for systemic immunosuppression. The focus of this review is how gene therapy can be used in various approaches in order to develop such a source of cells. The recent advances in b-cell growth and development will also be discussed. (**Arq Bras Endocrinol Metab 2001;45/1:96-107**)

Keywords: Gene therapy; Diabetes mellitus; β -cell.

OTRATAMENTO DO DIABETES MELLITUS (DM) tem como objetivo a manutenção da normoglicemia frente às variações da ingestão alimentar. De acordo com resultados do *Diabetes Control and Complication Trial* (DCCT), o controle rigoroso dos níveis glicêmicos está associado à

*Recebido em 11/11/00
Aceito em 10/01/01*

diminuição da incidência das complicações tardias. Entretanto, o regime rigoroso de administração de insulina leva a um aumento dos episódios de hipoglicemia (1). Devido a uma série de dificuldades técnicas, ainda não se dispõe de um sensor artificial capaz de infundir insulina em resposta às variações dos níveis glicêmicos (2-4). O transplante de células β parece ser a melhor solução para a restauração do controle fisiológico da glicemia. Há mais de trinta anos o transplante de ilhotas pancreáticas tem sido alvo de estudos (5). Entretanto, apenas na década de noventa puderam-se observar relatos de sucesso neste campo (6). O *Islet Transplant Registry* relatou que apenas 6% dos pacientes que receberam transplante de ilhotas entre os anos de 1990 e 1995 não necessitaram insulina exógena por um período de um ano (7). Isto se deve, em parte, aos efeitos tóxicos do esquema imunossupressor, especialmente dos esteróides, sobre a função das células β . Recentemente, o uso de um esquema de imunossupressão sem glucocorticóides determinou a obtenção de resultados extremamente promissores no transplante de ilhotas. Este estudo representa uma conquista na área de transplante de ilhotas pancreáticas pois todos os pacientes portadores de diabetes tipo 1 transplantados mantiveram normoglicemia sem o uso de insulina exógena durante pelo menos um ano pós-transplante (8). Neste momento vários centros de transplante de ilhotas ao redor do mundo estão empregando o mesmo protocolo, o que permitirá a obtenção de resultados de um grupo maior de pacientes. Entretanto, o número de doadores de pâncreas para o transplante de ilhotas está aquém do necessário para a cura de milhões de indivíduos portadores de diabetes insulino-dependente. Além disso, a autoimunidade e a rejeição pós-transplante ainda devem ser superadas. É fundamental, portanto, que se desenvolva uma fonte ilimitada de células capazes de secretar insulina em resposta à glicose e passíveis de serem transplantadas sem a necessidade de imunossupressão sistêmica.

TRANSPLANTE DE CÉLULAS COMO TERAPIA PARA O DIABETES

A cada ano nos Estados Unidos são registrados cerca de 30.000 novos casos de DM tipo 1 (9). Além disso, como um número considerável de indivíduos com diabetes tipo 2 poderiam ser candidatas ao transplante de células β . Entretanto, apenas cerca de 5.000 casos de morte cerebral considerados como potenciais doadores de tecido pancreático acontecem a cada ano (10). Diversas fontes de células podem ser apontadas como

candidatas potenciais ao transplante celular na terapia do DM. O emprego do xenotransplante tem sido considerado, especialmente no que se refere às células β suínas. Embora a utilização deste tipo de células não apresente obstáculos quanto à disponibilidade de tecido, problemas como a rejeição imunológica e o risco de infecção pelo retrovírus porcino endógeno (PERV) ainda precisam ser resolvidos. Células humanas têm sido objeto de inúmeros estudos, sejam elas de origem pancreática ou extra-pancreática. O emprego de células humanas para este fim depende da capacidade de se expandir, *in vitro*, a limitada quantidade de tecido pancreático disponível. A expansão *in vitro* de células β primárias, ou seja, provenientes do tecido pancreático normal e sem manipulação genética, assim como de linhagens celulares obtidas a partir da célula β , representa um dos maiores desafios ao sucesso do transplante celular para DM. Isto se deve ao fato de que existe uma relação inversa entre a proliferação e diferenciação da célula β . As células tronco, assim como os precursores da célula β , e as células provenientes de linhagens celulares possuem uma alta capacidade de proliferação, enquanto que células β adultas raramente apresentam divisão celular. A utilização de células humanas de origem não pancreática tem sido considerada, mas, apesar de oferecer flexibilidade quanto à escolha do tipo de célula a ser empregada, enfrenta o desafio de ter que reproduzir o complexo aparato celular para secreção de insulina próprio da célula β . A estratégia de reposição de células para o tratamento do DM depende, portanto, da existência de uma fonte de células β diferenciadas e funcionais com a capacidade de se proliferar indefinidamente.

USO DE CÉLULAS β PANCREÁTICAS PARA TRANSPLANTE

Xenotransplante de células β pancreáticas

O xenotransplante, transplante de órgãos, tecidos ou células entre diferentes espécies, é uma das opções para o suprimento de células β . As células suínas têm sido consideradas como as mais apropriadas para este fim por possuírem características semelhantes às células β humanas, como, por exemplo, a secreção de insulina em resposta a níveis glicêmicos similares (11-14). O recente relato de clonagem de porcos vem a favorecer o uso de tecido suíno para transplantes (15). Entretanto, devido à sua baixa sobrevivência em cultura *in vitro*, é extremamente difícil obter ilhotas suínas viáveis para o transplante (16,17). Além disso, o uso de ilhotas suínas tem maior risco de rejeição tardia ao xenotransplante (18-21) e de infecção pelo retrovírus porcino

endógeno (PERV) (22). A criação de animais isentos do retrovírus demonstrou-se extremamente difícil devido à presença de múltiplas cópias do vírus integradas em seu genoma (23).

Expansão de células β e de seus precursores a partir de tecido primário

Embora as células β possuam como característica uma limitada capacidade de replicação, certos fatores de crescimento associados ao uso de matrizes extracelulares têm servido como estímulo à proliferação de células β adultas e de seus precursores. Entre estes, destaca-se o fator de crescimento de hepatócitos (*hepatocyte growth factor/scattered factor* ou HGF/SF) (24,25). Entretanto, o estímulo da proliferação da célula β é acompanhado pela perda do seu potencial de diferenciação, com conseqüente diminuição ou ausência da expressão de insulina (25,26). Outro obstáculo refere-se à limitada capacidade de expansão apresentada pelas células β . Depois de apenas 15 a 20 duplicações *in vitro* há uma interrupção no crescimento, a qual demonstrou-se ser devida à senescência celular (25,27). A expansão de células primárias resulta no gradativo encurtamento de seus telômeros, com conseqüente aumento da expressão de um dos inibidores do ciclo celular, p16 INK4a (28). As células precursoras da célula β , por outro lado, não apresentam o limitado potencial replicativo encontrado nas células adultas, sendo consideradas como uma possível alternativa. Entretanto, os fatores envolvidos na proliferação e desenvolvimento dos precursores da célula β , assim como seus mecanismos de ação, ainda não foram totalmente identificados (25,29-32).

Células pancreáticas ductais representam uma outra fonte de tecido para transplante. A neogênese de células endócrinas a partir de ductos pancreáticos *in vitro* com o uso de matrizes especiais e de fatores de crescimento tem sido sugerida como forma de propagar ilhotas pancreáticas humanas, a fim de se aumentar a massa de tecido endócrino obtido de pâncreas de cadáveres (33). Células ductais provenientes do pâncreas humano foram direcionadas a se diferenciarem em células endócrinas quando expostas a diferentes fatores de crescimento e à cultura em Matrigel (34). Embora este estudo tenha demonstrado resultados promissores, o número de células obtidas, com capacidade de secretar insulina, ainda está aquém do necessário para fins de transplante.

Outra alternativa seria a do emprego de células tronco embrionárias ou *embryonic stem cells*. Estas células têm como vantagem a capacidade de se diferenciarem *in vitro* em diferentes linhagens celulares

(35,36). O transplante intra-esplênico de células secretoras de insulina obtidas a partir de um clone proveniente de células tronco embrionárias normalizou a glicemia de camundongos com diabetes quimicamente induzida (37). Entretanto, cerca de 40% dos animais retornaram a apresentar hiperglicemia após 12 semanas do transplante. Infelizmente, nos 60% dos animais que permaneceram normoglicêmicos, o baço não foi removido ao final do experimento a fim de se afastar a possibilidade de regeneração pancreática. Não foi também esclarecido como a resposta imunológica foi controlada, já que nenhum esquema imunossupressor ou encapsulamento celular foi utilizado.

Ramiya e cols. relataram a obtenção de células secretoras de insulina a partir da cultura *in vitro* de células ductais provenientes do pâncreas de camundongos NOD (*non-obese diabetic*). O transplante destas células na região subcapsular renal de camundongos NOD levou à reversão do DM insulino-dependente (38). Devido ao fato do transplante não ter sido removido ao final do experimento, não foi possível afastar a possibilidade de que a normoglicemia tenha sido devida à regeneração de células autólogas. Por outro lado, é interessante mencionar que, embora as células tenham sido obtidas de camundongos NOD pré-diabéticos, os animais que receberam o transplante não desenvolveram DM. Isto significa que, teoricamente, células obtidas de um paciente recém diagnosticado com diabetes e submetidas à expansão em cultura *in vitro* poderiam ser transplantadas para o mesmo indivíduo sem o problema de rejeição.

DESENVOLVIMENTO PANCREÁTICO

O limitado potencial de replicação da célula β adulta despertou um grande interesse no estudo de seus precursores como fonte de tecido para transplante. Entretanto, embora as células precursoras possuam uma maior capacidade proliferativa, não apresentam as mesmas características funcionais da célula endócrina adulta. O desenvolvimento da célula pancreática endócrina depende de uma complexa interação entre sinais provenientes de fatores solúveis e matrizes extracelulares e de interações intercelulares que, por sua vez, irão regular os fatores de transcrição. O emprego de precursores da célula β para fins de transplante necessita, portanto, do completo entendimento de todos os fatores envolvidos no processo da diferenciação celular.

Do ponto de vista embriológico, o pâncreas é proveniente da porção duodenal superior do intestino embrionário, por meio de uma protusão do epitélio diretamente posterior ao estômago. Sua formação

depende da interação de sinais intercelulares provenientes das células do endoderma e do mesoderma intestinais (39-41). Os genes responsáveis pela expressão de moléculas necessárias para o desenvolvimento da célula β são alvos potenciais para terapia gênica, pois estão envolvidos na promoção do desenvolvimento de precursores da célula β *in vitro* e *in vivo*.

Fatores de Crescimento e de Diferenciação

Com o intuito de se obter fontes de células produtoras de insulina para transplante, muita atenção tem sido direcionada para o entendimento dos sinais extracelulares que controlam o desenvolvimento da célula endócrina.

Entre os fatores de crescimento estudados, vários relatos têm apontado a importância da ativina no desenvolvimento pancreático. Camundongos transgênicos portadores de mutações no receptor da ativina apresentam hipoplasia das ilhotas pancreáticas (42). A folistatina, proteína carreadora da ativina, possui os mesmos efeitos repressivos do mesênquima na diferenciação das células pancreáticas endócrinas em ratos (43). A ativina interfere na diferenciação endócrina quando associada a outros fatores de crescimento. Mashima e cols. demonstraram que betacelulina, o fator de crescimento isolado de um tumor de células β em camundongos, foi capaz de converter células exócrinas AR42J em células secretoras de insulina, quando empregado juntamente com a ativina A (44). O mesmo resultado foi obtido com a associação do fator de crescimento dos hepatócitos (HGF-SF) e ativina A (45). A betacelulina pertence à família dos *epidermal growth factors* (EGF) e sua expressão foi demonstrada no pâncreas humano (46). A ausência de receptores para os EGF em camundongos resultou em anomalias na formação das ilhotas pancreáticas (47). É interessante mencionar que, em células humanas pancreáticas indiferenciadas, observaram-se efeitos distintos provenientes do uso da ativina A ou da betacelulina. A ativina A induziu diferenciação endócrina, enquanto que a betacelulina promoveu proliferação (29).

O fator de crescimento dos hepatócitos (HGF/SF) é uma proteína derivada do mesênquima que exerce efeitos nas células epiteliais quando acoplado ao seu receptor de membrana c-met. Altos níveis da expressão de ambos HGF/SF e de seu receptor c-met são encontrados durante o desenvolvimento pancreático nos seres humanos. Durante a puberdade e a vida adulta encontram-se ainda a expressão destas proteínas, porém em níveis bem mais baixos (48-50). O HGF/SF possui um efeito mitogênico em células epiteliais no pâncreas fetal humano, e o seu receptor c-

met foi encontrado em células positivas para insulina (50). O aumento da expressão de HGF/SF em camundongos transgênicos estimulou a proliferação de células β e o número de ilhotas pancreáticas, com conseqüente hipoglicemia (51).

Outros fatores que possuem um papel importante no crescimento e na diferenciação endócrina incluem a prolactina e o *glucagon-like peptide 1* (GLP-1). A prolactina foi descrita como potente ativador do crescimento de ilhotas *in vitro* (52). O GLP-1, por sua vez, induziu células exócrinas AR42J a se diferenciarem em células positivas para insulina, polipeptídeo pancreático e glucagon (53), assim como o seu análogo, *exendin 4*, estimulou a replicação e neogênese de células b em ratos diabéticos (54). Além disso, a ativação do receptor de GLP-1 exerceu um efeito sinérgico com o fator de transcrição PDX-1 e com o contato intercelular na ativação do gene da insulina numa linhagem de células b humanas (55).

Matrizes Extracelulares e Fatores de Adesão Celular

A diferenciação de tecidos durante o processo de desenvolvimento depende da expressão de moléculas reguladoras de interações intercelulares e interações entre a matriz extracelular e células (56,57). Moléculas de adesão celular pertencentes à superfamília de imunoglobulinas CAM e à família de *calcium dependent cadherins* exercem um papel importante no desenvolvimento pancreático (58,59). Demonstrou-se ainda que a expressão de conexina 43 promoveu a expressão do gene da insulina em uma linhagem celular derivada de insulinoma em ratos (60). A expansão *in vitro* de células pancreáticas endócrinas humanas tem sido favorecida com o uso de matrizes extracelulares, embora os sinais envolvidos neste mecanismo ainda não tenham sido identificados (24). Da mesma forma, o contato intercelular induz diferenciação em células pancreáticas primárias (26) assim como numa linhagem celular pancreática humana quando associado com a expressão do fator de transcrição PDX-1 (61).

Fatores de Transcrição

A indução da diferenciação em precursores da célula β ou em células extra-pancreáticas por meio da expressão de fatores de transcrição necessários para o desenvolvimento da célula β representa uma das possibilidades do emprego da terapia gênica em DM. Embora inúmeros avanços tenham ocorrido no estudo dos fatores de transcrição envolvidos no desenvolvimento pancreático, muitas lacunas ainda necessitam ser preenchidas (62-67).

O fator de transcrição PDX-1, também conhecido como IDX-1, IUF-1, STF-1 ou IPF-1, é encontrado no epitélio de onde se originam as evaginações pancreáticas durante o desenvolvimento embrionário (68). Camundongos homocigotos para mutações no gene PDX-1 apresentam agenesia completa do pâncreas, o que também foi encontrado em seres humanos (62,69). Além da ativação do gene da insulina, PDX-1 tem a capacidade de ativar outros genes fundamentais para as células das ilhotas de Langerhans tais como: GLUT 2, glicoquinase, polipeptídeo amilóide das ilhotas (IAPP) e somatostatina (70,71). Seres humanos heterocigóticos para mutações no gene PDX-1 apresentam MODY 4 (*maturity-onset diabetes of the young*) (72). Recentemente, a transferência hepática *in vivo* do gene PDX-1 em roedores resultou na obtenção de um pequeno número de células positivas para insulina (73).

A presença de MODY tem sido relacionada às alterações na expressão dos diferentes fatores de transcrição. MODY 1 e MODY 3 estão associados respectivamente a mutações nos genes *hepatocyte nuclear factor-4 α* (HNF-4 α) e HNF-1 α ; MODY 5 a mutações no gene HNF-1 β ; e MODY 2 a mutações no gene da glicoquinase (74-76).

Outros fatores de transcrição têm sido apontados como importantes para o desenvolvimento pancreático. Entre estes destaca-se o ISL1, cuja ausência em camundongos resulta na ablação do mesênquima dorsal pancreático, na falha de diferenciação das células exócrinas no pâncreas dorsal e na perda completa da diferenciação das ilhotas (63). Membros da família dos genes PAX, como PAX 6 e PAX 4, possuem também um papel na ontogênese pancreática. Deleções do gene PAX 6 em camundongos resultaram no número reduzido de todas as células do pâncreas endócrino, assim como na conseqüente diminuição da produção hormonal (66,77). Por outro lado, camundongos *knockout* para o gene PAX 4 apresentam completa ausência de células β e δ associada a hiperplasia de células α (65).

Alguns dos membros da família de fatores de transcrição NK2 *homeobox* têm sido descritos como de grande importância para o desenvolvimento da célula β . A remoção do gene Nkx 2.2 em camundongos resulta na ablação de células β e num número reduzido de células secretoras de glucagon e de polipeptídeo pancreático (67). A expressão do gene Nkx 6.1 é encontrada apenas em células β e sua ativação foi demonstrada quando células derivadas de um tumor de ilhotas assumiram o fenótipo de células produtoras de insulina (64,78). Estudos em ratos demonstraram

que Nkx6.1 é importante para o desenvolvimento pancreático, assim como para a função da célula β adulta (79). Recentemente, estudos em camundongos portadores de mutações em ambos Nkx6.1 e Nkx2.2 demonstraram que Nkx6.1 exerce sua ação no desenvolvimento da célula β *downstream* ao Nkx2.2 (80). NeuroD/Beta2 é um conhecido fator de transcrição do tipo *basic helix-loop-helix* (bHLH) encontrado em células pancreáticas endócrinas (81,82). Camundongos deficientes em NeuroD/Beta2 possuem um número reduzido de células endócrinas, especialmente células β (83). O papel dos fatores de transcrição bHLH no desenvolvimento endócrino a partir do endoderma sugere que a diferenciação destas células utilize mecanismos similares aos dos neurônios, como por exemplo o sistema de sinalização *Notch* (84). Estudos demonstraram que este sistema participa no desenvolvimento das células pancreáticas endócrinas, e que a ausência de um de seus ligantes, denominado *Delta-like gene* (85), ou de seu mediador intracelular Rpb-jk (86), resulta no aumento do número de células endócrinas pancreáticas (84). O mesmo fenótipo foi encontrado em camundongos onde um dos repressores de sinalização do *Notch*, Neurogenin 3, teve sua expressão aumentada (87,88). O sistema *Notch* possui um efeito antagônico nas proteínas β HLH que é devido, em parte, a um repressor da transcrição destas proteínas, denominado Hes-1 (89). Camundongos deficientes em Hes-1 apresentam hipoplasia pancreática severa devido à depleção de precursores pancreáticos epiteliais, causada pela diferenciação acelerada de células com expressão de glucagon. Hes-1, portanto, funciona como um regulador negativo da diferenciação endócrina a partir do endoderma (90).

LINHAGENS CELULARES PROVENIENTES DO PÂNCREAS ENDÓCRINO

O uso de linhagens celulares apresenta vantagens quando comparado ao uso de ilhotas ou células primárias. Linhagens celulares representam uma fonte de células com características estáveis e reproduzíveis. Oferecem ainda a possibilidade de serem modificadas *in vitro* por meio de transferência de genes, podendo ter suas propriedades otimizadas, além de não necessitarem do emprego de matrizes extracelulares ou de fatores de crescimento necessários para a expansão de células β primárias *in vitro*. O desenvolvimento de linhagens celulares a partir de células β tem sido extremamente importante no que se refere à ciência básica, pois representam excelentes ferramentas para a elucidação de mecanismos envolvidos na secreção de

insulina em resposta ao estímulo da glicose, na transcrição do gene da insulina e no isolamento de genes específicos para o pâncreas (91-93).

O desenvolvimento de linhagens celulares a partir de tecido pancreático de roedores tem apresentado um progresso significativo ao longo dos anos (91,92,94-96). As fontes de onde estas linhagens celulares foram obtidas incluem: insulinomas de origem espontânea (97), insulinomas induzidos por carcinógenos (98), insulinomas induzidos por vírus oncogênicos (99,100), insulinomas induzidos pela combinação de carcinógenos e vírus oncogênicos (100) e insulinomas derivados de camundongos transgênicos, os quais expressam oncogenes dominantes, em especial o antígeno SV40 T sob o controle do promotor da insulina (101-103). As linhagens celulares mais amplamente estudadas referem-se àquelas derivadas de insulinomas induzidos por radiação obtidos de ratos albinos NEDH (*New England Deaconess Hospital*) (98), destacando-se: RIN (104), MSL (105), INS (94), e CRI (106).

Embora linhagens celulares derivadas de roedores representem um excelente sistema de estudo para várias finalidades, existem certas limitações com respeito ao seu emprego para fins de pesquisa básica ou clínica. Várias diferenças biológicas têm sido apontadas entre células β provenientes de roedores e de seres humanos. Roedores possuem duas cópias do gene da insulina enquanto que seres humanos possuem apenas uma cópia, além de existirem diferenças no padrão de regulação genética em relação ao promotor do gene da insulina (107). O gene GLUT 2, fundamental para o transporte de glicose nas células β de roedores, não parece possuir o mesmo grau de importância no ser humano (108,109). Demonstrou-se que existem diferenças na resposta às citocinas inflamatórias entre ambas espécies (110), assim como a certos fatores de crescimento (24,31,111,112). Estas diferenças biológicas têm influenciado o estudo do desenvolvimento de linhagens de células β humanas.

Devido à grande dificuldade na obtenção de linhagens celulares provenientes de insulinomas espontâneos humanos (113-116), a maioria das linhagens de células β humanas têm sido desenvolvidas por meio da expressão de oncogenes (114,115,117,118). O uso de oncogenes proporciona vantagens no manejo de linhagens celulares, entre elas a possibilidade de escolha da célula primária de onde se deriva a linhagem. Além deste fato, o emprego de oncogenes conhecidos com efeitos definidos facilita o controle de seus efeitos no crescimento e diferenciação. Entre os oncogenes utilizados para a geração de linhagens celulares a partir de

células β humanas ou a partir de seus precursores destacam-se o antígeno SV40T e o H-ras val12 (118-120). Embora a introdução destes permita a proliferação das células além de sua sobrevivência esperada (121), após algum tempo em cultura estas células sofrem um processo denominado de "crise". Este é reconhecido como uma forma de senescência celular tardia (27), no qual observa-se uma parada no crescimento ou morte celular. A estratégia encontrada para se superar este problema baseia-se na restauração da atividade da telomerase por meio da introdução do gene da telomerase humana, especificamente a porção da transcriptase reversa (hTRT). Esta técnica, juntamente com a introdução dos oncogenes, possibilitou a imortalização celular (27).

Enquanto o uso de oncogenes associado à presença da telomerase permite a replicação indefinida das células, o mesmo exerce um profundo efeito repressor sobre sua capacidade de diferenciação. Entretanto, demonstramos que uma linhagem celular humana, TRM-6, derivada de ilhotas do pâncreas fetal, diferenciou-se numa linhagem de células δ por meio da expressão do fator de transcrição PDX-1 juntamente com a promoção do contato intercelular (61). Da mesma forma, observamos a indução da secreção de insulina em resposta ao estímulo da glicose *in vitro* e *in vivo* numa linhagem celular derivada de células β purificadas a partir de ilhotas pancreáticas adultas humanas, denominada blox5 (55). Esta é a primeira descrição na literatura de uma linhagem celular de células β humanas funcionais e representa um marco na busca de fontes de células para a terapia do DM por meio de transplante celular.

A possibilidade do transplante de células transformadas e ou imortalizadas traz, porém, o risco de tumorigênese. Linhagens celulares derivadas tanto de roedores (91,122) como de seres humanos (114,115,117,118) têm apresentado diferenciação, além de certa instabilidade fenotípica. Isto se deve ao fato de que estas células podem ter sua capacidade de diferenciação interrompida enquanto utilizam as funções necessárias para sua replicação. Além deste fato, mudanças fenotípicas podem ocorrer associadas à inerente instabilidade genética de células transformadas. A fim de se contornar este problema, têm sido desenvolvidas técnicas visando bloquear a expressão dos oncogenes logo após a obtenção de um número suficiente de células *in vitro*. Para isto, tem-se empregado o uso de promotores especiais para regulação da expressão da proteína do gene SVT40 (123). O promotor utilizado baseia-se no *bacterial tetracycline (tet) operon* (124). Outros promotores (117,118,123,125,126) e sistemas, como por exemplo o *cre-lox*

recombinase (27,127,128), o qual media a deleção completa dos oncogenes introduzidos, representam outras alternativas para a regulação da expressão de oncogenes. Estudos mostraram a deleção completa do gene SV40T de uma linhagem celular de hepatócitos humanos, com o emprego do sistema *cre-lox*, previamente ao transplante em ratos (129). Outra técnica consiste no uso de genes "suicidas" como, por exemplo, o gene herpesvírus tiosino quinase (TK), o qual torna as células susceptíveis ao ganciclovir (130).

ENGENHARIA GENÉTICA DE CÉLULAS EXTRA-PANCREÁTICAS

O interesse no estudo de células extra-pancreáticas como fonte de tecido para transplante em diabetes deve-se ao número insuficiente de doadores de pâncreas e ao risco de recorrências de resposta autoimune contra as células β transplantadas (131-134). Vários obstáculos devem ser contornados a fim de se obter células de origem não pancreática com capacidade de sintetizar e secretar insulina de modo fisiológico. Um dos maiores problemas refere-se ao processo de síntese da proinsulina, seu armazenamento em grânulos e sua secreção em resposta à glicose. O uso de promotores específicos tem permitido a expressão da preproinsulina em células extra-pancreáticas (135-137). Entretanto, células não originárias da linhagem neuroendócrina, como por exemplo fibroblastos ou miócitos, não possuem as endopeptidases necessárias para a clivagem da proinsulina em insulina. A fim de resolver este problema, o ponto de clivagem da proinsulina foi modificado, o que possibilitou sua clivagem por outra endopeptidase, furina, a qual é encontrada na maioria das células (138,139).

A necessidade de se reproduzir, por meio de manipulação genética, todo o complexo aparato necessário para a secreção de insulina em resposta ao estímulo da glicose, levou ao estudo de células que possuem originalmente algumas das características das células β , tais como as células hipofisárias, adrenais e hepáticas. Células neuroendócrinas como as encontradas na hipófise ou na glândula adrenal possuem o aparato necessário para a secreção de hormônios polipeptídeos em resposta a estímulos externos. A maioria dos estudos em células neuroendócrinas tem sido realizada em células derivadas de um tumor de células pituitárias corticotróficas de camundongo, denominada de AtT20 (135,140). Estas células apresentam endopeptidases PC2, PC3 (141) assim como glicoquinase (142), porém são deficientes em GLUT2. A expressão de GLUT 2 em células AtT20

promoveu a secreção de insulina em resposta à glicose, mas em níveis aquém do esperado do ponto de vista fisiológico (143,144). A expressão *in vivo* de GLUT2 e glicoquinase em células pituitárias de camundongos NOD resultou no controle da hiperglicemia nestes animais, entretanto sem resposta fisiológica da secreção de insulina à glicose (145).

Os hepatócitos, por outro lado, apresentam a capacidade de responder às variações dos níveis da glicemia pois possuem a expressão de GLUT 2 e glicoquinase. Entretanto, estas células não dispõem do aparato necessário para a secreção regulada de insulina, o que resulta na liberação contínua de proinsulina (132,136). A introdução *in vivo* do fator de transcrição PDX-1 em células hepáticas de roedores com DM induzido quimicamente, resultou na ativação endógena de ambos os genes da insulina, assim como das endopeptidases PC1 e PC3. Embora se tenha observado o controle da hiperglicemia nestes animais, as células responsáveis por esta resposta não foram bem caracterizadas, não se podendo afirmar, portanto, que tenham sido hepatócitos (73).

PERSPECTIVAS

Nos últimos vinte anos observou-se um crescente interesse no estudo do transplante celular para o tratamento do DM. O sucesso desta forma de terapia representaria a cura do DM com o fim de injeções, da monitorização da glicemia e do controle da dieta na tentativa de se manter a homeostase metabólica e de se reduzir a ocorrência das complicações tardias. Um grande esforço tem sido dedicado no desenvolvimento do transplante de ilhotas pancreáticas. Recentemente, observamos resultados extremamente encorajadores obtidos pelo grupo da *University of Alberta*, no Canadá (8). Entretanto, a escassez de tecido primário ainda representa um importante obstáculo que deve ser superado, tornando-se um dos maiores alvos para a terapia gênica nesta área. A dificuldade em se reproduzir as complexas funções da célula β torna o desenvolvimento de células secretoras de insulina a partir de células extra-pancreáticas uma tarefa extremamente árdua. Embora importantes avanços tenham ocorrido quanto à expansão *in vitro* de células primárias, o limitado entendimento da biologia da célula β ainda impede sua utilização em larga escala. A obtenção de células a partir de células tronco constitui uma alternativa extremamente interessante, mas ainda enfrenta os mesmos obstáculos quanto ao insuficiente conhecimento do desenvolvimento da célula β . Embora a geração de linhagens celulares represente uma alternativa

promissora, os problemas técnicos associados ao risco proveniente do emprego de oncogenes ainda devem ser superados. Enfim, a chave para a obtenção de uma terapia de reposição celular efetiva para DM dependerá, portanto, do melhor entendimento dos processos de crescimento e diferenciação da célula β .

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pelo NIDDK (DK 55065 and DK 55283), pela *Juvenile Diabetes Foundation* (197035) e pela *Stern Foundation* (Fred Levine), e pela Universidade Federal do Paraná (Carla Demeterco).

Esta revisão foi baseada no artigo "*Gene Therapy for Diabetes*", escrito pelos mesmos autores, atualmente em processo de revisão pela revista *Frontiers in Bioscience*.

REFERÊNCIAS

1. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. **N Engl J Med** 1993;329:977-86.
2. Gough DA, Armour JC. Development of the implantable glucose sensor: What are the prospects and why is it taking so long? **Diabetes** 1995;44:1005-9.
3. Kost J, Mitragotri S, Gabbay RA, Pishko M, Langer R. Transdermal monitoring of glucose and other analytes using ultrasound. **Nat Med** 2000;6(3):347-50.
4. Tamada JA, Bohannon NJV, Potts RO. Measurement of glucose in diabetic subjects using noninvasive transdermal extraction. **Nat Med** 1995;1:198-201.
5. Ballinger WF, Lacy PE. Transplantation of intact pancreatic islets in rats. **Surgery** 1972;72(2):175-86.
6. Warnock GL, Kneteman NM, Ryan EA, Rabinovitch A, Rajotte RV. Long-term follow-up after transplantation of insulin-producing pancreatic islets into patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. **Diabetologia** 1992;35(1):89-95.
7. Hering BJ, Brendel MD, Schultz AO, Schultz B, Bretzel RG. International islet transplant registry newsletter no. 7. Giessen, Germany: Justus-Liebig-University of Giessen. 1996, December.
8. Shapiro A, Lakey J, Ryan E, Korbutt G, Toth E, Warnock G, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. **N Engl J Med** 2000;343:230-8.
9. LaPorte RE MM, Chang Y-F. Prevalence and incidence of insulin-dependent diabetes. In: Harris MI CC, Stern MP, Boyko EJ, Reiber GE, Bennet PH, editors. Diabetes in America. Washington, DC;1995.
10. Hauptman PJ, KJ OC. Procurement and allocation of solid organ transplantation. **N Engl J Med** 1997;327:422-31.
11. Groth CG, Korsgren O, Tibell A, Tollemar J, Moller E, Bolinder J, et al. Transplantation of porcine fetal pancreas to diabetic patients. **Lancet** 1994;344:1402-4.
12. Groth CG, Tibell A, Wennberg L, Korsgren O. Xenoislet transplantation: experimental and clinical aspects. **J Mol Med** 1999;77(1):153-4.
13. Otsu I, Dunleavy K, Mullon CJP, Solomon BA, Monaco AP. Treatment of diabetes by xenogenetic islets without immunosuppression: Use of a vascularized bioartificial pancreas. **Diabetes** 1996;45:342-7.
14. Sun Y, Ma X, Zhou D, Vacek I, Sun AM. Normalization of diabetes in spontaneously diabetic cynomolgus monkeys by xenografts of microencapsulated porcine islets without immunosuppression. **J Clin Invest** 1996;98(6): 1417-22.
15. Onishi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda K, Awata T, et al. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei [see comments]. **Science** 2000;289 (5482):1188-90.
16. Bonner-Weir S, Davalli AM, Scaglia L, Hollister J, Weir GC. Myths about the structure and function of porcine islets. **Xenotransplantation** 1996;2:207-12.
17. Weir GC, Davalli AM, Ogawa Y, Scaglia L, Wu Y-J, Hollister J, et al. Transplantation of porcine islets in nude mice: implications for islet replacement therapy in humans. **Xenotransplantation** 1995;2:201-6.
18. Mirenda V, Le Mauff B, Cassard A, Huvelin JM, Boeffard F, Faivre A, et al. Intact pig pancreatic islet function in the presence of human xenoreactive natural antibody binding and complement activation. **Transplantation** 1997;63:1452-62.
19. McKenzie IF, Koulamanda M, Mandel TE, Sandrin MS. Pig islets xenografts are susceptible to "anti-pig" but not Gal alpha (1,3) Gal antibody plus complement in Gal o/o mice. **J Immunol** 1998;161.
20. Galili U, Tibell A, Samuelsson B, Rydberg L, Groth CG. Increased anti-Gal activity in diabetic patients transplanted with fetal porcine islet cell clusters. **Transplantation** 1995;59(11):1549-56.
21. Karlsson-Parra A, Ridderstad A, Wallgren AC, Möller E, Ljunggren HG, Korsgren O. Xenograft rejection of porcine islet-like cell clusters in normal and natural killer cell-depleted mice. **Transplantation** 1996;61(9):1313-20.
22. Patience C, Takeuchi Y, Weiss RA. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. **Nat Med** 1997;3:282-6.
23. Weiss RA. Transgenic pigs and virus adaptation. **Nature** 1998;391(6665):327-8.
24. Beattie GM, Cirulli V, Lopez AD, Hayek A. Ex vivo expansion of human pancreatic endocrine cells. **J Clin Endocrinol Metab** 1997;82:1852-6.
25. Beattie GM, Itkin-Ansari P, Cirulli V, Leibowitz G, Lopez AD, Bossie S, et al. Sustained proliferation of PDX-1+ cells derived from human islets. **Diabetes** 1999;48(5):1013-9.
26. Beattie GM, Rubin JS, Mally MI, Otonkoski T, Hayek A. Regulation of proliferation and differentiation of human fetal pancreatic islet cells by extracellular matrix, hepatocyte growth factor, and cell-cell contact. **Diabetes** 1996;45:1223-8.

27. Halvorsen T, Leibowitz G, Levine F. Telomerase activity is sufficient to allow transformed cells to escape from crisis. **Mol Cell Biol** 1999;19(3):1864-70.
28. Halvorsen T, Beattie G, Lopez A, Itkin-Ansari P, Hayek A, Levine F. *In vivo* glucose-responsive insulin secretion from a human pancreatic b-cell line. **Diabetes** 2000;49(Supplement 1):A32.
29. Demeterco C, Beattie GM, Dib SA, Lopez AD, Hayek A. A role for activin A and betacellulin in human fetal pancreatic cells differentiation and growth. **J Endocrinol Metab** 2000;85(10):3892-7.
30. Otonkoski T, Beattie GM, Mally MI, Ricordi C, Hayek A. Nicotinamide is a potent inducer of endocrine differentiation in cultured human fetal pancreatic cells. **J Clin Invest** 1993;92:1459-66.
31. Otonkoski T, Beattie GM, Rubin JS, Lopez AD, Baird A, Hayek A. Hepatocyte growth factor/scatter factor has insulinotropic activity in human fetal pancreatic cells. **Diabetes** 1994;43:947-53.
32. Tuch BE, Simpson AM. Experimental fetal islet transplantation. In: CR, editor. **Pancreatic Islet Cell Transplantation**. Pittsburgh, PA: R.G. Landes; 1992. p 279-90.
33. Kerr-Conte J, Pattou F, Lecomte-Houcke M, Xia Y, Boilly B, Proye C, et al. Ductal cyst formation in collagen-embedded adult human islet preparations. A means to the reproduction of nesidioblastosis *in vitro*. **Diabetes** 1996;45(8):1108-14.
34. Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song KH, Sharma A, et al. *In vitro* cultivation of human islets from expanded ductal tissue. **Proc Natl Acad Sci USA** 2000;97(14):7999-8004.
35. Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. **J Clin Invest** 1996;98:216-24.
36. Li ML, Pevny L, Lovell-Badge R, Smith AE. Generation of purified neural precursors from embryonic stem cells by lineage selection. **Curr Biol** 1998;8:971-4.
37. Soria B, Roche E, Berna G, Leon-Quinto T, JA R, F M. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. **Diabetes** 2000;49:157-62.
38. Ramiya VK, Maraist M, Arfors KE, Schatz DA, Peck AB, Cornelius JG. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated *in vitro* from pancreatic stem cells [see comments]. **Nat Med** 2000;6(3):278-82.
39. Golosow N, Grobstein C. Epitheliomesenchymal interaction in pancreatic morphogenesis. **Development** 1962;4:242-55.
40. Wessels NK, Cohen JH. Early pancreas organogenesis: morphogenesis, tissue interactions, and mass effects. **Dev Biol** 1967;15:237-70.
41. Keding M, Simon-Assmann P, Bouziges F, Arnold C, Alexandre E, Haffen K. Smooth muscle actin expression during rat gut development and induction in fetal skin fibroblastic cells associated with intestinal embryonic epithelium. **Differentiation** 1990;43:87-97.
42. Yamaoka T, Idehara C, Yano M, Matsushita T, Yamada T, Ii S, et al. Hypoplasia of pancreatic islets in transgenic mice expressing activin receptor mutants. **J Clin Invest** 1998;102(2):294-301.
43. Miralles F, Czernichow P, Scharfmann R. Follistatin regulates the relative proportions of endocrine versus exocrine tissue during pancreatic development. **Development** 1998;125(6):1017-24.
44. Mashima H, Ohnishi H, Wakabayashi K, Mine T, Miyagawa J, Hanafusa T, et al. Betacellulin and activin A coordinately convert amylase-secreting pancreatic AR42J cells into insulin-secreting cells. **J Clin Invest** 1996;97(7):1647-54.
45. Mashima H, Shibata H, Mine T, Kojima I. Formation of insulin-producing cells from pancreatic acinar AR42J cells by hepatocyte growth factor. **Endocrinology** 1996;137:3969-76.
46. Seno M, Tada H, Kosaka M, Sasada R, Igarashi K, Shing Y, et al. Human betacellulin, a member of the EGF family dominantly expressed in pancreas and small intestine, is fully active in a monomeric form. **Growth Factors** 1996;13(3-4):181-91.
47. Miettinen PJ, Otonkoski T, Voutilainen. Insulin-like growth factor-II and transforming growth factor-alpha in developing human fetal pancreatic islets. **J Endocrinol** 1993;138:127-36.
48. Sonnenberg E, Meyer D, Weidner KM, Birchmeier C. Scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and epithelia during mouse development. **J Cell Biol** 1993;123:223-35.
49. Calvo EL, Boucher C, Pelletier G, Morisset J. Ontogeny of hepatocyte growth factor and c-met/hgf receptor in rat pancreas. **Biochem Biophys Res Commun** 1996;229:257-63.
50. Otonkoski T, Cirulli V, Beattie GM, Mally MI, Soto G, Rubin JS, et al. A role for hepatocyte growth factor/scatter factor in fetal mesenchyme-induced pancreatic beta-cell growth. **Endocrinology** 1996;137:3131-9.
51. Garcia-Ocana A, Takane KK, Syed MA, Philbrick WM, Vasavada RC, Stewart AF. Hepatocyte growth factor overexpression in the islet of transgenic mice increases beta cell proliferation, enhances islet mass, and induces mild hypoglycemia. **J Biol Chem** 2000;275(2):1226-32.
52. Brelje TC, Parsons JA, Sorenson RL. Regulation of islet beta-cell proliferation by prolactin in rat islets. **Diabetes** 1994;43:263-73.
53. Zhou J, Wang X, Pineyro MA, Egan JM. Glucagon-like peptide 1 and exendin-4 convert pancreatic AR42J cells into glucagon- and insulin-producing cells. **Diabetes** 1999;48(12):2358-66.
54. Xu G, Stoffers DA, Habener JF, Bonner-Weir S. Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. **Diabetes** 1999;48(12):2270-6.
55. Dufayet de la Tour D, Halvorsen T, Demeterco C, Tyrberg B, Itkin-Ansari P, Loy M, et al. b-cell differentiation from a human pancreatic cell line *in vitro* and *in vivo*. **Mol Endocrinol** 2000;in press.

56. Edelman GM, Crossin K. Cell adhesion molecules: implication for a molecular histology. **Annu Rev Biochem** 1991;60:155-90.
57. Takeichi M. Morphogenetic roles of classic cadherins. **Curr Opin Cell Biol** 1995;7:619-27.
58. Dahl U, Sjødin A, Semb H. Cadherins regulate aggregation of pancreatic beta-cells *in vivo*. **Development** 1996;122(9):2895-902.
59. Cirulli V, Crisa L, Beattie GM, Mally MI, Lopez AD, Fannon A, et al. KSA antigen Ep-CAM mediates cell-cell adhesion of pancreatic epithelial cells: morphoregulatory roles in pancreatic islet development. **J Cell Biol** 1998;140(6): 1519-34.
60. Vozi C, Ullrich S, Charollais A, Philippe J, Orci L, Meda P. Adequate connexin-mediated coupling is required for proper insulin production. **J Cell Biol** 1995;131: 1561-72.
61. Itkin-Ansari P, Demeterco C, Bossie S, Dufayet de la Tour D, Movassat J, Mally M, et al. PDX-1 and cell-cell contact act in synergy to promote d-cell development in a human pancreatic endocrine precursor cell line. **Mol Endocrinol** 2000;14(6):814-22.
62. Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H. Insulin-promoter factor 1 is required for pancreas development in mice. **Nature** 1994;371:606-9.
63. Ahlgren U, Pfaff SL, Jessell TM, Edlund T, Edlund H. Independent requirement of ISL1 in formation of pancreatic mesenchyme and islet cells. **Nature** 1997;385:257-60.
64. Sander M, German MS. The beta cell transcription factors and development of the pancreas. **J Mol Med** 1997;75:327-40.
65. Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Torres M, Oliver G, Gruss P. The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas. **Nature** 1997;386:399-402.
66. St-Onge L, Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Mansouri A, Gruss P. Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing alpha-cells in mouse pancreas. **Nature** 1997;387:406-9.
67. Sussel L, Kalamaras J, Hartigan-O'Connor DJ, Meneses JJ, Pedersen RA, Rubenstein JL, et al. Mice lacking the homeodomain transcription factor Nkx2.2 have diabetes due to arrested differentiation of pancreatic beta cells. **Development** 1998;125(12):2213-21.
68. Slack JMW. Developmental biology of the pancreas. **Development** 1995;121:1569-80.
69. Stoffers DA, Zinkin NT, Stanojevic V, Clarke WL, Habener JF. Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. **Nat Genet** 1997;15:106-10.
70. Ohlsson H, Karlsson K, Edlund T. IPF1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene. **EMBO J** 1993;12:4251-9.
71. Habener JF, Stoffers DA. A newly discovered role of transcription factors involved in pancreas development and the pathogenesis of diabetes mellitus. **Proc Assoc Am Physicians** 1998;110(1):12-21.
72. Stoffers DA, Ferrer J, Clarke WL, Habener JF. Early-onset type II diabetes mellitus (MODY 4) linked to IPF1. **Nat Genet** 1997;17:138-9.
73. Ferber S, Halkin A, Cohen H, Ber I, Einav Y, Goldberg I, et al. Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia [In Process Citation]. **Nat Med** 2000;6(5):568-72.
74. Yamagata K, Furuta H, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Cx NJ, et al. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4a gene in maturity-onset diabetes of the young. **Nature** 1996;384:458-60.
75. Yamagata K, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Furuta H, Vaxillaire M, et al. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). **Nature** 1996;384:455-60.
76. Stoppoloni G, Iafusco D, Amodeo BM, De Felice E, Toraldo R, Betterle C, et al. A girl with diabetes and severe combined immunodeficiency from adenosine deaminase deficiency. **J Pediatr Endocrinol Metab** 1997;10(4): 425-8.
77. Sander M, Neubuser A, Kalamaras J, Ee HC, Martin GR, German MS. Genetic analysis reveals that PAX6 is required for normal transcription of pancreatic hormone genes and islet development. **Gen Dev** 1997; 11:1662-73.
78. Jensen J, Serup P, Karlson C, Funder Nielsen T, Madsen OD. mRNA profiling of rat islet tumors reveals Nkx 6.1 as a beta-cell-specific homeodomain transcription factor. **J Biol Chem** 1996;271:18749-58.
79. Oster A, Jensen J, Edlund H, Larsson LI. Homeobox gene product Nkx 6.1 immunoreactivity in nuclei of endocrine cells of rat and mouse stomach. **J Histochem Cytochem** 1998;46(6):717-21.
80. Sander M, Sussel L, Connors J, Scheel D, Kalamaras J, Cruz FD, et al. Homeobox gene Nkx6.1 lies downstream of Nkx2.2 in the major pathway of b-cell formation in the pancreas. **Development** 2000;127:5533-40.
81. Lee JE, Hollenberg SM, Snider L, Turner DL, Lipnick N, Weintraub H. Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. **Science** 1995;268:836-43.
82. Naya FJ, Stellrecht CMM, Tsai M-J. Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor. **Gen Dev** 1995;9:1009-19.
83. Naya FJ, Huang HP, Qiu Y, Mutoh H, DeMayo FJ, Leiter AB, et al. Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. **Gen Dev** 1997;11:2323-34.
84. Apelqvist A, Li H, Sommer L, Beatus P, Anderson DJ, Honjo T, et al. Notch signaling controls pancreatic cell differentiation. **Nature** 1999;400(6747):877-81.
85. Hrabe de Angelis M, McIntyre J, Gossler A. Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue Dll1. **Nature** 1997;386:717-21.
86. Oka C, Nakano T, Wakehan A, de la Pompa JL, Mori C, Sakai T, et al. Disruption of the mouse RPBjk gene. **Development** 1995;121:3291-301.

87. Lardelli M, Williams R, Mitsiadis T, Lendahl U. Expression of the Notch 3 intracellular domain in mouse central nervous system progenitor cells is lethal and leads to disturbed neural tube development. **Mech Dev** 1996;59:177-90.
88. Sommer L, Ma Q, Anderson DJ. Neurogenins, a novel family of atonal-related bHLH transcriptional factors, are putative mammalian neuronal determination genes that reveal progenitor cell heterogeneity in the developing CNS and PNS. **Mol Cell Neurosci** 1996;8:221-41.
89. Sasai Y, Kageyama R, Tagawa Y, Shigemoto R, Nakanishi S. 2 mammalian helix-loop-helix factors structurally related to drosophila hairy and enhancer of split. **Gen Dev** 1992;6:2620-34.
90. Jensen J, Pedersen EE, Galante P, Hald J, Heller RS, Ishibashi M, et al. Control of endodermal endocrine development by Hes-1. **Nat Genet** 2000;24:36-44.
91. Knaack D, Fiore DM, Surana M, Leiser M, Laurance M, Fuscodemane D, et al. Clonal insulinoma cell line that stably maintains correct glucose responsiveness. **Diabetes** 1994;43(12):1413-7.
92. Newgard CB. Cellular engineering and gene therapy strategies for insulin replacement in diabetes. **Diabetes** 1994;43(3):341-50.
93. Zhang Y, Warren-Perry M, Sakura H, Adelman J, Stoffel M, Bell GI, et al. No evidence for mutations in a putative beta-cell ATP-sensitive K⁺ channel subunit in MODY, NIDDM, or GDM. **Diabetes** 1995;44:597-600.
94. Asfari M, Janjic D, Meda P, Li G, Halban PA, Wollheim CB. Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. **Endocrinology** 1992;130:167-78.
95. Efrat S. Genetic engineering of beta-cells for cell therapy of diabetes: cell growth, function, and immunogenicity. **Diab Rev** 1996;4:224-34.
96. Poitout V, Olson LK, Robertson RP. Insulin-secreting cell lines: classification, characteristics and potential applications. **Diab Metab** 1996;22:7-14.
97. Rae PA, Yip CC, Schimmer BP. Isolation of cloned Syrian hamster insulinoma cell lines with limited capacity for insulin production. **Can J Physiol Pharmacol** 1979;57:819-24.
98. Chick WL, Warren S, Chute RN, Like AA, Lauris V, Kitchen KC. A transplantable insulinoma in the rat. **Proc Natl Acad Sci USA** 1977;74:628-32.
99. Uchida S, Watanabe S, Aizawa T, Furuno A, Muto T. Polyoncogenicity and insulinoma-inducing ability of BK virus, a human papovirus, in Syrian golden hamsters. **J Natl Cancer Inst** 1979;63:119-26.
100. Santerre RF, Cook RA, Crisel RMD, Sharp JD, Schmidt RJ, Williams DC, et al. Insulin synthesis in a clonal cell line of simian virus 40-transformed hamster pancreatic beta cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 1981;78:4339-43.
101. Hanahan D. Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. **Nature** 1985;315:33-40.
102. Radvanyi F, Christgau S, Baekkeskov S, Jolicœur C, Hanahan D. Pancreatic beta cells cultured from individual preneoplastic foci, in a multistage tumorigenesis pathway: a potentially general technique for isolating physiologically representative cell lines. **Mol Cell Biol** 1993;13:4223-32.
103. Drucker DJ. Molecular pathophysiology of glucagon-SV40 T antigen transgenic mice. **Am J Physiol** 1994;267:E629-E635.
104. Gazdar AF, Chick WL, Oie HK, Sims HL, King DL, Weir GC, et al. Continuous, clonal, insulin- and somatostatin-secreting cell lines established from a transplantable rat islet cell tumor. **Proc Natl Acad Sci USA** 1980;77:3519-23.
105. Madsen OD, Larsson L-I, Rehfeld JF, Schwartz TW, Lernmark A, Labrecque AD, et al. Cloned cell lines from a transplantable islet cell tumor are heterogeneous and express cholecystokinin in addition to islet hormones. **J Cell Biol** 1986;103:2025-34.
106. Carrington CA, Rubery ED, Pearson EC, Hales CN. Five new insulin-producing cell lines with differing secretory properties. **J Endocrinol** 1986;109:193-200.
107. Lund K, Blume N, Michelsen BK, Bucchini D, Madsen OD. Differential expression of non-allelic insulin genes in rodent islet tumour cells. **J Mol Endocrinol** 1993;11:305-18.
108. De Vos A, Heimberg H, Quartier E, Huypens P, Bouwens L, Pipeleers D, et al. Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase gene expression. **J Clin Invest** 1995;96(5):2489-95.
109. Ferrer J, Benito C, Gomis R. Pancreatic islet GLUT2 glucose transporter mRNA and protein expression in humans with and without NIDDM. **Diabetes** 1995;44:1369-74.
110. Eizirik DL, Pipeleers DG, Ling Z, Welsh N, Hellerstrom C, Andersson A. Major species differences between human and rodents in the susceptibility to pancreatic beta-cell injury. **Proc Natl Acad Sci USA** 1994;91:9253-6.
111. Sanvito F, Herrera P-L, Huarte J, Nichols A, Montesano R, Orci L, et al. TGF-beta1 influences the relative development of the exocrine and endocrine pancreas *in vitro*. **Development** 1994;120:3451-62.
112. Hayek A, Beattie GM, Cirulli V, Lopez AD, Ricordi C, Rubin JS. Growth factor/matrix-induced proliferation of human adult beta-cells. **Diabetes** 1995;44:1458-60.
113. Gueli N, Toto A, Palmieri G, Carmenini G, Delpino A, Ferrini U. *In vitro* growth of a cell line originated from a human insulinoma. **J Exp Clin Cancer Res** 1987;6:281-5.
114. Soldevila G, Buscema M, Marini V, Sutton R, James RFL, Bloom SR, et al. Transfection with SV40 gene of human pancreatic endocrine cells. **J Autoimmun** 1991;4:381-96.
115. Wang S, Beattie G, Mally M, Cirulli V, Itkin-Ansari P, Lopez AD, et al. Isolation and characterization of a cell line from the epithelial cells of the human fetal pancreas. **Cell Transplant** 1997;6:59-67.
116. Wang S, Beattie GM, Mally MI, Cirulli V, Lopez AD, Hayek A, et al. Development and characterization of cell line from human pancreatic beta-cells and beta-cell precursors using retroviral vectors expressing SV40 T-antigen and H-rasval12. **Diabetes** 1996;45 suppl 2:285A.
117. Levine F, Wang S, Beattie GM, Mally MI, Cirulli V, Lopez AD, et al. Development of a cell line from the human fetal pancreas. **Transplant Proc** 1995;27(6):3410.

118. Wang S, Beattie GM, Mally MI, Lopez AD, Hayek A, Levine F. Analysis of a human fetal pancreatic islet cell line. **Transplant Proc** 1997;29:2219.
119. Levine F, Wang S, Beattie GM, Mally MI, Cirulli V, Lopez AD, et al. Properties of human pancreatic beta-cell lines developed using retroviral vectors expressing SV40 T antigen and H-ras-val12. **Diabetologia** 1997;40 (Suppl 1):A118.
120. Wang S, Beattie GM, Mally MI, Cirulli V, Itkin-Ansari P, Lopez AD, et al. Isolation and characterization of a cell line from the epithelial cells of the human fetal pancreas. **Cell Transplant** 1997;6(1):59-67.
121. Bryan TM, Reddel RR. SV40-induced immortalization of human cells. **Crit Rev Oncog** 1994;5:331-57.
122. Efrat S, Leiser M, Surana M, Tal M, Fuscodemane D, Fleischer N. Murine Insulinoma Cell Line With Normal Glucose-Regulated Insulin Secretion. **Diabetes** 1993;42(6): 901-7.
123. Efrat S, Fuscodemane D, Lemberg H, Alemran O, Wang XR. Conditional transformation of a pancreatic beta-cell line derived from transgenic mice expressing a tetracycline-regulated oncogene. **Proc Natl Acad Sci USA** 1995;92(8):3576-80.
124. Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. **Proc Natl Acad Sci USA** 1992;89:5547-51.
125. Wang P, Anton M, Graham FL, Bacchetti S. High frequency recombination between loxP sites in human chromosomes mediated by an adenovirus vector expressing Cre recombinase. **Somat Cell Mol Genet** 1995;21(6):429-41.
126. Wang S, Beattie GM, Hayek A, Levine F. Development of a VSV-G protein pseudotyped retroviral vector system expressing dominant oncogenes from a lacO-modified inducible LTR promoter. **Gene** 1996;182(1-2):145-50.
127. Zou Y-R, Muller W, Gu H, Rajewsky K. Cre-loxP-mediated gene replacement: a mouse strain producing humanized antibodies. **Curr Biol** 1994;4:1099-103.
128. Metzger D, Clifford J, Chiba H, Chambon P. Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. **Proc Natl Acad Sci USA** 1995;92:6991-5.
129. Kobayashi N, Fujiwara T, Westerman KA, Inoue Y, Sakaguchi M, Noguchi H, et al. Prevention of acute liver failure in rats with reversibly immortalized human hepatocytes [see comments]. **Science** 2000;287 (5456):1258-62.
130. Moolten FL. Drug sensitivity ("suicide") gene for selective cancer chemotherapy. **Cancer Gene Ther** 1994;1:279-87.
131. Taniguchi H, Nakauchi H, Iwata H, Amemiya H, Fukao K. Treatment of diabetic mice with encapsulated fibroblasts producing human proinsulin. **Transplant Proc** 1992; 24:2977-8.
132. Kolodka TM, Finegold M, Moss L, Woo SL. Gene therapy for diabetes mellitus in rats by hepatic expression of insulin. **Proc Natl Acad Sci USA** 1995;92(8):3293-7.
133. Bartlett RJ, Secore SL, Denis M, Fernandez L, Tzakis A, Alejandro R, et al. Toward the biologic release of human insulin from skeletal muscle. **Transplant Proc** 1997;29(4): 2199-200.
134. Goldfine ID, German MS, Tseng HC, Wang J, Bolaffi JL, Chen JW, et al. The endocrine secretion of human insulin and growth hormone by exocrine glands of the gastrointestinal tract. **Nat Biotechnol** 1997;15(13):1378-82.
135. Moore H-P, Walker MD, Lee F, Kelly RB. Expressing a human proinsulin cDNA in a mouse ACTH-secreting cell. Intracellular storage, proteolytic processing, and secretion on stimulation. **Cell** 1983;35:531-8.
136. Vollenweider F, Irminger J-C, Gross DJ, Villa-Komaroff L, Halban PA. Processing of proinsulin by transfected hepatoma (FAO) cells. **J Biol Chem** 1992;267:14629-36.
137. Simpson AM, Tuch BE, Swan MA, Tu J, Marshall GM. Functional expression of the human insulin gene in a human hepatoma cell line (HEP G2). **Gene Ther** 1995;2:223-31.
138. Groskreutz DJ, Sliwkowski MX, Gorman MX. Genetically engineered proinsulin constitutively processed and secreted as mature, active insulin. **J Biol Chem** 1994;269: 6241-5.
139. Falqui L, Martinenghi S, Severini GM, Corbella P, Taglietti MV, Arcelloni C, et al. Reversal of diabetes in mice by implantation of human fibroblasts genetically engineered to release mature human insulin [see comments]. **Hum Gene Ther** 1999;10(11):1753-62.
140. Furth J, Gadsen EL, Upton AC. ACTH secreting transplantable pituitary tumors. **Proc Soc Exp Biol Med** 1953; 84:253-4.
141. Vindrola O, Lindberg I. Biosynthesis of the prohormone convertase mPC1 in AtT-20 cells. **Mol Endocrinol** 1992;6:1088-94.
142. Hughes SD, Quaade C, Milburn JL, Cassidy LC, Newgard CB. Expression of normal and novel glucokinase mRNAs in anterior pituitary and islet cells. **J Biol Chem** 1991;266:4521-30.
143. Hughes SD, Johnson JH, Quaade C, Newgard CB. Engineering of glucose-stimulated insulin secretion and biosynthesis in non-islet cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 1992;89:688-92.
144. Hughes SD, Quaade C, Johnson JH, Ferber S, Newgard CB. Transfection of AtT-20ins cells with GLUT-2 but not GLUT-1 confers glucose-stimulated insulin secretion. **J Biol Chem** 1993;268:15205-12.
145. Lipes MA, Faradji R, Havari E, Mulligan RC. Cellular engineering approaches to the treatment of IDDM. **Diabetes** 1999;A244.

Endereço para correspondência:

Carla Demeterco
10901 N. Torrey Pines Rd.
Building Seven, First Floor
UCSD Cancer Center
92.093-0912, La Jolla, CA, USA
FAX: 858-822-4181
e.mail: cdemeter@ucsd.edu