

TRABAJO ORIGINAL 2^{DO} PREMIO A COMUNICACIONES LIBRES ENTREGADO EN EL XIII CONGRESO DE LA SAEM

Efecto del INGAP (Proteína Asociada a la Neogénesis Insular) sobre la secreción de insulina de islotes pancreáticos de ratas adultas y recién nacidas.

Effect of INGAP (Islet Neogenesis Associated Protein) upon insulin secretion of pancreatic islets from adults and neonatal rats.

Borelli, M.I.¹; Stoppiglia, L.F.²; Rezende, L.F.²; Flores, L.E.¹; Del Zotto, H.¹; Boschero, A.C.²; Gagliardino, J.J. ¹

¹ CENEXA, Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (UNLP - CONICET, Centro Colaborador OPS/OMS), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, ² Departamento de Fisiología y Biofísica, Instituto de Biología, Universidad Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil.

Resumen

El objetivo del trabajo fue estudiar el efecto del péptido sintético 15aa- del INGAP (Proteína Asociada a la Neogénesis Insular), derivado de la secuencia de aminoácidos de la molécula del INGAP, sobre la secreción de insulina. Para ello aislamos islotes de ratas Wistar macho adultas y de neonatos y los cultivamos en presencia de glucosa 10 mM con o sin el agregado de 15aa-INGAP 30 µM. Posteriormente incubamos estos islotes con glucosa (2.8, 8.3 y 16.7 mM), leucina y arginina (10 mM). La insulina se determinó en el medio de incubación por radioinmunoanálisis. El pentadecapéptido de INGAP aumentó significativamente la secreción de insulina en respuesta a los diferentes estímulos estudiados tanto en los islotes de ratas adultas como de recién nacidas. Los valores de insulina fueron significativamente más altos en los islotes de ratas adultas. Nuestros resultados demuestran por primera vez que el pentadecapéptido del INGAP incrementa la respuesta secretora de las células pancreáticas. Por lo tanto, su empleo representaría una alternativa terapéutica potencial para la prevención y el tratamiento de la diabetes.

Abstract

Aim: This study was undertaken to determine the effect of 15aa-INGAP upon insulin secretion.

Material and methods: Isolated islets (collagenase) from normal male adult or neonatal Wistar rats were cultured (4 days) in RPMI 1640 medium, in the presence of 10mM glucose with or without the addition of 15aa-INGAP to the medium (30µM). After culture, the islets were incubated during 90 min in the presence of 2.8, 8.3 or 16.7 mM glucose, or 8.3 mM glucose plus 10mM leucine or arginine. Insulin was measured in the incubation medium by radioimmunoassay.

Dirección Postal: Dr. Juan José Gagliardino. CENEXA (UNLP-CONICET), Facultad de Ciencias Médicas, Calles 60 y 120 - 1900 La Plata. Teléfono: (0021) 423 67 12. Fax: (0021) 422 20 81. E-mail: cenexa@speedy.com.ar

Palabras clave: INGAP, secreción de insulina, páncreas endocrino

Key words: INGAP, Insulin Secretion, Endocrine Pancreas

Results: Insulin secretion of islets from either neonatal or adult rats was significantly enhanced in the presence of 15aa-INGAP in the culture media in response to glucose or other secretagogues (leucine and arginine). Islets from adult rats released significantly larger amounts of insulin than those from newborn rats.

Conclusions: Our results demonstrate for the first time that INGAP enhanced the β -cell response to glucose and aminoacids. Therefore, INGAP would represent a treatment alternative for patients with diminished insulin secretion.

Introducción

Numerosos genes, hormonas y factores de crecimiento local están involucrados en el desarrollo y crecimiento de los islotes pancreáticos¹. Uno de estos factores es el INGAP (proteína asociada a la neogénesis insular, Islet NeoGenesis Associated Protein), que fuera descubierto en 1983 por Rosenberg y col. cuando hallaron que la envoltura en celofán de la cabeza del páncreas de hamsters normales inducía neogénesis insular². Del extracto parcialmente purificado obtenido de la cabeza de estos páncreas aislaron un complejo proteico denominado "ilotropina", capaz de inducir la neoformación de islotes pancreáticos³. Posteriormente se demostró que la ilotropina podía revertir en un 50% la diabetes inducida en hamsters mediante la inyección de estreptozotocina⁴.

Este grupo de investigadores también identificó el gen del INGAP, cuyo producto de expresión es una proteína de 171 aminoácidos (20 kDa) que sería la responsable del efecto neogénico insular⁵. Asimismo demostraron que un péptido de 15 aminoácidos derivado del INGAP (15aa-INGAP) ejerce la misma acción biológica que la proteína completa, estimulando la incorporación de timidina tritiada en células ductales del páncreas⁵.

Rafaeloff y col. plantearon inicialmente que el INGAP se sintetizaba sólo en el páncreas exocrino⁵; sin embargo nuestro grupo demostró que: a) el aumento significativo de células INGAP positivas en el páncreas de animales con hiperplasia y neogénesis insular consecutiva a la insulinoresistencia inducida por dieta rica en sacarosa ocurre primordialmente a nivel insular⁶, y b) la presencia de la proteína INGAP y su ARNm en islotes pancreáticos de hamsters normales⁷. Además de demostrar la presencia del INGAP en hamsters, también se lo halló, mediante técnicas inmunocitoquímicas, en

páncreas de fetos de ratones⁸, en ratas normales adultas (Del Zotto y col., datos no publicados) y en tumores pancreáticos humanos^{9,10}.

Hasta el momento se desconoce el posible efecto del INGAP sobre la secreción de insulina. Para responder dicho interrogante, en el presente trabajo estudiamos la secreción de insulina en respuesta a glucosa y aminoácidos en islotes de rata normales previamente cultivados con glucosa, con o sin el agregado de INGAP.

Material y Métodos

Drogas y reactivos

Colagenasa tipo V, albúmina sérica bovina (ASB) y otros reactivos del más alto grado de pureza se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), mientras que ¹²⁵I proviene de Amersham (Buckinghamshire, UK).

Animales de experimentación y aislamiento de islotes

Los experimentos se hicieron con ratas Wistar recién nacidas (RN) (1 ó 2 días de edad) y adultas (A) (4 a 6 meses de edad). Para el aislamiento de islotes, las ratas se sacrificaron por decapitación, se les extrajo el páncreas y posteriormente esos páncreas fueron digeridos con colagenasa¹¹. Los islotes se lavaron para remover el resto de colagenasa y se cultivaron bajo diversas condiciones.

Cultivo de islotes

Los islotes de RN y A se cultivaron a 37° C durante 4 días en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con NaHCO₃ 2 g/l, 1% penicilina/estreptomycin, pH 7.4, 5% de suero fetal bovino y glucosa (G) 10 mM, con o sin el agregado de 30 μ M de INGAP. El medio se cambió cada 48 horas.

Secreción de insulina "in vitro"

Luego del cultivo, los islotes se preincubaron durante 60 minutos a 37° C en 1.0 ml de buffer Krebs-Ringer bicarbonato (KRB), pH 7.4, previamente gaseado con una mezcla de CO₂/O₂ (5%/95%), conteniendo 1.5 % (p/v) ASB y 5.6 mM de G. Después de este período, grupos de 5 islotes de RN o A se incubaron durante 90 minutos en las mismas condiciones, más el agregado de diferentes concentraciones de G (2.8, 8.3 y 16.7 mM); en otra serie de experimentos, islotes de ambos grupos se incubaron en presencia de 8.3 mM de G con el agregado de L-leucina (Leu) o L-arginina (Arg) (10 µM)¹². Al final del período de incubación, se tomaron alícuotas del medio para medir posteriormente insulina por radioinmunoanálisis¹³.

Análisis estadístico

La media ± EEM de los valores de secreción de insulina se compararon utilizando el test de Turkey-Kramer (ANOVA). El valor de p aceptado como estadísticamente significativo fue < 0.05.

Resultados

La secreción de insulina en islotes de RN (Tabla I) y A (Tabla II) aumentó en función de la concentración de G en el medio de incubación. La cantidad absoluta de insulina liberada fue significativamente mayor en los islotes de A, al igual que el porcentaje de incremento en función de la concentración de G (G mM 2.8 vs. 8.3 y 8.3 vs. 16.7, A= 307% y 165% vs. RN= 98% y 93%). Los islotes de A también liberaron

más insulina en respuesta al estímulo glucosa-aminoácidos. El agregado de 15aa-INGAP 30 µM aumentó significativamente la liberación de insulina en A y RN en todas las condiciones experimentales estudiadas (Tablas I y II); el incremento de la respuesta secretora inducido por el pentadecapéptido fue mayor en A, exceptuando la concentración de G 16.7 mM (A vs. RN, G mM = 2.8, 390 vs. 245; 8.3, 662 vs. 128; 16.7, 175 vs. 231; 8.3 + Arg, 246 vs. 173; 8.3 + Leu, 249 vs. 192).

Discusión

En estudios previos demostramos que el incremento del contenido de INGAP registrado en los islotes de hamsters normales alimentados con dieta rica en sacarosa, coincidía con un aumento de la liberación de insulina en respuesta a la glucosa⁶. Los resultados actuales demuestran por primera vez que islotes aislados de RN o A normales y cultivados con el péptido de 15aa-INGAP liberan más insulina que los islotes control en respuesta a diferentes concentraciones de glucosa y aminoácidos (Arg y Leu).

La molécula de INGAP presenta homología con la familia de los genes Reg descritos por Abe y col.¹⁴, cuyos productos de expresión también afectan la regeneración de islotes. Para verificar si el efecto del INGAP sobre la neogénesis insular se relacionaba con el de esas proteínas, Rafaeloff y col. seleccionaron en la molécula de INGAP una secuencia de 15 aminoácidos que no se encuentra en la proteínas Reg y sintetizaron el 15aa-INGAP. Este pen-

Tabla 1. Secreción de insulina de islotes de ratas recién nacidas.

	Control	15aa- INGAP (30 µM)
G 2.8 mM	0.82 ± 0.06	2.83 ± 0.74*
G 8.3 mM	1.62 ± 0.06	3.70 ± 0.29*
G 16.7 mM	3.12 ± 0.13	10.32 ± 0.86*
G 8.3 mM + Arg 10 mM	3.98 ± 0.32	10.87 ± 0.23*
G 8.3 mM + Leu 10 mM	3.43 ± 0.38	10.02 ± 0.56*

Los valores de secreción de insulina (ng/islote/h) se expresan como la X ± EEM. En todos los casos, n = 6 y *p < 0.05 control vs 15aa INGAP. G: glucosa; Arg: arginina; Leu: leucina.

Tabla 2. Secreción de insulina de islotes de ratas adultas.

	Control	15aa- INGAP (30 µM)
G 2.8 mM	1.07 ± 0.11	5.24 ± 0.17*
G 8.3 mM	4.36 ± 0.25	33.32 ± 2.82*
G 16.7 mM	11.55 ± 0.99	31.81 ± 1.27*
G 8.3 mM + Arg 10 mM	10.39 ± 0.52	36.00 ± 2.90*
G 8.3 mM + Leu 10 mM	9.82 ± 0.43	34.25 ± 1.30*

Los valores de secreción de insulina (ng/islote/h) se expresan como la X ± EEM. En todos los casos, n = 6 y *p < 0.05 control vs 15 aa INGAP. G: glucosa; Arg: arginina; Leu: leucina.

tadecapéptido estimuló la incorporación de timidina tritiada en células del epitelio pancreático ductal y de una línea de células epiteliales del páncreas (ARIP), pero no afectó dicha incorporación en islotes normales o en líneas de células tumorales ⁵. En función de esos resultados los autores concluyeron que el efecto neogénico del INGAP era independiente de su posible homología con las proteínas Reg. Como sustento a esta interpretación, recientemente los mismos autores demostraron que la regulación de la expresión de ambas proteínas sería diferente, ya que existen importantes diferencias en los sitios promotores de sus respectivos genes ¹⁵.

Aunque todavía no se ha aislado un receptor de INGAP, es probable que en nuestras condiciones experimentales, al igual que en el caso de la incorporación de timidina en los experimentos de Rafaeloff y col. ⁵, el INGAP afecte la secreción de insulina a través de la interacción de su pentadecapéptido con algún receptor insular. La demostración previa de que el INGAP estimula la neogénesis insular por un mecanismo de tipo paracrino ¹⁶ apoya esta hipótesis. La verificación de dicha posibilidad es parte de las investigaciones en curso en nuestro laboratorio.

En nuestras condiciones experimentales, los islotes de ratas adultas cultivados con o sin el pentadecapéptido de INGAP liberaron más insulina que los islotes de las ratas recién nacidas en respuesta a la glucosa y a los aminoácidos. Esto se explicaría por la maduración del sistema secretor de las células luego del nacimiento ¹⁷.

Aunque todavía no se conoce el mecanismo de acción del INGAP y de su pentadecapéptido –receptor específico y cascada de mediadores intracelulares– estos resultados y otros previos referidos a su efecto neogénico ^{5,6} tienen un gran potencial médico. En efecto, el INGAP y/o su pentadecapéptido podrían ser útiles para recuperar la masa y función de las células en personas con diabetes. Esta alternativa adquiere mayor importancia si se considera la prevalencia actual de la diabetes, su crecimiento estimado y su elevado costo socioeconómico ¹⁸. En este sentido, y considerando que la forma de presentación más frecuente de la diabetes es la del adulto, es importante consignar como hecho favorable que la respuesta al pentadecapéptido fue mayor en islotes de animales adultos que en los de recién nacidos.

En resumen, nuestros resultados demuestran que el pentadecapéptido del INGAP aumentó la capacidad liberadora de insulina de islotes de ratas normales recién nacidas y adultas. Este efecto, sumado al ejercido sobre la neogénesis insular, convierten al INGAP en una alternativa terapéutica potencial para la prevención y el tratamiento de la diabetes.

Agradecimientos

El trabajo se realizó con fondos de CONICET y de las Fundaciones brasileñas FAPESP y CNPQ/PRONEX. Los autores agradecen a LA Di Maggio y A. Díaz por su colaboración en la edición del manuscrito y la realización del radioinmunoanálisis respectivamente. Asimismo agradecen a ME Amaral y EP Araujo por la asistencia técnica brindada.

Bibliografía

1. Edlund, H. Developmental biology of the pancreas. *Diabetes* 2001; 50: (Suppl 1) S5–S9.
2. Rosenberg, L.; Brown, R.A.; Duguid, W.P. A new approach to the induction of duct epithelial hyperplasia and nesidioblastosis by cellophane wrapping of the hamster pancreas. *J Surg Res* 1983; 35:63-72.
3. Pittenger, G.L.; Vinik, A.I.; Rosenberg, L. The partial isolation and characterization of ilotropin, a novel islet-specific growth factor. *Adv Exp Med Biol* 1992; 321:123–130.
4. Gold, G.; Broderick, C.; Carfagna, M. y col. INGAP treatment improves glycemic control in SZ diabetic hamsters. *Diabetes* 1998; 47:(Suppl. 1): A253.
5. Rafaeloff, R.; Pittenger, G.L.; Barlow, S.W. y col. Cloning and sequencing of the pancreatic islet neogenesis associated protein (INGAP) gene and its expression in islet neogenesis in hamsters. *J Clin Invest* 1997; 99:2100–2109.

6. Gagliardino, J.J.; Del Zotto, H.; Massa, L. y col. The pancreatic duodenal homeobox-1 (Pdx-1)/Islet neogenesis-associated protein (INGAP): A possible combined marker of activable islet-cell precursors. *J Endocrinol* 2003; 177:249-259.
7. Flores, L.E.; García, M.E.; Borelli, M.I. y col. Expression of islet neogenesis-associated protein in islets of normal hamsters. *J Endocrinol* 2003; 177:243-248.
8. Rafaeloff-Phail, R.; Shmitt, E.; Edlund, H. y col. Expression of INGAP during ontogeny of the pancreas. *Diabetes* 1998; 47(Suppl.1):A259.
9. Rafaeloff-Phail, R.; Schmitt, E.; Sandusky, G. y col. Is a human cytokine expressed only in the presence of islet neogenesis? *Diabetes* 1998; 47(Suppl. 1): A259.
10. Semakula, C.; Pambuccian, S.; Gruessner, R. y col. Clinical case seminar: hypoglycemia after pancreas transplantation: association with allograft nesidiodyplasia and expression of islet neogenesis-associated peptide. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:3548-3554.
11. Lacy, P.E.; Kostianovsky, M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 1967; 16:35-39.
12. Sodoyez-Goffaux, F.; Sodoyez, J.C.; De Vos, C.J. y col. Insulin and glucagon secretion by islets isolated from fetal and neonatal rats. *Diabetologia* 1979; 16:121-123.
13. Herbert, V.; Lau, K.S.; Gottlieb, C.W. y col. Coated charcoal immunoassay of insulin. *J Clin Endocrinol Metab* 1965; 25:1375-1384.
14. Abe, M.; Nata, K.; Akiyama, T. y col. Identification of a novel Reg family gene, Reg III delta, and mapping of all three types of Reg family gene in a 75 kilobase mouse genomic region. *Gene* 2000; 246:111.
15. Taylor-Fishwick, D.A.; Rittman, S.; Kendall, H. y col. Cloning genomic INGAP: a Reg-related family member with distinct transcriptional regulation sites. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1638:8389.
16. Rosenberg, L.; Vinik, A.I.; Pittenger, G.L. y col. Islet-cell regeneration in the diabetic hamster pancreas with restoration of normoglycaemia can be induced by a local growth factor(s). *Diabetologia* 1996; 39:256-62.
17. Asplund, K. The effect of glucose on the insulin secretion in foetal and newborn rats. In: *The structure and metabolism of the pancreatic islets. Proceedings of an International symposium, Umea, Sweden.* Ed Pergamon Press 1969; 16:477-485.
18. Mc Carty, D.; Zimmet, P. *Diabetes 1994 to 2010: Global estimates and projections.* Merilbourne International Diabetes Institute, 1994.

“Es una locura amar a menos que se ame con locura”.