

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

TEMA: SALUD PÚBLICA

**REGULACIÓN DE LA MASA DE CÉLULAS BETA EN HAMSTERS NORMALES  
TRATADOS CON INGAP-PP**

Madrid Viviana, Del Zotto Héctor, Maiztegui Bárbara, Borelli María Inés, Alzugaray Eugenia y  
Gagliardino Juan José. [vivianamadrid@hotmail.com](mailto:vivianamadrid@hotmail.com)

PALABRAS CLAVE: HAMSTERS, INGAP-PP, CÉLULA BETA

## **INTRODUCCIÓN**

El INGAP (proteína asociada a la neogénesis insular, Islet NeoGenesis Associated Protein), fue descubierto en 1983 por Rosenberg y col. cuando descubrieron que la envoltura en celofán de la cabeza del páncreas de hamsters normales inducía neogénesis insular (1). Del extracto parcialmente purificado obtenido de la cabeza de estos páncreas aislaron un complejo proteico denominado "ilotropina", capaz de inducir la neoformación de islotes pancreáticos (2). Posteriormente se demostró que la administración de ilotropina podía revertir en un 50% la diabetes inducida en hamsters mediante la inyección de estreptozotocina (3). Este mismo 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 insular de la ilotropina (4). Asimismo, demostraron que un péptido de 15 aminoácidos derivado del INGAP (INGAP-PP) ejerce la misma acción biológica que la proteína completa(4). Rafaeloff y colaboradores plantearon inicialmente que el INGAP se sintetizaba únicamente en el páncreas exocrino; sin embargo, nuestro grupo demostró posteriormente a) que 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 insular (5), y b) la presencia de la proteína INGAP y su ARNm en islotes pancreáticos de hamsters normales (6). Además de la evidencia inmunocitoquímica de la presencia del INGAP en hamsters, también se lo encontró en el páncreas de fetos de ratones (7), en ratas adultas normales (8) y en tumores pancreáticos humanos (9). La administración de INGAP-PP en dosis farmacológicas a ratones con diabetes inducida por inyección de estreptozotocina disminuyó significativamente el porcentaje de animales diabéticos e incrementó la masa insular (10). Recientemente nuestro grupo de trabajo demostró que el agregado de INGAP-PP al medio de cultivo aumenta el tamaño de las células  $\beta$  de islotes de ratas adultas y neonatales y la secreción de insulina en respuesta al estímulo de glucosa y aminoácidos (11).

**OBJETIVO:** estudiar el efecto de la administración de INGAP-PP a hamsters adultos normales sobre la regulación de la masa de células  $\beta$  y la homeostasis de la glucosa.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Utilizamos hamsters Sirios machos adultos normales (90-110 g) mantenidos en cuartos con temperatura de 23 °C, un ciclo de luz/oscuridad constante de 12 h (06.00-18.00 h) y una dieta comercial estándar y bebida ad libitum. Dividimos a los animales en dos grupos: inyectados con 0.3 ml de solución fisiológica intraperitoneal cada 12 h durante 10 días (Control), o con el mismo volumen de esa solución conteniendo 500  $\mu$ g de INGAP-PP

(INGAP-PP). Al cabo de ese lapso sacrificamos los animales para realizar diferentes estudios. Al momento del sacrificio (dislocación cervical) controlamos el peso de los animales y obtuvimos muestras de sangre del plexo retroorbitario para la determinación de glucemia mediante tiras reactivas y glucómetro One Touch (Johnson & Johnson), de triglicéridos (12) e insulinemia por radioinmunoanálisis (RIA) (13). Con los valores de glucemia e insulinemia determinamos posteriormente la reserva funcional  $\beta$  mediante cálculo del HOMA (14). Se extrajo el páncreas que luego fue digerido con colagenasa (15). Para medir la secreción de insulina incubamos islotes aislados durante 60 min a 37 °C en 0,6 ml de buffer Krebs-Ringer bicarbonato, pH 7,4, previamente gaseado con una mezcla de CO<sub>2</sub>/ O<sub>2</sub> (5%/95%), conteniendo 1,5 % (p/v) de BSA y diferentes concentraciones de glucosa (3,3, 8,3 y 16,7 mM). Al final del período de incubación, tomamos alícuotas del medio para medir insulina por RIA (13). Se evaluó el contenido de ADN en homogenado de islotes empleando la técnica de Labarca y Paigen (16). Se removieron los páncreas enteros y se pesaron; luego se fijaron en Bouin y se los incluyó en parafina. Posteriormente se obtuvieron secciones de 5  $\mu$ m de tres diferentes niveles. Posteriormente los cortes se incubaron con diferentes diluciones del anticuerpo primario para células  $\beta$  (dilución final 1:20 000 anti-insulina de cobayo), células no- $\beta$  con una mezcla de anticuerpos contra las hormonas insulares restantes (somatostatina DAKO, Glostrup, Dinamarca, 1:6000; glucagón Peninsula Laboratories, Belmont, CA, EE.UU, 1:400 y PP Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Dinamarca 1:10000) para Pdx-1, (1:1200; provisto por el Dr C. Wrigth, Department of Cell Biology Vanderbilt University, Nashville, EE.UU) e INGAP 1246 anti-conejo (donado por el Dr. A. Vinik [Strelitz Diabetes Institutes, The Research Institute at Eastern Virginia Medical School Norfolk, 1:600]), para PCNA (dilución final 1:4000; Sigma Co.), para CK (cocktail panespecífico de anticuerpos dirigidos contra CK humanas, clon AE1-AE3 (DAKO) y CK -19 (clon 4.62 de Sigma Co.)). El análisis morfométrico se realizó empleando un sistema de videomicroscopía (microscopio de luz Jenamed 2 Carl Zeiss y cámara Sony RGB CCD en combinación con el programa Óptimas-Bioscan Incorporated, Edmons, WA, EE.UU). Con esta metodología se determinaron los siguientes parámetros: área de páncreas total; área de páncreas endocrino; área de páncreas exocrino y área de células  $\beta$  y no- $\beta$ ; número de células  $\beta$  y no- $\beta$ ; área y número de células con o sin co-expresión Pdx-1/INGAP; número de islotes por unidad de área y volumen de islotes. También estudiamos la densidad de volumen de las células  $\beta$  y no- $\beta$ , células Pdx-1/INGAP y Pdx-1, como así también el tamaño de las células  $\beta$  y no- $\beta$ . Para estimar la masa de células  $\beta$ , no- $\beta$ , INGAP/Pdx-1, extrainsulares y ductales, multiplicamos la densidad de volumen por el peso total del páncreas (17). La medida de los contactos entre islotes y células ductales se realizó y expresó como el porcentaje del número total de islotes en contacto con los conductos (18)

La significación estadística de las diferencias entre muestras se analizó empleando el test de *t* para muestras apareadas, considerando significativas aquellas con un valor de *p* <0,05.

## RESULTADOS

La Tabla 1 muestra el peso inicial de los animales y al cabo de los 10 días de tratamiento, como así también varios parámetros metabólicos.

Tabla 1. Variaciones clínicas y metabólicas consecutivas al tratamiento con INGAP-PP

| Parámetro                 | 10 días de tratamiento |            |
|---------------------------|------------------------|------------|
|                           | Control                | INGAP-PP   |
| Peso corporal inicial (g) | 109 ± 7                | 109 ± 4.52 |
| Peso corporal final (g)   | 114 ± 6                | 116 ± 6    |
| Peso del páncreas (mg)    | 325 ± 15               | 320 ± 25   |
| Glucemias (mg%)           | 91 ± 4                 | 96 ± 4     |
| Trigliceridemias (mg%)    | 171 ± 32               | 204 ± 12   |
| Insulinemias (μU/ml)      | 2.25 ± 0.3             | 4 ± 0.9    |
| HOMA-Función β (μU/mmol)  | 645                    | 1092*      |
| HOMA-IR (μU/mmol)         | 11.2                   | 23.7*      |

Los valores representan la media ± EEM; n= 12; \**p* < 0,05.

La Figura 1 muestra los resultados de la secreción de insulina de islotes obtenidos de hamsters control y tratados con INGAP-PP, incubados con glucosa 3,3, 8,3 y 16,7 mM.

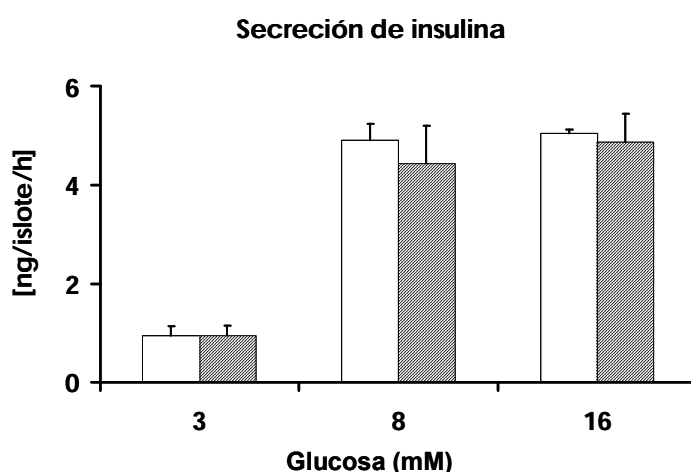


Figura 1. Secreción de insulina de islotes de hamsters control (barras vacías) y tratados con INGAP-PP (barras rayadas) incubados con distintas concentraciones de glucosa. Las barras representan la media ± EEM (n= 12).

La Figura 2 muestra que el contenido de ADN insular de los animales tratados con INGAP-PP fue significativamente menor que el de los islotes provenientes de los animales control ( $p < 0.05$ ).

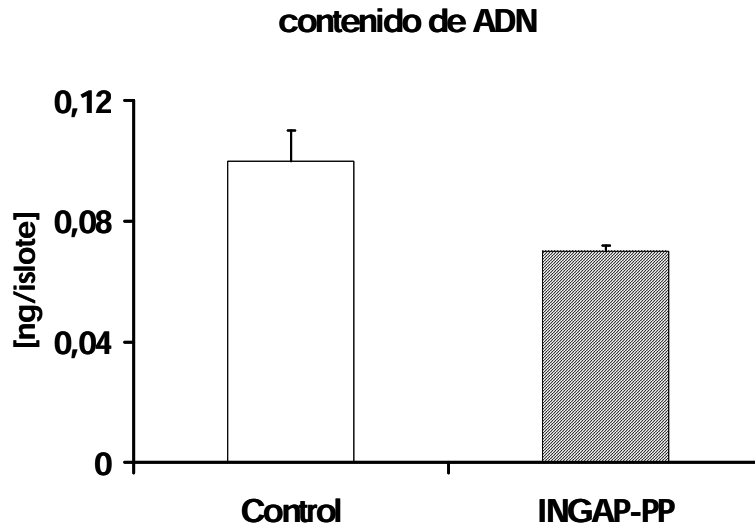


Figura 2. Contenido de ADN insular de los islotes de hamsters control (barras vacías) y tratados con INGAP-PP (barras rayadas). Las barras representan la media  $\pm$  EEM.  $n = 12$ . Los valores de los animales tratados con INGAP-PP son significativamente menores que los del control ( $p < 0.05$ ).

Las figura 3 y 4 muestran los resultados del análisis morfométrico.

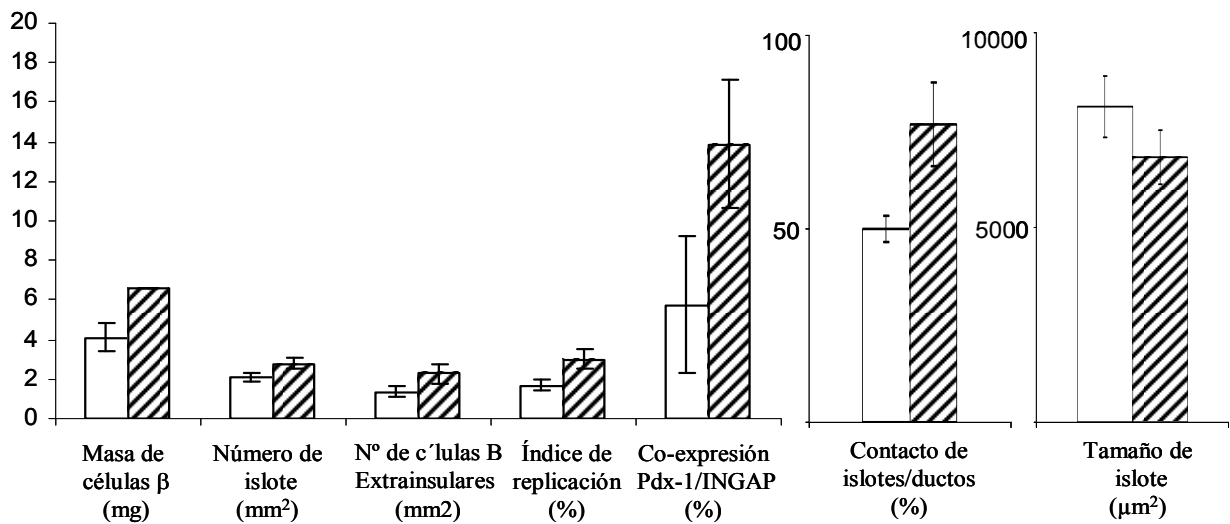
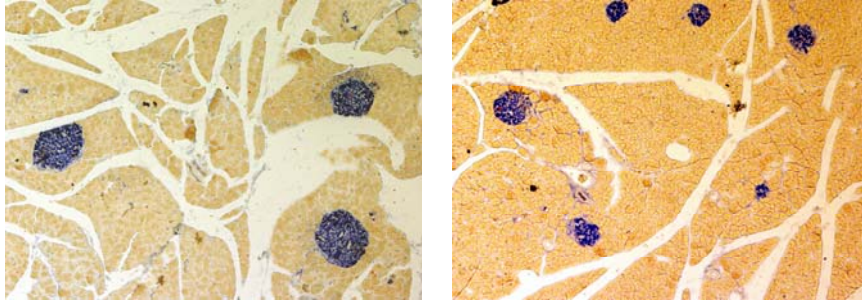
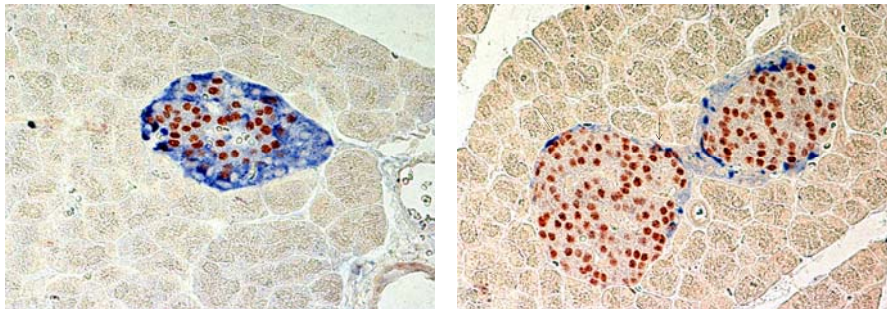


Figura 3: Resultados del análisis morfométrico de los páncreas de animales control y tratados con INGAP-PP. Barras vacías: controles; barras rayadas: INGAP.

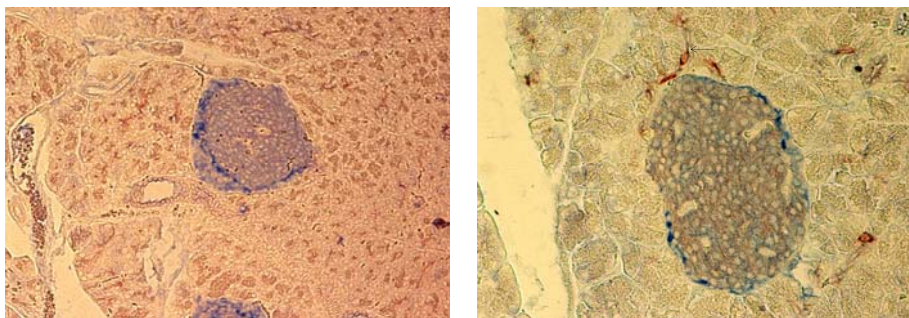
Figura 4



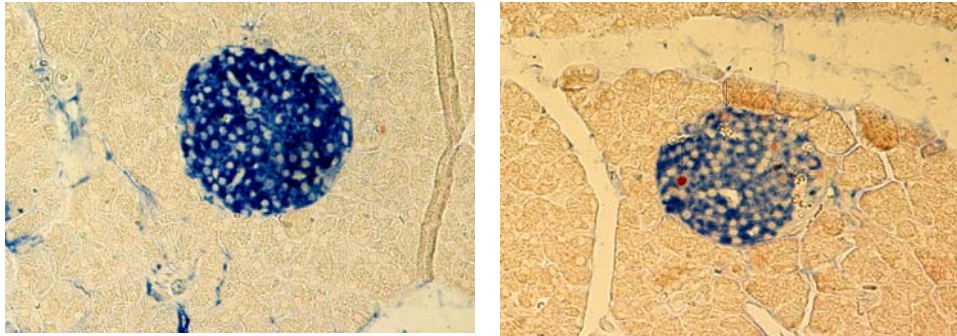
Corte de páncreas de hamsters controles (izquierda) y tratados con INGAP-PP (derecha), incubados con anticuerpo antiinsulina. Se observa un aumento del número y disminución del tamaño de los islotes de los animales tratados.  $\times 100$



Cortes de páncreas de hamsters controles (izquierda) y tratados con INGAP-PP (derecha) inmunocoloreados para Pdx-1 (rojo) e INGAP (azul). Se observa mayor intensidad y co-expresión de células Pdx-1/INGAP positivas (en la periferia del islote, flechas), en los animales tratados con INGAP-PP que en los control.  $\times 200$ .



Técnica de inmunohistoquímica para CK AE1-AE3 y para células no- $\beta$ . Esta combinación permite observar islotes en relación con los conductos pancreáticos (flecha). En los animales tratados con INGAP-PP se observa un mayor número de islotes en contacto con estructuras ductales.



Técnica de inmunohistoquímica para insulina (azul) y PCNA (rojo). En el panel izquierdo se ve un islote de un animal control sin reacción para PCNA, mientras que a la derecha (animal tratado con INGAP-PP) este número es marcadamente mayor (flecha).

## DISCUSIÓN

Nuestros resultados demuestran que la administración de INGAP-PP durante diez días a hamsters normales indujo un aumento del número de islotes y de la masa de células  $\beta$ . Este último fue consecuencia de un aumento simultáneo del número de células  $\beta$  a nivel intra y extrainsular. La masa de células  $\beta$  está regulada por el balance entre procesos que la aumentan (hipertrofia, replicación y neogénesis) y otros que la disminuyen (apoptosis) (17). El aumento de la masa  $\beta$  registrado implica un predominio de los primeros en detrimento de los segundos. En efecto, el índice de replicación de células  $\beta$  aumentó significativamente en los animales tratados con INGAP-PP. Por otra parte, la disminución del tamaño de los islotes (19%), el aumento del número de células  $\beta$  extrainsulares (170%) y el de los islotes en contacto con los conductos pancreáticos (154%) son indicadores de un incremento del proceso de neogénesis insular. Nuestros resultados difieren en parte de los descritos por Rosenberg y col. ya que ellos atribuyeron el aumento de la masa de células  $\beta$  exclusivamente a la neogénesis (10). Cabe mencionar, sin embargo, que dichos autores no midieron ni la replicación ni la apoptosis de esas células. Opuesto a lo descrito por Rosenberg y col. (10), en nuestros animales tratados con INGAP-PP el contenido de insulina de sus páncreas no fue diferente al de los animales control (datos no mostrados). Por el contrario, en los animales tratados registramos un aumento significativo de la función secretora  $\beta$ , medida a través del índice HOMA. El hecho de que la glucemia de estos animales fue similar a la de los animales control, indica que la nueva población de células  $\beta$  responde normalmente a los mecanismos de regulación de la secreción de insulina. La similitud de la secreción de insulina en respuesta a la glucosa de los islotes aislados de ambos grupos experimentales avalan esta aseveración. La moderada disminución del índice HOMA de sensibilidad a la insulina - probablemente debida a un proceso de retroalimentación negativa de los receptores de insulina (down regulation) - representaría un mecanismo complementario de adaptación para mantener la homeostasis de la glucosa

dentro de límites normales. En animales adultos, la expresión de Pdx-1 (factor de transcripción que actúa sobre el promotor del gen de insulina) (10) está reprimida en la mayoría de las células pancreáticas con excepción de las células  $\beta$  y una variedad de células  $\delta$ . Previamente demostramos que en páncreas de recién nacidos de madres con insulinoresistencia aumenta el número de células que co-expresan INGAP y Pdx-1 (26); estas células tienen un índice de replicación muy alto y no co-expresan ninguna de las hormonas insulares, por lo que se las considera precursores precoces de las células insulares. El aumento del porcentaje de estas células registrado en los animales tratados con INGAP-PP sugiere la existencia en el páncreas adulto de células progenitoras que frente a diferentes estímulos, en este caso la administración de INGAP-PP, pueden diferenciarse a células de linaje endocrino.

En el presente estudio, el número de células INGAP-positivas disminuyó significativamente en los animales tratados con INGAP-PP (Figura 3 y 4). Esta disminución representaría un mecanismo de retroalimentación negativa establecido entre el INGAP-PP inyectado y las células productoras de INGAP. El hecho implica que: a) las células productoras de INGAP están permanentemente activas y su función está en parte autorregulada y b) el INGAP-PP no sólo ejerce funciones idénticas a la proteína intacta como lo demostraron Rafaeloff y col. (4), sino que también lo haría a nivel de las propias células productoras de INGAP. Dado el efecto estimulador del INGAP (y del INGAP-PP) sobre la masa celular  $\beta$ , la disminución del número de células INGAP-positivas en los animales tratados formaría parte del control homeostático de la expansión de la masa insular que previene el desarrollo de neoplasias (19).

## **CONCLUSIONES**

Nuestros resultados demuestran que la administración de INGAP-PP induce, *in vivo*, un aumento de la masa de células  $\beta$  mediante un incremento de la replicación de células preexistentes y de su diferenciación a partir de células progenitoras probablemente presentes en el epitelio ductal. La capacidad del INGAP-PP para promover un aumento controlado de la masa insular y funcionalmente activa, representa una alternativa novedosa para el tratamiento de la diabetes. Éste podría utilizarse como a) inductor de la diferenciación de células progenitoras *in vivo* (medicina regenerativa) o *in vitro* y b) como fuente de nuevas células  $\beta$  obtenidas de tejidos xenogénicos, alogénicos y fetales para su posterior trasplante en pacientes con diabetes. El hecho de que el efecto descrito se logra con pequeñas cantidades del péptido aumenta la potencialidad terapéutica del INGAP-PP o sus posibles análogos.



## BIBLIOGRAFÍA

- 1 Rosenberg L, Brown RA, Duguid WP. 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.
- 2 Pittenger GL, Vinik AI, Rosenberg L. The partial isolation and characterization of ilotropin, a novel islet-specific growth factor. *Adv Exp Med Biol* 1992;321:123-30.
- 3 Rosenberg L, Vinik AI, Pittenger GL 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.
- 4 Rafaeloff R, Pittenger GL, Barlow SW, Qin XF, Yan B, Rosenberg L, Duguid WP, Vinik AI. Cloning and sequencing of the pancreatic islet neogenesis associated protein (INGAP) gene and its expression in islet neogenesis in hamsters. *J Clin Invest* 1997;99:2100-09.
- 5 Del Zotto H, Massa L, Rafaeloff R, Pittenger GL, Vinik A, Gold G, Reifel-Miller A, Gagliardino JJ. Possible relationship between changes in islet neogenesis and islet neogenesis-associated protein-positive cell mass induced by sucrose administration to normal hamsters. *J Endocrinol* 2000;165: 725-33.
- 6 Flores LE, García ME, Borelli MI, Del Zotto H, Alzugaray ME, Maiztegui B, Gagliardino JJ. Expression of islet neogenesis-associated protein (INGAP) in islets of normal hamsters. *J Endocrinol* 2003;177: 243-8.
- 7 Rafaeloff-Phail R, Schmith E, Edlund H, Gold G, Vinik AI. Expression of INGAP during ontogeny of the pancreas. *Diabetes* 1998;47: suppl(1) A259.
- 8 Del Zotto H, Gómez Dumm CL, Drago S, Fortino A, Luna GC, Gagliardino JJ. Mechanisms involved in the beta-cell mass increase induced by chronic sucrose feeding to normal rats. *J Endocrinol* 2002;174: 225-31.
- 9 Semakula, C, Pambuccian S, Gruessner R. y col. Clinical case seminar: hypoglycemia after pancreas transplantation: association with allograft nesidioblastosis and expression of islet neogenesis-associated peptide. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:3548–3554.
- 10 Rosenberg L, Lipsett M, Yoon JW, Prentki M, Wang R, Jun HS, Pittenger GL, Taylor-Fishwick D, Vinik AI. A pentadecapeptide fragment of islet neogenesis-associated protein increases beta-cell mass and reverses diabetes in C57BL/6J mice. *Ann Surg* 2004; 240:875-884.
- 11 Borelli MI, Stoppiglia LF, Rezende LF, Flores LE, Del Zotto H, Boschero AC, Gagliardino JJ. INGAP-related pentadecapeptide: its modulatory effect upon insulin secretion. *INGAP-*

- related pentadecapeptide: its modulatory effect upon insulin secretion. *Regul Pept* 2005; 131(1-3):97-102.
- 12 Laurell S. A method for routine determination of plasma triglycerides: *Scand J Clin Lab Invest* 1967;118: 668-672.
  - 13 Herbert V, Lau KS, Gottlieb CW, Bleicher SJ. Coated charcoal immunoassay of insulin. *J Clin Endocrinol Metab* 1965; 25:1375-84.
  - 14 Mathews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF & Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28 412-419.
  - 15 Lacy PE, and Kostianovsky M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 1967;16:35-9.
  - 16 Labarca C, Paigen K. A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal Biochem* 1980; 102:344-52.
  - 17 Bonner-Weir S, Smith FE Islet cell growth and the growth factors involved *TEM* 1994; 5:60-64.
  - 18 Bertelli, E, Regoli M, Orazioli D y Bendayan. Association between islets of Langerhans and pancreatic ductal system in adults rats. Where endocrine and exocrine meet? *Diabetologia* 2001; 44: 575-584.
  - 19 Gagliardino JJ, Del Zotto H, Massa L, Flores LE, Borelli MI. Pancreatic duodenal homeobox-1 (Pdx-1) and islet neogenesis-associated protein (INGAP): a possible combined marker of activatable pancreatic cell precursors. *J Endocrinol* 200