

Conferencias y Simposios

Conferencia y medalla Bernardo Houssay a la trayectoria en Investigación Básica en Diabetes

Presidenta: Dra. Silvia Gorban de Lapertosa

La diabetes: magnitud del problema, fisiopatología, diagnóstico y tratamiento

Dr. Juan José Gagliardino

Investigador Superior Emérito CONICET (Jubilado), ex Profesor Titular de Fisiología, Facultad de Ciencias Médicas UNLP, La Plata, Argentina

Según la *International Diabetes Federation* (IDF), la diabetes mellitus (DM) afectó mundialmente a 537 millones de adultos y la prediabetes (riesgo de desarrollar DM2) a otros 541 millones en 2021, causando la muerte de 6,7 millones de personas. En ese lapso consumió alrededor de USD 966 billones de dólares en gastos de control y tratamiento, monto incrementado alrededor del 316% en los últimos 15 años (IDF Diabetes Atlas 2021). Su magnitud da razón a la certera premonición de la Organización Mundial de la Salud (OMS) que la DM2 y su antecesor frecuente, la obesidad, serían la pandemia del siglo XXI.

Su diagnóstico tardío -frecuente en nuestra comunidad- facilita el desarrollo y progresión de sus complicaciones crónicas micro y macroangiopáticas que disminuyen marcadamente la calidad y cantidad de vida de quienes las padecen, y aumentan significativamente su costo de atención. Costo al que contribuye el acúmulo de gastos asociados a la producción/atención de eventos cardiovasculares consecutivos al diagnóstico tardío de la DM, especialmente su tipo 2. Igualmente la baja calidad de atención en la que no es ajena la prescripción tardía e inapropiada de la insulina por acuerdo tácito de la dupla médico-paciente.

Los gastos asociados a la DM no solo son atribuibles a la Salud Pública, sino que afectan de igual manera al sector productivo -caso del ausentismo laboral- y lamentablemente, una comunidad enferma es menos productiva que una sana.

Pero si bien la prevalencia de la enfermedad es afectada inversamente por el ingreso económico, la inversa también ocurre: la frecuencia de DM es significativamente mayor en áreas carenciadas y de bajo nivel educativo, pero ambas variables son afectadas negativamente por la enfermedad. Se establece así un círculo vicioso cuya ruptura no solo requiere el compromiso del sector salud, sino de una activa y coordinada reacción intersectorial conjunta.

No menor es la escasa atención prestada a la evidencia establecida por el STENO 2 de considerar la triple meta para el control y tratamiento de la DM: glucemia/HbA1c, hipertensión arterial y dislipemia, en lugar del criterio frecuentemente utilizado del control unicista de la homeostasis glucémica.

Aunado a esto -y a pesar de la clara evidencia en la literatura de que la prediabetes no es una pre-enfermedad sino una verdadera enfermedad, ya que presenta sus propias complicaciones-, la atención de la política nacional registra casos de prediabetes solo a nivel poblacional, desatendiendo así su posible prevención activa-efectiva.

Previamente nuestro grupo propuso un modelo de célula β que resumía los mecanismos que regulaban a su nivel la secreción de insulina. Hoy ese mecanismo ha aumentado su complejidad, incorporando nuevos componentes como los del mesangio y diversas hormonas/mediadores. La microcirculación insular es una red capilar con una densidad cinco veces mayor, una alta permeabilidad y 10 veces más fenestraciones que la de su contraparte exocrina. Además de una relación física y funcional interdependiente con las células β , no solo le suministra oxígeno y nutrientes, sino también induce la expresión del gen de insulina a partir del desarrollo embrionario promoviendo su proliferación y produciendo una serie de sustancias vasoactivas, angiogénicas y factores de crecimiento. Provee marcadores específicos de la

microvasculatura insular como el inhibidor de proteínasa α -1 y la nefrina, proteína de barrera altamente específica con función de adhesión y señalización.

El microendotelio insular también jugaría un rol en el control fino y la regulación de la glucemia, al igual que en el reclutamiento de leucocitos en los islotes, adoptando un fenotipo activado durante la insulinitis autoinmune en la DM1. El conjunto permitió profundizar las bases moleculares del mecanismo de secreción de insulina e identificar (diagnosticar) precoz y eficientemente sus deficiencias.

La diferenciación inducida *in vitro* de células madre pluripotentes humanas (iPSC) en islotes funcionales tiene un enorme potencial como fuente ilimitada de islotes para la investigación y el tratamiento de la DM. Se ha demostrado que la angiopoyetina-1 (Ang1) y la angiopoyetina-2 (Ang2) permiten generar islotes a partir de iPSC que responden a la glucosa igual que los islotes maduros. Ellos aumentan el flujo de iones de calcio estimulado por la glucosa, junto con un aumento de la expresión de todas las hormonas insulares, incluidas la insulina, el glucagón, la somatostatina y el polipéptido pancreático en respuesta a la Ang2. También de factores de transcripción de células β , incluidos NKX6.1, MAFA, UCN3 y PDX1. La Ang2 también induce la formación de endotelio intrainsular.

Estos resultados sugieren fuertemente que la angiopoyetina actúa como una señal promotora del desarrollo insular *in vitro* a partir de iPSC (Karanth SS et al 2021).

Aún cuando mucho se ha avanzado en el tratamiento sustitutivo de la DM, y pese a los numerosos recursos terapéuticos puestos a nuestro alcance, resta a la industria farmacéutica proveer de un medicamento capaz de devolver a la célula β insular su capacidad de homeostasis glucémica perdida. Asignatura pendiente para el mundo diabetológico en el que muchos somos los activamente involucrados, pero hasta aún son escasos los resultados clínicamente consolidados.

Entre los diversos compuestos ensayados existe el denominado INGAP (apócope de su nombre en inglés, *islet neogenesis isociated protein*), nombre que además identifica su mecanismo de acción asociado al incremento de la masa celular β y sus múltiples funciones, descubierto casualmente buscando producir una pancreatitis experimental por envoltura del páncreas de hámster normal en celofán. Posteriormente aislado de dicho tejido como un complejo proteico (Ilotropina) (Arthur Vinik 1983), que administrado a ratones inyectados con STZ -tóxico insular- disminuyó un 50% la aparición de la DM (Rosenberg et al., 1988). Dicho grupo demostró que un polipéptido de 171 aminoácidos era su principio activo (INGAP) y luego, que un pentadecapéptido con su secuencia aminoacídica 104-118 (INGAP-PP) reproducía todos los efectos de su molécula intacta.

El INGAP-PP disminuye la hiperglucemia y restituye parcialmente la masa de células β en ratones diabéticos (Rosenberg 2003). A partir de este año, e inicialmente en cooperación con Vinik y su grupo, iniciamos nuestras investigaciones con el INGAP-PP, pero rápidamente nos independizamos pasando a ser uno de los grupos más activo en este campo (20 publicaciones a nivel internacional en igual número de años). Reportamos su efecto estimulador de la masa y función de las células β en hamsters y ratas normales y fetos, su regulación metabólica y actividad enzimática, antiapoptosis, protección de prediabetes en ratas alimentadas con dietas desbalanceadas, hiperplasia celular β inducida por VEFH, su efecto protector sobre la función hepática y el tejido adiposo en modelos experimentales *in vivo* e *in vitro*.

Mientras nuestro grupo acopiaba evidencias sobre posibles efectos clínicos aplicables al tratamiento de la DM humana, un grupo americano implementó (prematuramente quizás) un ensayo clínico con INGAP-PP consistente en un estudio doble ciego randomizado con personas con DM1 y DM2 que recibieron repetidas inyecciones de grandes dosis de INGAP-PP inyectable (600 mg c/u), midiéndose su efecto sobre la liberación de péptido C en respuesta a la inyección de arginina (vs placebo) y simultáneamente los niveles de HbA1c. En ambos tipos de pacientes se registraron aumentos significativos del péptido C vs control (DM1 $<0,005$ y DM2 $\leq 0,009$) y disminución de los valores de HbA1c. Lamentablemente, el estudio debió suspenderse

a los 90 días por aparición de reacciones infecciosas serias en los sitios de inyección. Se requerirán preparaciones de INGAP-PP más activas para emplear concentraciones del compuesto que no produzcan tales reacciones adversas.

Recientemente un laboratorio de origen chino produjo un análogo del INGAP-PP con diferente estructura en el cual su grupo amino N terminal estaba acetilado y su aminoácido asparagina en posición 13 fue reemplazado por alanina. Estos cambios estructurales produjeron cambios significativos en su estabilidad en plasma lo que abre nuevas posibilidades. En efecto, este análogo es 3,36 veces más estable que el INGAP-PP por lo que razonablemente tendría mayor efectividad biológica por su mayor tiempo de permanencia en circulación, permitiendo así reducir la frecuencia de inyecciones, quizás también su dosis y consecuentemente, las reacciones adversas.

Este laboratorio está redactando un acuerdo con el CENEXA a través del área legal del CONICET para determinar su capacidad de incrementar la masa y secreción de las células β insulares comparándolas con la del INGAP-PP en igualdad de condiciones experimentales. Obtenidas estas evidencias, trataremos de implementar el modelo a nivel clínico.

Confiamos que en su conjunto nuestros resultados provean suficiente evidencia de nuestro aporte reciente a la solución de la problemática global de la DM y potencialmente facilite el logro de una alternativa terapéutica eficaz. De igual manera, la clarificación de dicho panorama global, su magnitud, sus causas, consecuencias socioeconómicas y asignaturas pendientes, motivarán a las nuevas y a todas las generaciones de miembros de nuestra Sociedad a seguir trabajando para mejorar la calidad y cantidad de vida de las personas con DM.

Palabras clave: fisiopatología, diagnóstico y tratamiento.

Conference and Bernardo Houssay medal for the trajectory in Basic Research in Diabetes

President: Dr. Silvia Gorban de Lapertosa

Diabetes: magnitude of the problema, pathophysiology, diagnosis and treatment

Dr. Juan José Gagliardino

Former Head Professor of Physiology, School of Medical Science, National University of La Plata

According to the International Diabetes Federation, this disease affected 537 million adults worldwide, while prediabetes (risk of developing T2D) threatened another 541 million in 2021, causing the death of 6.7 million people. During that period, it cost around 966 billion US dollars for control and treatment expenses, an amount that has increased by around 316% in the last 15 years (IDF Diabetes Atlas 2021 10th Edition and other resources). Its magnitude supports the WHO's accurate prediction that diabetes and obesity, its frequent associate, would be the pandemic of the 21st century! Its late diagnosis – quite frequent in our community - facilitates the development and progression of its chronic micro and macroangiopathic complications that markedly reduce the quality and quantity of life of those who suffer from them and significantly increase the cost of their care. This cost results from the accumulation of expenses associated with the production/care of cardiovascular events consecutive to the late diagnosis of diabetes, especially type 2. Also from the low quality of care in which late and inappropriate prescription of insulin stems from tacit agreement by the doctor-patient duo.

The expenses associated with diabetes are not only borne by Public Health, since they also affect the Productive Sector - such is the case of absenteeism - and unfortunately, a sick community is less productive than a healthy one.

However, although the disease affects economic income, the reverse also occurs: diabetes prevalence is significantly higher in deprived areas with a low educational level and vice versa, establishing a vicious circle difficult to break: it requires not only the commitment of the Health sector, but also of an active and coordinated joint Intersectorial reaction.

Not least is the scant attention paid to evidence established by Steno 2 to define the triple goal for the control and treatment of diabetes: glycemia/HbA1c, arterial hypertension and dyslipidemia, instead of the simplistic criterion frequently used of glycemie homeostasis.

In addition to this, and despite clear evidence in the literature that prediabetes is not a pre-disease but a true disease, since it presents its own complications, the attention of national policy registers cases of prediabetes only at the population level, thereby neglecting possible active prevention.

Some time ago our group proposed a β -cell model that summarized mechanisms regulating insulin secretion at this level. Today the description of these mechanisms has increased its complexity, incorporating new components such as those of the mesangial and various hormones/mediators. Insular microcirculation is a capillary network with five times the density of its exocrine counterpart, greater permeability, and 10 times more fenestrations than exocrine tissue. In addition to an interdependent physical and functional relationship with β cells, they not only supply them with oxygen and nutrients but also induce the expression of the insulin gene during insular embryonic development, promote their proliferation, and produce a series of vasoactive, angiogenic substances and growth factors. They are specific markers of the insular microvasculature such as the α -1 proteinase inhibitor and nephrin, a highly specific barrier protein with adhesion and signaling functions.

The insular micro-endothelium also has a role in the fine control and regulation of glycemia as well as in the recruitment of leukocytes in the islets, adopting an activated

phenotype during autoimmune insulinitis in T1D. All this has enabled us to deepen the molecular bases of the insulin secretion mechanism and to identify (diagnose) its deficiencies early and efficiently.

In vitro induced differentiation of human pluripotent stem cells (iPSCs) into functional islets has enormous potential as an unlimited source of islets for diabetes research and treatment. Angiopoietin-1 (Ang1) and angiopoietin-2 (Ang2) have been shown to allow the generation of islets from iPSCs, which respond to glucose just like mature islets.

These islets increase glucose-stimulated calcium ion influx, along with increased expression of all islet hormones, including insulin, glucagon, somatostatin, and pancreatic polypeptide in response to Ang2; also to β -cell transcription factors, including NKX6.1, MAFA, UCN3, and PDX1. Ang2 even induces the formation of intrainsular endothelium.

These results strongly suggest that angiopoietins act as a promoter signal for islet development in vitro from iPSCs (Karanth 2021).

Even though much progress has been made regarding replacement treatment of diabetes and despite the numerous therapeutic resources available, the pharmaceutical industry still has to provide us with a drug capable of restoring the lost capacity of glycemic homeostasis to diabetic β -islet cells. It is a pending issue for the diabetes world in which many of us are now actively involved, although clinically consolidated results are still scarce.

Among the various clinically tested compounds is the so-called INGAP (abbreviation of its name in English islet neogenesis associated protein), a name that also identifies its mechanism of action associated with increase in β -cell mass and its multiple functions. Discovered by chance while trying to produce an experimental pancreatitis by wrapping normal hamster pancreas in cellophane. Subsequently isolated from that tissue as a protein complex (Ilotropin) (Vinik 1983), when administered to mice injected with STZ –islets toxin-, it reduced the onset of diabetes by 50% (Rosenberg et al, 1988). The same group demonstrated that a polypeptide of 171 amino acids was its active principle (INGAP) and also that a pentadecapeptide with an amino acid sequence of 104-118 (INGAP-PP) reproduced all the effects of its intact molecule.

INGAP-PP decreases hyperglycemia and partially restores β -cell mass in diabetic mice (Rosenberg 2003). Starting this year and initially in cooperation with Vinik and his group, we began our research with INGAP-PP but soon became independent, and are now one of the most active groups in this field (with 20 international publications in the same number of years). In this trajectory, we have reported its stimulating effect on the mass and function of β -cells in hamsters and normal and fetal rats, its metabolic regulation and key enzyme activity control, anti-apoptosis effect, protection against prediabetes in rats given unbalanced diets, β -cell hyperplasia induced by HEVF, its protective effect on liver function and adipose tissue in experimental models in vivo and in vitro.

While our group was collecting evidence on possible clinical effects applicable to the treatment of human diabetes, an American group implemented –perhaps prematurely- a double-blind randomized study with people with T1D and T2D who received repeated injections of large doses of injectable INGAP-PP (600 mg), measuring its effect on C-peptide release in response to arginine injection (vs. placebo) and simultaneously HbA1c levels. In both types of patients, they found significant increases in C-peptide vs. control (DT1 < 0.005 and DT2 \leq 0.009) and decreased HbA1c values. Unfortunately, the study had to be discontinued after 90 days due to the appearance of serious infectious reactions at the injection sites. More active preparations of INGAP-PP will be required to permit the use of concentrations of the compound that do not produce such adverse reactions.

Recently, an analog of INGAP-PP has been developed that carries two main structural modifications: (the N-terminal amino group was protected and its asparagine amino acid at position 13 was replaced by another amino acid), providing significant

improvement in its stability in plasma which opens up new possibilities (Lynn S. et al J Biomol Struct Dyn 39:766; 2021). In fact, this analog is 3.36 times more stable than INGAP-PP, so it would reasonably have greater biological effectiveness due to its longer residence-time in circulation, thus allowing reduction of injection frequency and perhaps also the dose and consequently adverse reactions.

CENEXA is drafting an agreement with the company that developed it to further study its effectiveness. We aim to determine its effect of increasing the mass and secretion of β -island cells by comparing it with that of INGAP-PP under equal experimental conditions. In brief, we aim to reproduce the previously proved INGAP-PP action molecular mechanism to ensure HTD4010 efficiency and avoid potential clinical failures.

We trust that, taken together, our results provide sufficient evidence of our recent contribution to the solution of the global problem of diabetes and potentially facilitate the achievement of an effective therapeutic alternative.

In turn, the improvement of this global panorama, its magnitude, its causes, socioeconomic consequences and pending issues, will motivate the new members – as well as the future generations of our Society- to continue working to improve the quality and life expectancy of people with diabetes.

Key words: pathophysiology; diagnosis and treatment.