

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



KELLY ELIZEU DA SILVA

**“INGAP-PP (Islets Neogenesis Associated Protein)
aumenta a expressão das proteínas do canal de potássio,
sensível ao ATP, em ilhotas cultivadas de ratos adultos”**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) KELLY ELIZEU DA SILVA
Bacharel
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Molecular e Funcional, na área de Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Boschiero

Campinas, 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

SI381	<p>Silva, Kelly Elizeu da INGAP-PP aumenta a expressão das proteínas formadoras do canal K⁺ATP em ilhotas cultivadas de ratos adultos / Kelly Elizeu da Silva. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.</p> <p>Orientador: Antonio Carlos Boschero. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Insulina - Secreção. 2. Langerhans, Ilhotas de. 3. Rato - Fisiologia. 4. Expressão gênica. I. Boschero, Antonio Carlos. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p>
-------	---

Título em inglês: INGAP-PP up-regulates the expression of genes and proteins related to K⁺ATP channel in cultured adult rat islets.

Palavras-chave em inglês: Insulin – Secretion; Islands of Langerhans; Rats - Physiology; Gene expression.

Área de concentração: Fisiologia.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Antonio Carlos Boschero, Silvana Auxiliadora Bordin da Silva, Helena Coutinho Franco de Oliveira.

Data da defesa: 29/08/2007.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 29 de agosto de 2007

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr . Antonio Carlos Boschiero (Orientador)



Assinatura

Profa. Dra. Silvana Auxiliadora Bordin da Silva



Assinatura

Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira



Assinatura

Prof. Dr. Carlos Amilcar Parada

Assinatura

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas

Assinatura

Aos meus pais e irmãs

“Gentileza gera gentileza”

José Dadrino (Profeta Gentileza)

AGRADECIMENTOS

Durante o mestrado cresci muito profissionalmente, como é impossível me lembrar de todos que foram importantes nesse período desde já agradeço a todos que contribuíram para a elaboração deste trabalho.

Agradeço à minha família: aos meus pais pelo apoio, valores e pela educação que me deram, além do “paitrocínio” no período em que eu não tive bolsa; às minhas irmãs, Cleide e Kamilla, pelo apoio e pela tolerância para escutar as reclamações. Aos meus tios (Ciça e Zé) e primos (Fábio, Franklin e Kléber) pela força durante toda a minha formação.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Boschero por investir e acreditar em mim, pela orientação, paciência em me ensinar técnicas e procedimentos, e, o mais importante, como ser uma pesquisadora e uma profissional.

Ao Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro por abrir as portas do laboratório, me auxiliar a escolher o caminho para a realização de um sonho, bem como, pelas lições e exemplos durante o decorrer do mestrado.

À Prof. Dra. Helena F. Coutinho de Oliveira pela dignidade e disponibilidade, pela competência e exemplo de profissional.

À FAPESP pela bolsa de mestrado e financiamento do projeto.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Biofísica: Alexandra e Ivo, por sempre salvarem minha vida nos procedimentos de envio de relatório e pelo bom-humor diário; D. Lu, por sempre me receber com um sorriso no rosto e me mostrar que nossa vida vale a pena; Léscio pelo auxílio técnico praticamente diário, pelos

ensinamentos profissionais, pela calma e piadas nos momentos de tensão; ao Marcelo, D. Zefa e Washington pelo auxílio no biotério; Andréia (secretária pós-graduação) por esclarecer as dúvidas, sempre que precisei, e pela simpatia com que me recebe.

Aos companheiros de laboratório: Heleninha, pela indicação, apoio, paciência, disponibilidade e amizade durante todo o desenvolvimento dessa dissertação; aos amigos Eliane, Morgana, Ana Paula, Luiz e Fabrício; Andressa, Letícia e Thiago (Não tenho palavras para agradecer, vocês são muuuuuuito especiais! Espero que a amizade perdure!); Alex, Amon, Daniel, Kleber, Mauro, Priscilla, Silvana pelo apoio profissional e emocional, pela amizade, pelas lições de laboratório e de vida, pelos “*happy hours*”, baladinhas e baladonas (afinal, os momentos de descontração nos permitem trabalhar melhor, uma vez que a vida não é só ciência); Alessandro, Érika, Gabriel, Flávia, Helena Raposo, Juliana, Emeirielle, Maria Lúcia, Nágela, Patrícia, Rosane pelo contato diário, pela disponibilidade e pelo aprendizado.

A Daniela e Milene e a todas as amigas da época de cursinho agradeço pela amizade de tantos anos e pela força sempre, seja para desabafar ou comemorar. Kátia, Marina, Rodrigo e José e todos da turma de Biologia 2001 da Unesp de Rio Claro, pela amizade de tantos anos, pela paciência, apoio, baladas e viagens.

Gostaria de agradecer à Rosana Pires da Silva, Lazinho, Rodrigo Camargo, Alcides Ricce Jr, Carla Furlan que indiretamente, mas de forma não menos importante, me auxiliaram nesse período.

Agradeço a todos por me ensinarem a tolerar os diferentes, a aprender com exemplos, a respeitar cada ponto de vista e, o mais importante, que todos devem ser respeitados de acordo com sua índole, caráter e competência.

RESUMO

O INGAP-PP é um pentadecapeptídeo constituído pela seqüência de aminoácidos do resíduo 104 ao 118 do INGAP (*Islet Neogenesis Associated Protein*), o qual é expresso no pâncreas exócrino e também nas células ductais durante a neogênese de células β pancreáticas. Nesse trabalho, analisamos o efeito do tratamento crônico (4 dias) com INGAP-PP sobre a secreção de insulina, expressão gênica e protéica das subunidades Kir6.2 e SUR1 que formam o canal de K^+_{ATP} e do fator de transcrição Foxa2 (regulador da expressão das subunidades desse canal), em ilhotas isoladas de ratos adultos. As ilhotas tratadas com INGAP-PP (10 $\mu\text{g/mL}$) secretaram significativamente mais insulina quando incubadas por 1 h em concentrações entre 2.8 e 22.2 mM de glicose em comparação às ilhotas controles. Resultados de RT-PCR mostram que ilhotas tratadas com INGAP-PP tiveram expressão gênica do Foxa2 e das subunidades SUR1 e Kir6.2 aumentada. A expressão das proteínas SUR1 e Foxa2, analisada por *Western Blotting*, também foi maior nas ilhotas tratadas com INGAP-PP. Quando perfundidas na presença de 22,2 mM de glicose o aumento da secreção de insulina pelas ilhotas tratadas se manifestou com um primeiro pico secretor significativamente maior do que as ilhotas controles. Em presença de 2,8 mM de glicose, ilhotas tratadas com INGAP-PP secretaram mais insulina frente à concentrações despolarizantes de KCl ou tolbutamida (100 μM). Entretanto, a secreção de insulina estimulada por tolbutamida não diferiu entre os grupos em presença de 22,2 mM de glicose. A análise do efluxo de ^{86}Rb mostrou que as ilhotas cultivadas com INGAP-PP apresentam menor efluxo do isótopo em relação às controle. Portanto, a maior secreção de insulina frente à glicose e concentrações

despolarizantes de K^+ indica que o tratamento com INGAP-PP induziu alterações que tornaram as células β mais sensíveis a agentes despolarizantes. Quando associamos estes resultados ao aumento da expressão das proteínas formadoras do canal K^+_{ATP} e à redução do efluxo de ^{86}Rb pelas ilhotas tratadas com INGAP-PP, podemos sugerir que o aumento no número de canais K_{ATP} pode ser um dos responsáveis pelo aumento na secreção de insulina nas ilhotas tratadas com o peptídeo.

ABSTRACT

Cultured adult rat islets were used to study the effect of INGAP-PP upon: a) gene expression of Kir6.2 and SUR1 of K⁺ATP channels and of their transcription factor Foxa2 (RT-PCR), b) protein levels (Western blotting) of SUR1 and Foxa2, c) static and dynamic insulin secretion elicited by metabolic and non metabolic stimuli and d) ⁸⁶Rb efflux from perfused islets. INGAP-PP increased significantly the expression of Kir6.2, SUR1 and Foxa2 and the protein levels of SUR1 and Foxa2. Islets cultured with INGAP-PP and further incubated for 1 h with 2.8 mM glucose, significantly enhanced the release of insulin in response to 40 mM KCl, and 100 μM tolbutamide. The dose-response curve of insulin secretion to increasing glucose concentrations (2.8 to 22.2 mM) shifted to the left in INGAP-PP-cultured islets with an EC₅₀ of 10.0 ± 0.4 vs. 13.7 ± 1.5 mM glucose of the controls (P < 0,05). In dynamic studies INGAP-PP increased significantly the first-phase of insulin secretion elicited by either 22.2 mM glucose or 100 μM tolbutamide and promotes a higher glucose-induced reduction of ⁸⁶Rb efflux from perfused islets. These results confirm the enhancing effect of INGAP-PP upon insulin release induced by different secretagogues and provide new evidence that such effect is due, at least partly, to an enhanced expression of the SUR1 and Kir6.2 genes of K⁺ATP channels and of the Foxa2 gene that controls their expression. They would also suggest that INGAP-PP could potentially be used to maintain the capacity of cultured islets to release insulin in response to glucose and maybe for the treatment of diabetes.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1 - INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Diabetes.....	1
1.2. Secreção de Insulina.....	3
1.3. INGAP e o pâncreas endócrino.....	6
2 - OBJETIVOS.....	10
3 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
4 - RESULTADOS.....	18
5 - DISCUSSÃO.....	29
6 - CONCLUSÕES.....	33
7 - REFERÊNCIAS.....	35
Apêndice I - MANUSCRITO: INGAP-PP up-regulates the expression of genes and proteins related to K ⁺ _{ATP} channel in cultured adult rat islets.....	46

1 – INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes

Diabetes *mellitus* é uma patologia causada pela falência total (tipo 1) ou parcial (tipo 2) das células pancreáticas associada ou não à resistência periférica à insulina. Em ambos tipos, o pâncreas é incapaz de produzir e/ou secretar insulina suficiente para a manutenção da euglicemia (WHITE, M.F., 2003).

Cerca de 171 milhões de pessoas no mundo (2,8% da população mundial) apresentava diabetes em 2000. O Brasil ocupava o oitavo lugar na lista de países com maior número de casos de diabetes no ano 2000, com cerca de 4,6 milhões de diabéticos. Projeções apontam que em 2030 serão aproximadamente 366 milhões de diabéticos no mundo, destes 11,3 milhões serão brasileiros, o que colocará o Brasil no sexto lugar do ranking (WILD *et al.*, 2004). Devido a esse quadro epidemiológico, inúmeros grupos de pesquisa se empenham na investigação das causas e possíveis soluções para o diabetes, entretanto, o problema está longe de ser resolvido.

O tratamento do diabetes envolve mudanças no estilo de vida (dieta e atividade física), administração de hipoglicemiantes orais (sulfoniluréias e glibenclâmidas), bem como o uso de insulina exógena (DONATH & HALBAN, 2004). Nas últimas três décadas, o transplante de ilhotas isoladas tem sido proposto para o tratamento do diabetes tipo 1. Contudo, apesar do grande investimento em técnicas para o isolamento e preservação das mesmas em diferentes meios de cultura os resultados tem sido insatisfatórios, em grande parte

devido à dificuldades técnicas e à escassez de doadores. Soma-se a essas, a necessidade do uso de drogas imunossupressoras (LAKEY *et al.*, 2003).

Para contornar a escassez de tecido endócrino pancreático, recentemente, foi proposta a transformação de células indiferenciadas (*stem cells*) em células produtoras de insulina (LUMELSKY *et al.*, 2001). Contudo, trata-se de tecnologia ainda em implantação associada a problemas éticos que continuam em discussão, inclusive no Brasil (LEITE, M., 2006).

Outra alternativa atraente seria tornar o indivíduo capaz de recuperar sua capacidade de produzir novas células secretoras de insulina, preferencialmente antes da instalação do diabetes (LIPSETT *et al.*, 2006). Teoricamente, essa técnica traria vantagens sobre o transplante, uma vez que, além de repor as células perdidas no decorrer da vida e no lugar correto, aliviaria o tratamento do indivíduo receptor com drogas imunossupressoras.

Experimentalmente vários modelos que estimulam a diferenciação celular foram propostos. Dentre os mais utilizados nas últimas duas décadas destacam-se: pancreatectomia parcial (LEE *et al.*, 1989), infusão de soluções ricas em glicose (BONNER-WEIR *et al.*, 1989), manipulação de dietas (LOMBARDO *et al.*, 1983; LUO *et al.*, 1998), ligação do duto pancreático (WANG *et al.*, 1995), administração de sulfoniluréia (LOUBATIERES A., 1964), prenhez (PARSONS *et al.*, 1992) e o empacotamento do pâncreas com papel celofane (ROSENBERG *et al.*, 1983). Esses procedimentos se restringiram a algumas espécies de animais de experimentação, entretanto permitiram a descoberta de fatores de crescimento envolvidos no processo de diferenciação celular do pâncreas endócrino (BOUWENS & ROOMAN, 2005; ACKERMANN & GANNON, 2007).

1.2 – Secreção de Insulina

A insulina é secretada em resposta a glicose e a outros secretagogos (aminoácidos, sulfoniluréias, glibenclâmidas). Depois de sua síntese, a insulina é empacotada e processada para sua forma ativa no retículo endoplasmático, sendo então estocada em grânulos próximos à membrana plasmática, prontos para serem secretados (HENQUIN J., 2000; RORSMAN & RENSTRÖM, 2003).

A glicose entra na célula β pancreática via transportador Glut2 e é, então, convertida em glicose-6-fosfato pela enzima hexoquinase I ou IV. A glicose-6-fosfato é metabolizada na via glicolítica, na qual é convertida a piruvato, que entra na mitocôndria, onde é convertido à acetil-CoA pela piruvato desidrogenase. O acetil-CoA é degradado no ciclo de Krebs gerando NADH, $FADH_2$ e ATP (MATSCHINSKY, F.M., 1996; HENQUIN, J., 2000).

O ATP, gerado na via glicolítica e ciclo de Krebs, se liga ao canal de potássio sensível ao ATP (K_{ATP}) alterando sua conformação, o que provoca o fechamento do canal. A redução da condutância de K^+ permite o acúmulo de cargas positivas na porção citoplasmática subjacente à membrana despolarizando-a, o que facilita a abertura dos canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem (tipo L), permitindo o influxo de Ca^{2+} . O aumento na concentração intracelular de cálcio ativa a exocitose de uma pequena quantidade de grânulos de insulina estocada próximo à membrana plasmática (BOSCHERO *et al.*, 1992; BOSCHERO, A.C., 1996; HENQUIN, 2000; RORSMAN & RESTRÖM, 2003).

A secreção de insulina estimulada pela glicose apresenta resposta bifásica, caracterizada por uma primeira fase rápida e transiente, seguida da segunda fase contínua e mais duradoura (BOSCHERO, A.C., 1996; STRAUB & SHARP, 2002).

A primeira fase secretora é provocada pela despolarização da membrana plasmática e pelo rápido aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} , provocando a liberação de um pequeno número de grânulos de insulina ancorados na membrana plasmática (HENQUIN, 2000; OHARA-IMAIZUMI *et al.*, 2007).

A segunda fase de secreção recruta os grânulos estocados no citoplasma da célula β pelo aumento contínuo da concentração intracelular de Ca^{2+} ativando a maquinaria de extrusão de grânulos (OHARA-IMAIZUMI *et al.*, 2007). Dessa forma, a segunda fase secretora ocorre pela ação mútua da via do canal K^+_{ATP} e a via independente do canal (STRAUB & SHARP, 2002).

Os canais K_{ATP} têm função importante no acoplamento do metabolismo celular à atividade elétrica. Estes são considerados primordiais na regulação da secreção de insulina induzidos por glicose e sulfoniluréias (AGUILLAR-BRYAN *et al.*, 1998), uma vez que podem ser ativados por altas concentrações de ADP intracelular, o que os mantém abertos, ou desativados pela pelo aumento da concentração de ATP, fechando-os (MIKI *et al.*, 1999; HUSSAIN & COSGROVE, 2005).

Os canais K_{ATP} são formados por octâmeros compostos por quatro subunidades receptoras de sulfoniluréia (SUR1) e quatro subunidades formadoras do poro (Kir6.2). SUR1 pertence à superfamília de proteínas denominadas *ATP-binding cassette* (ABC) e possui três domínios transmembranas. Kir6.2 é membro da família de proteínas retificadoras de canal de K^+ e apresenta com dois

domínios transmembranas (HUSSAIN & COSGROVE, 2005; NICHOLS, C.G., 2006).

SUR1 apresenta dois sítios de ligação para nucleotídeo na porção citoplasmática, localizados no laço entre o primeiro e o segundo domínio transmembrana e na porção C-terminal (HUSSAIN & COSGROVE, 2005). Este segundo sítio de ligação mostra maior afinidade para ATP e sulfoniluréia (ASHCROFT, S.J.H, 2006).

A subunidade Kir6.2 determina a abertura ou fechamento do canal, porém o sítio exato da ligação para o ATP ainda é controverso, acreditando-se encontrar-se no resíduo C-terminal. Entretanto a ligação do ATP à apenas uma das proteínas formadoras do canal é o suficiente para fechá-lo (TARASOV *et al.*, 2004; NICHOLS, C.G., 2006).

A perda da primeira fase secretora é sabidamente controlada pelos canais K_{ATP} e reconhecida como uma das causas do diabetes tipo 2 (HOSKER *et al.*; 1989). Curiosamente, nesses casos, a subunidade Kir6.2 pode estar super-expressa mas fica retida no Retículo Endoplasmático pois, algum defeito no processo impede que a mesma se acople à subunidade SUR1 não atingindo a membrana plasmática, resultando em hiperpolarização diminuição da secreção de insulina e prolongamento da hiperglicemia (SEGHERS *et al.*, 2000).

A expressão dos genes que codificam as proteínas do canal K_{ATP} é regulada pelo Foxa2 (Forkhead Box a2), também chamado de HNF3 β (Hepatocyte Nuclear Factor 3) (AGUILAR-BRYAN & BRYAN, 1999; SUND *et al.*, 2001; LANTZ *et al.*, 2004). Este fator de transcrição está relacionado também com a maturação da ilhota de Langerhans e com enzimas relacionadas ao metabolismo da glicose,

tais como frutose 1-6 bifosfatase e argininosuccinato sintetase (LANTZ *et al.*, 2004).

1.3 - INGAP e o pâncreas endócrino

No início da década de 90 foi proposta a existência de um fator (ou fatores), genericamente denominado de ilotropina, responsável por induzir a diferenciação das células produtoras de insulina a partir de células ductais. Esse fator, contido em um extrato protéico parcialmente purificado, foi obtido do pâncreas de *hamsters* após o envolvimento do órgão com papel celofane (PITTENGER *et al.*, 1992).

Nesse extrato, foi identificado um polipeptídeo denominado *Islet Neogenesis Associated Protein* (INGAP). Esse peptídeo é produzido somente no pâncreas, aparece preferencialmente no início da diferenciação celular e, apesar da homologia, apresenta regiões promotoras diferentes daquelas encontradas para o gene *Reg III δ* , relacionados à regeneração celular e são expressos em resposta a reações inflamatórias em diferentes tecidos. Essas características o tornam muito interessante para o estudo da diferenciação celular (VINIK *et al.*, 1996; TAYLOR-FISHWICK *et al.*, 2003).

O gene do INGAP dá origem a um transcrito de 850 pb que origina uma proteína de peso molecular de 19.940 Da. O INGAP possui diferentes sítios de regulação, sendo que o de maior atividade biológica se encontra entre os

aminoácidos 104 a 118, chamado de INGAP-PP (em vermelho na figura 1.2) (RAFAELOFF *et al.*, 1997).

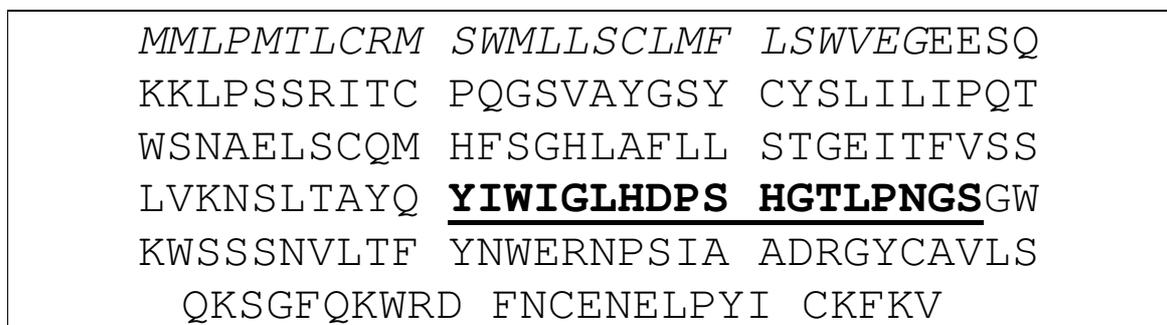


Figura 1.1. Seqüência de aminoácidos do INGAP. O peptídeo sinal está mostrado em itálico. A seqüência do INGAP-PP está indicada em negrito e sublinhada.

Vários resultados confirmam a ação do INGAP como fator de diferenciação celular no pâncreas endócrino. A administração de ilotropina aumentou a incorporação de [3H] timidina em células insulares, com retomada da ontogenia insular e redução em 50% da mortalidade em ratos tornados diabéticos por estreptozotocina (RAFAELOFF *et al.*, 1997.; TAYLOR-FISHWICK *et al.*, 2003). Cães saudáveis tratados com injeção intramuscular de INGAP apresentaram aumento na porcentagem de células insulino-positivas, na expressão do gene e da proteína da insulina (PITTENGER *et al.*, 2007).

Após administração de sacarose por cinco semanas (um dos procedimentos que aceleram a diferenciação celular do pâncreas endócrino) observou-se a presença de células positivas para o INGAP-PP na porção exócrina adjacente às ilhotas e nas células ductais do pâncreas de *hamsters* (DEL ZOTTO *et al.*, 2000). Houve aumento da massa insular como consequência da hipertrofia

e hiperplasia de células produtoras de insulina e, concomitantemente, redução de apoptose. Ainda, *hamsters* com 7 dias de vida, prole de mães tratadas com sacarose durante a prenhez, apresentaram menor glicemia em relação aos controles. Nesses animais houve um aumento de células ductais INGAP/PDX-1 positivas (GAGLIARDINO *et al.*, 2003).

Para verificar a ligação do INGAP-PP em diferentes tecidos, foi administrado intraperitonealmente em *hamsters* INGAP-PP marcado com ¹²⁵I-tirosina em diferentes intervalos de tempo. Somente pâncreas, fígado e intestino delgado apresentaram ligação ao INGAP-PP marcado. Esses resultados sugerem que o INGAP-PP, quando encontrado na circulação sanguínea, é degradado no fígado devido ao tempo de desaparecimento no sangue ser concomitante ao aumento da taxa de ligação nesse tecido (BORELLI *et al.*, 2007).

O PDX-1 é um fator de crescimento fundamental para o desenvolvimento do pâncreas endócrino, bem como um marcador para as células precursoras das células β em adultos. A presença de maior número de células positivas para INGAP/PDX-1 sinalizou a importância desta subpopulação de células como possível origem de novas células produtoras de insulina (RAFAELOFF *et al.*, 1998).

Potenciais sítios de ligação para fatores de transcrição relacionados ao desenvolvimento do pâncreas endócrino, tais como PDX-1, PAN-1 e NeuroD foram identificados no sítio de iniciação transcricional do gene do INGAP (TAYLOR-FISHWICK *et al.*, 2003). Entretanto, quando linhagens de células HIT-T15, transfectadas com gene repórter do promotor do INGAP, foram incubadas com combinações dos fatores de transcrição NeuroD, PAN-1 e PDX-1, verificou-se

que o PDX-1 atua como um inibidor da expressão do INGAP, uma vez que ele interage diretamente com a região promotora do gene. Embora paradoxais esses resultados sugerem que a expressão do PDX-1 serviria para inibir a expressão do INGAP, assim como ocorre na embriogênese. Nesta fase do desenvolvimento, o INGAP aparece expresso na dobra pancreática, momento em que o PDX-1 não é expresso. Dessa forma, o PDX-1 atuaria como um regulador do aumento da massa de células β , uma vez que é conhecido que este fator age como seu próprio repressor (TAYLOR-FISHWICK *et al.*, 2006).

Ilhotas de Langerhans de ratos adultos cultivadas por 4 dias com INGAP-PP apresentaram um maior aumento na secreção de insulina frente à glicose, leucina e arginina em relação às ilhotas de neonatos cultivadas na mesmas condições. Em presença de concentrações supralimiárias de glicose (16,7 mM), a curva dose-resposta ao INGAP-PP indica que houve potencialização da secreção de insulina em ilhotas cultivadas em presença de concentrações de INGAP entre 0,1 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$. Nessas concentrações de glicose a saturação foi alcançada em 10 $\mu\text{g/mL}$ do peptídeo. Em concentrações fisiológicas de glicose (8,3 mM), a potencialização ocorreu em concentrações de 0,5 a 10 $\mu\text{g/mL}$ de INGAP (BORELLI *et al.*, 2005).

Através técnica de *macroarray* observamos que algumas dezenas de genes relacionados à secreção de insulina e fatores de crescimento tiveram sua expressão aumentada em ilhotas de ratos neonatos após cultura de 4 dias em presença de INGAP-PP. Dentre esses genes, detectamos alguns relacionados com o controle da permeabilidade do K^+ nas células β pancreáticas, tais como SUR1, Kir6.2 e Foxa2 (BARBOSA *et al.*, 2006).

2 – OBJETIVOS

Neste trabalho tivemos por objetivo estudar os efeitos do INGAP-PP sobre o processo de secreção de insulina em ilhotas de ratos adultos mantidas em cultura por 4 dias.

Para isso analisamos:

A secreção estática e dinâmica da insulina frente a diferentes concentrações de glicose, concentrações despolarizantes de K^+ e tolbutamida;

As alterações na expressão das subunidades Kir6.2 e SUR1 que compõem o canal K^+_{ATP} e do seu fator de transcrição, o Foxa2;

O efluxo de $^{86}Rb^+$ (marcador do K^+) e;

A oxidação de glicose.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

Animais: Foram utilizados ratos Wistar com 90 dias de vida, provenientes do biotério central da UNICAMP.

Isolamento e cultura de ilhotas: As ilhotas foram obtidas método da digestão por colagenase. Após morte dos ratos por decapitação, o pâncreas foi inflado com solução de Hanks contendo 0,7 a 0,9 g de colagenase/L, então retirado e mantido a 37°C por, aproximadamente, 20 min. Após este tempo, as ilhotas foram lavadas e separadas pelo método de gradiente de Ficoll, nas concentrações de 27; 21,6 e 10,8%, diluídos em Hanks estéril. As ilhotas obtidas foram, então, colocadas em meio de cultura RPMI com 10 mM de glicose e 10 µg/mL de INGAP-PP durante 4 dias, a 37°C.

Extração do RNAm: RNA total foi extraído de cerca de 500 a 800 ilhotas isoladas através da adição de 1 mL de reagente Trizol (Invitrogen - Life Technologies). As ilhotas foram homogeneizadas em vortex e incubadas por 5 min em temperatura ambiente. Em seguida, 200 µL de clorofórmio foram adicionados e as amostras vigorosamente homogeneizadas durante 15 seg. Após incubação de 3 minutos em temperatura ambiente, foram centrifugadas a 12.000 G durante 15 minutos a 4°C. O volume correspondente à fase aquosa foi transferido para outro tubo e o RNA precipitado através da adição de 500µL de álcool isopropílico, seguido de 10 min de incubação em temperatura ambiente. Nova centrifugação a 12.000 G durante

15 min a 4°C foi realizada, o pellet obtido foi lavado em seguida com 1 mL de etanol 75%, centrifugado a 7500 G por 10 min a 4°C e, posteriormente, lavado com 1 mL de etanol 100%. O etanol foi descartado e o pellet parcialmente seco em estufa a 37°C. As amostras foram re-suspensas em 30 µL de água previamente tratada com DEPC.

A integridade do RNA obtido foi verificada através de eletroforese em gel de agarose desnaturante para visualização das unidades ribossomais 28 e 18S, após coloração com brometo de etídeo (Gel Doc EQ - BioRad), e a quantificação do mesmo foi obtida através de leituras de absorbâncias a 260 e 280 nm em aparelho quantificador (GeneQuant - Pharmacia Biotech).

Obtenção de cDNA a partir de RNA total - A padronização da reação da transcriptase reversa foi realizada a 42°C durante 50 minutos, em 20 µL de uma mistura contendo diferentes concentrações de RNA total (0,5, 1,0, 1,5 e 2 µg), 10 mM de dNTP mix, 40U/µL de inibidor de RNase, 0,1 M de DTT, 5× first-strand buffer, 0,5 µg/mL de oligo dT e 200 U da enzima *Super Script II RNase H- Reverse Transcriptase* (Invitrogen – Life Technologies).

RT-PCR - O cDNA resultante foi amplificado com os *primers sense* e *antisense* confeccionados. A reação de PCR foi realizada, em duplicata, em 25 µL de uma mistura contendo tampão da Taq polimerase, 50 mM de MgCl₂, 10 mM de cada deoxinucleosídeo trifosfato, 2,5 U/µL de Taq DNA polimerase, 10 pmol de primer sense, 10 pmol de primer antisense e cDNA. Tanto o número de ciclos de

amplificação quanto o controle interno utilizados foram, ainda, padronizados. Alíquotas de 10µL do produto da PCR foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1,8% preparado em tampão TBE. Após coloração com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) o gel foi visualizado e fotografado sob luz UV (Gel Doc EQ - BioRad), e a quantificação das bandas em programa Quantity One (BioRad), para análise estatística. Os *primers* utilizados foram: Kir6.2 :*Sense* 5' TTAGCGCCACCATTTCATATG 3' *Antisense* 5' TCCGGAAGATGCTAAACTTG 3', 31 ciclos, 62°C; SUR1: *Sense* 5'TTC CAC ATC CTG GTC ACA CCG3' *Antisense* 5'AGA AGG AGC GAG GAC TTG CCA C3', 29 ciclos, 62°C; Foxa2: *Sense*: 5'CTG AGT GGA AAC ATT GGG G3', *Antisense*: 5'GAT TTG TGG AACTCT GGC CA3', 29 ciclos, 62°C; RPS29: *Sense*: 5'AGG CAA GAT GGG TCA CCA GC3', *antisense*: 5'AGT CGA ATC ATC CAT TCA GGT CG3', 29 ciclos, 54°C. Os resultados foram expressos como razão em relação ao grupo controle, após a divisão da quantificação das bandas obtidas para cada gene pela respectiva quantificação do controle interno. O n é contabilizado por cada *pool* de ilhotas utilizado.

Secreção estática: Grupos de 5 ilhotas foram pré-incubados em solução de Krebs-bicarbonato por 30 min a 37°C e pH 7,4. A seguir, o meio de pré-incubação foi descartado e as ilhotas incubadas por período suplementar de 60 min, também em Krebs-bicarbonato o qual continha diferentes concentrações de glicose (ou de outros agentes estimuladores ou inibidores). Após incubação, uma alíquota do sobrenadante foi estocada a -20°C para posterior dosagem de insulina. A insulina

contida nos meios de incubação (secreção estática) foi avaliada por radioimunoensaio e a curva padrão confeccionada com insulina de rato.

Secreção dinâmica: grupos de 60 ilhotas foram transferidos para 4 câmaras (Swinnex SX 000/300, Millipore, volume de 0,25 mL) e perfundidas com solução Krebs-bicarbonato acrescida de albumina bovina (3 mg/mL) contendo diferentes concentrações de glicose, 100 μ M de tolbutamida ou 40 mM de KCl. As soluções de perfusão foram acondicionadas em Erlenmeyers de 150 mL, mantidos em banho-maria a 37°C. As câmaras foram conectadas a estes frascos através de catéteres (0,6mm de diâmetro) e a solução nutritiva impulsionada através do sistema de perfusão com auxílio de uma bomba peristáltica de quatro canais (ISMATC mod. 7331-10) a 1.1 mL/min. Torneiras de três vias, colocadas próximo aos Erlenmeyers, propiciaram as mudanças das soluções. As ilhotas foram perfundidas por 30 min antes de iniciar a coleta. Durante os próximos 70 min de perfusão, o efluente foi coletado a cada 2 min no período inicial, 1 min nos últimos 5 min com a solução de menor concentração de glicose e nos 10 minutos após a troca para a solução de maior concentração, retornando a 2 min nos próximos 20 min, terminando em 3 min até completar os 70 min de perfusão. A quantidade de insulina secretada foi mensurada por radioimunoensaio.

Efluxo de ^{86}Rb : Grupos de 100 ilhotas cultivadas foram pré-incubadas por 90 min em solução de Krebs-bicarbonato contendo $^{86}\text{RbCl}$ (1.0 – 2.0 MBq/mL) e 8.3 mM de glicose, então lavadas por 3 vezes e transferidas para o sistema de perfusão descrito anteriormente. Depois de um período de 25 min para adaptação, o

efluente foi coletado a cada 2 min e o efluxo de ^{86}Rb mensurado em contador beta. Diferentes concentrações de glicose foram utilizadas no meio de perfusão. Os resultados foram expressos em relação ao conteúdo total de ^{86}Rb incorporado pelas ilhotas. Este foi obtido pela leitura de radiatividade contida em cada grupo de ilhotas após o procedimento somada às leituras das amostras recolhidas em cada intervalo de tempo.

Identificação e quantificação protéica por imunoblotting: As proteínas estudadas neste projeto foram avaliadas pela técnica de *Western blotting*. As ilhotas foram homogeneizadas (Politron PTA 20 S, Brinkmann Instrumental model PT 10/35) por 30 segundos, em tampão de solubilização (10% Triton-X 100, 100 mM Tris, pH=7.4), 10 mM pirofosfato de sódio, 100 mM fluorido de sódio, 10 mM EDTA, 10 mM vanadato de sódio e 2 mM PMSF) por sonicação, 6 pulsos de 5 segundos com 15 segundos de intervalo entre os pulsos (VirSoni 60). Os extratos foram centrifugados a 15000 rpm em 4°C por 20 min para remoção do material insolúvel. A concentração protéica do sobrenadante foi mensurada usando método do corante de Bradford e o reagente BioRad. Alíquotas do sobrenadante foram, então, utilizadas para precipitação por anticorpos para as diferentes proteínas estudadas. As amostras foram tratadas com tampão Laemmili contendo DDT 10 mM, aquecidas em água fervente por 5 minutos. 100 µg de cada amostra foi aplicada, em duplicata, no SDS-PAGE (10% Tris acrilamida) em aparelho minigel (Miniprotean - BioRad) em paralelo com marcadores de pesos moleculares conhecidos. Após a corrida, as proteínas foram transferidas para membrana de

nitrocelulose a 120 V por 90 min. Esta foi, então, incubada por duas horas em solução bloqueadora (5% de leite desnatado em pó, 10% Trizma, 150 mM NaCl e 0,02% Tween 20) para diminuir a ligação inespecífica das proteínas. A seguir, as membranas foram incubadas com anticorpos primários Foxa 2 (1:500) e SUR1 (1:500), ambos Santa Cruz, CA, USA) diluídos em solução bloqueadora (3% de albumina, 10% Trizma, 150 mM NaCl e 0,02% Tween 20) por 12 horas. Em seguida, as membranas foram lavadas em solução basal (10% Trizma, 150 mM NaCl e 0,02% Tween 20), e incubadas em solução com anticorpo secundário (1:1000) correspondente ao anticorpo primário utilizado por 90 min. Por fim, as membranas foram incubadas com Luminol e peroxidase, por aproximadamente 5 min, e expostas a filme para a visualização das bandas. Estas foram analisadas por densitometria. Os resultados foram expressos como a razão do grupo tratado em relação ao grupo controle.

Oxidação da glicose: o consumo de glicose das ilhotas cultivadas com ou sem INGAP foi avaliado segundo método descrito por Malaisse e colaboradores (1974). Esta foi processada com incubação, por duas horas, de grupos de 15 ilhotas colocados em frascos de vidro (vol 0,5 mL) em 100 μ L de solução de Krebs-bicarbonato contendo 0,1 a 0,2 MBq/mL de [U-¹⁴C]D-glicose, em presença de 11,1 mM de glicose, pH 7,4 a 37 °C. Esses frascos foram acondicionados dentro de outros maiores os quais, por sua vez, foram fechados com tampa de borracha. Após incubação, foram adicionados aos tubos que contem as ilhotas 0,1 ml de HCl (0,1N) para interromper a oxidação da glicose e 0,5 mL de hidróxido de

hyamina nos frascos suporte para a captação do $^{14}\text{CO}_2$ liberado durante a incubação. Os tubos foram mantidos a 4°C por 1h para a captação de todo o CO_2 . Após a leitura da radioatividade contida em cada frasco, a quantidade de glicose consumida/ilhota/h foi expressa.

Análise estatística: Os resultados foram expressos como média \pm EPM. As comparações estatísticas entre os grupos das ilhotas controle e das ilhotas tratadas com INGAP-PP foram feito utilizando teste t de Student ou ANOVA. O valor de $P < 0,05$ foi utilizado como indicativo de diferença significativa.

4 - RESULTADOS

Efeito do INGAP-PP sobre a expressão gênica e protéica:

A figura 1 mostra que o INGAP-PP aumentou a transcrição dos genes Kir6.2 e SUR1 que codificam as proteínas formadoras do canal K_{ATP} em ilhotas pancreáticas (2,3 e 1,5 vezes em relação ao grupo controle, respectivamente, $P < 0,05$). INGAP-PP também aumentou a expressão gênica do Foxa2, um fator de transcrição importante que controla a expressão dos genes SUR1 e Kir6.2 (1,5 vezes de aumento em relação ao grupo controle, $P < 0,05$).

O aumento na expressão de proteína do SUR1 e do Foxa2 também foi encontrado nas ilhotas tratadas com INGAP-PP (2,8 e 1,5 vezes de aumento em relação ao controle, respectivamente; $P < 0,05$) (Fig. 2).

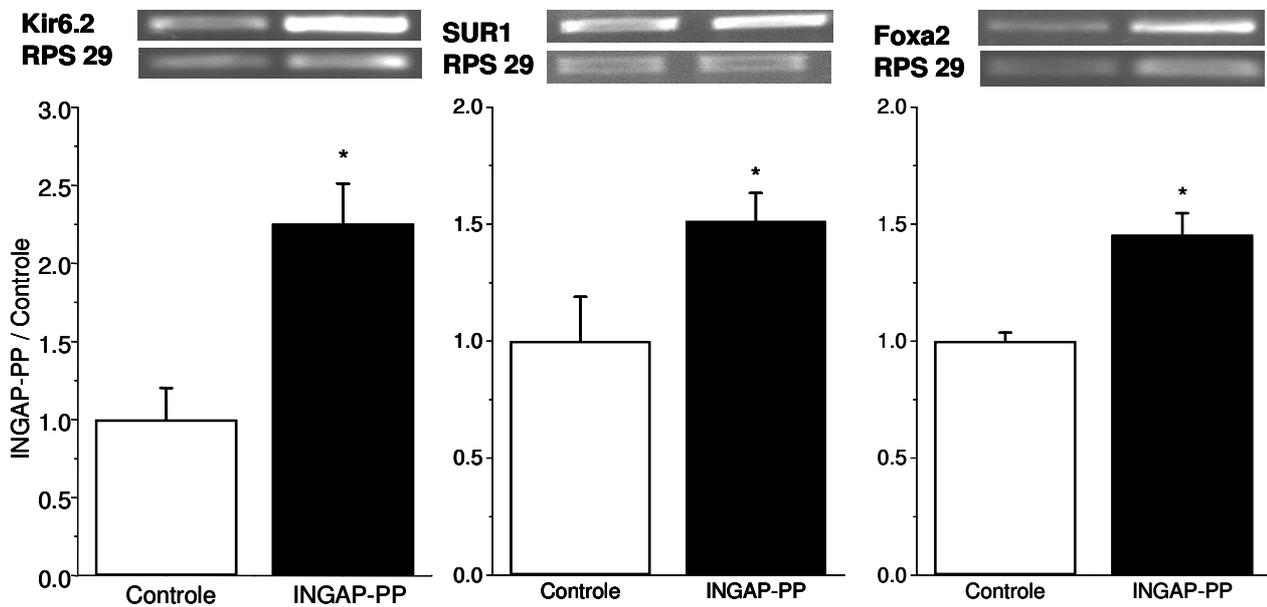


Figura 1. Análise semi-quantitativa por RT-PCR da expressão gênica do Kir6.2, SUR1 e Foxa2 em ilhotas de ratos adultos cultivadas por 4 dias na presença ou ausência de 10 $\mu\text{g/ml}$ de INGAP-PP. As barras representam a média \pm EPM de cinco experimentos realizados com seus respectivos *primers* (veja Materiais e Métodos) e normalizados pela expressão de RPS-29. Posteriormente as medias foram normalizadas pela media das ilhotas controle. *P < 0,05 para controle vs. INGAP-PP.

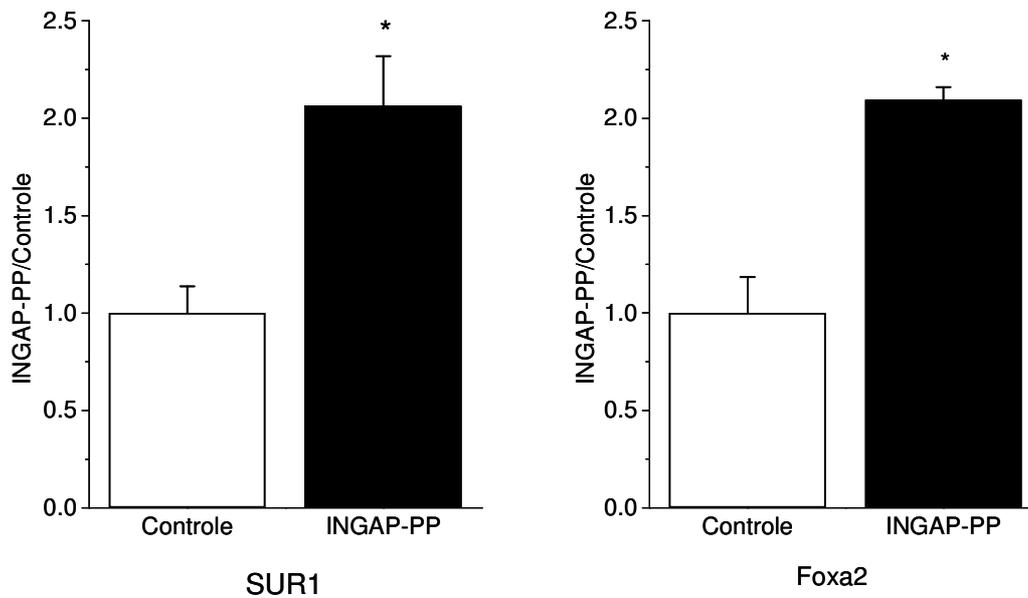


Figura 2. Expressão protéica do SUR1 e Foxa2 em ilhotas de ratos adultos cultivadas por quatro dias na presença ou ausência de 10 µg/mL de INGAP-PP. Quantidades iguais de extrato protéico foram submetidos a eletroforese SDS-PAGE, transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com anticorpo anti-SUR1 e anti-Foxa2, respectivamente. Os valores normalizados representam valores da média ± EPM de três experimentos. *P < 0,05 para controle vs. Ilhotas tratadas com INGAP-PP.

Efeito do INGAP-PP na secreção de insulina:

Ilhotas pancreáticas de ratos adultos cultivadas com INGAP-PP e então incubadas por 1 h com crescentes concentrações de glicose (2,8 a 22,2 mM) secretaram, significativamente, mais insulina em relação aquelas cultivadas sem o peptídeo em todas as concentrações de glicose (Fig. 3). Como consequência, a curva dose-resposta à glicose no grupo INGAP-PP foi deslocada para a esquerda em relação ao grupo controle, com EC_{50} de $10,0 \pm 0,4$ e de $13,7 \pm 1,5$ mM, respectivamente ($P < 0,05$). A figura 3 também mostra uma curva dose-resposta à glicose obtida com ilhotas frescas isoladas. Em concentrações sub-limiare e limiaries de glicose (2,8 – 8,3 mM) a secreção de insulina das ilhotas frescas e as cultivadas com INGAP-PP se mostraram similares, contudo a secreção foi significativamente maior em ilhotas frescas em altas concentrações de glicose quando comparadas com as tratadas com INGAP-PP (11,1 – 22,2 mM de glicose), ($P < 0,05$).

Concentrações despolarizantes de KCl também induziram maior resposta na secreção de insulina nas ilhotas tratadas com INGAP-PP quando comparadas às controle (Fig. 4A). Em 2,8 mM de glicose, o INGAP-PP tornou as ilhotas mais sensíveis a tolbutamida (100 μ M). Entretanto, não foi observado efeito potencializador do INGAP-PP sobre a secreção de insulina, induzida por tolbutamida, na presença de 22,2 mM de glicose (Fig 4B).

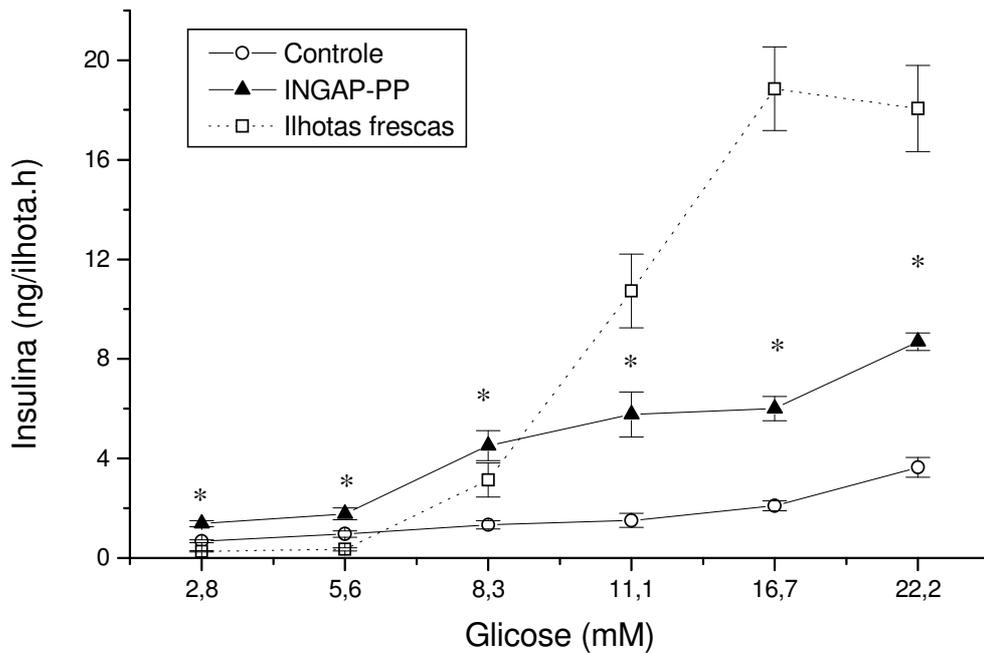


Figura 3. Efeitos do tratamento com INGAP-PP sobre a secreção de insulina. Ilhotas isoladas de ratos adultos cultivadas por quatro dias com ou sem 10 µg/mL de INGAP-PP, e então incubadas por 1 h com crescentes concentrações de glicose (2,8 a 22,2 mM). Valores representam as médias ± EPM de 6 a 12 amostras de dois experimentos independentes. *P < 0,05 para controle vs. ilhotas tratadas com INGAP-PP. Para efeito de comparação, uma curva dose-resposta de insulina a glicose obtidas com ilhotas isoladas frescas também foi mostrada (linha pontilhada).

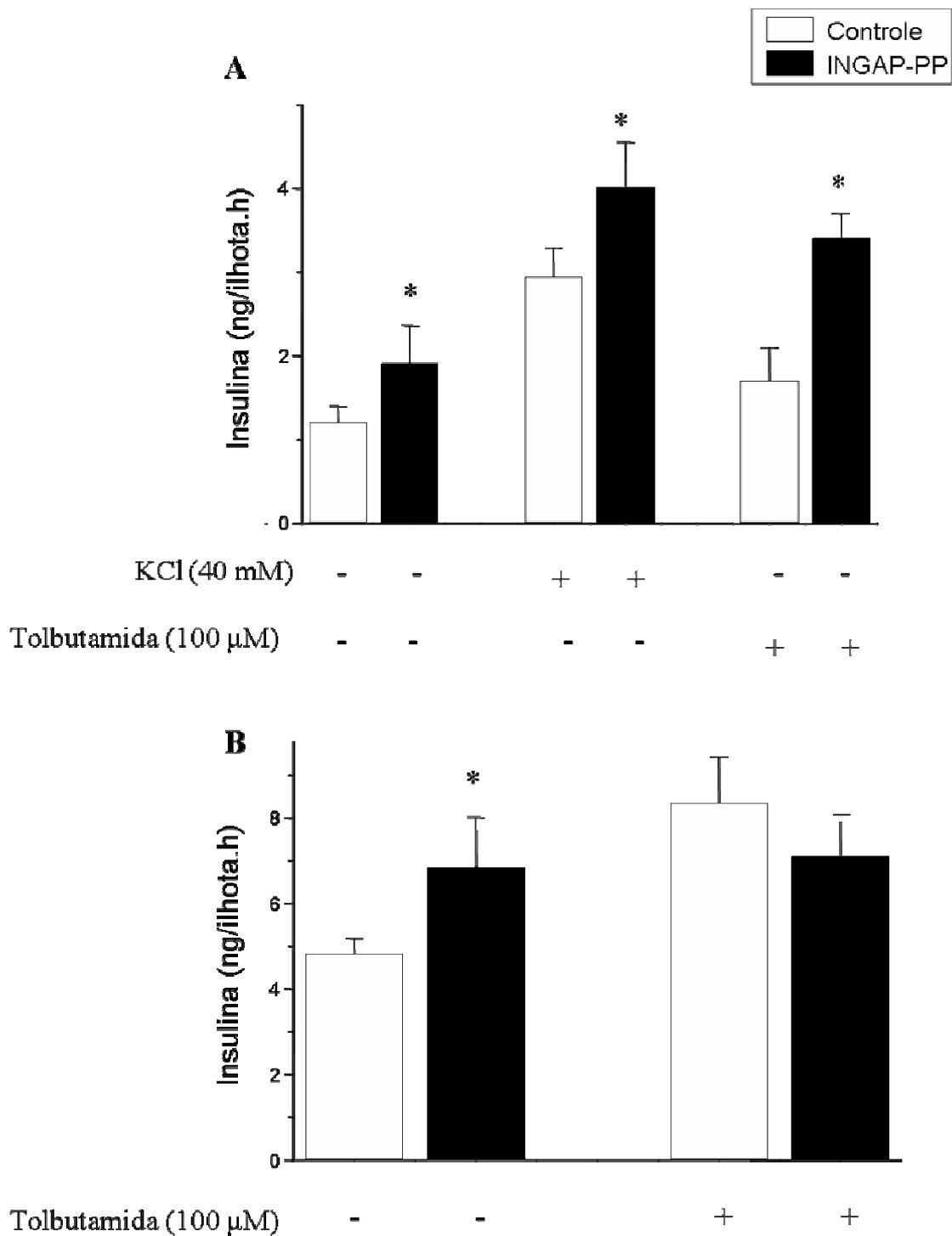


Figura 4. Efeitos de 40 mM de KCl e 100 μ M de tolbutamida sobre a secreção de insulina de ilhotas tratadas com INGAP-PP e ilhotas controle. Ilhotas isoladas de

ratos adultos foram cultivadas por quatro dias com ou sem 10 µg/ml de INGAP-PP, e incubadas por 1h com 2,8 (A) ou 22,2 mM de glicose (B). As barras representam a média ± EPM de 6 amostras de 2 experimentos diferentes. *P < 0,05 para controle vs. ilhotas tratadas com INGAP-PP.

Estudos de secreção dinâmica revelaram que em presença de 2,8 mM de glicose (min 35 – 45), a secreção de insulina foi ligeiramente maior, porém não significativa, nas ilhotas tratadas com INGAP-PP quando comparadas às controle. A adição de 22,2 mM de glicose à solução de perfusão (min 46), entretanto, induziu aumento significativo na secreção bifásica de insulina (Fig. 5A) em ambos os grupos. Na primeira fase (min 58), a secreção de insulina alcançou um pico de 196 ± 66 e 81 ± 30 pg/ilhota⁻¹ nas ilhotas tratadas com INGAP-PP e nas controle, respectivamente (P < 0,05). A área sob a curva (min 55 - 68) também foi maior nas ilhotas cultivadas com o peptídeo em relação ao controle (1400 ± 100 vs. 700 ± 60 ng/ilhota/10 min, respectivamente; P < 0,05). Na presença de 5,6 mM de glicose, tolbutamida (100 µM) induziu uma secreção bifásica de insulina, caracterizada por uma primeira fase efêmera seguida por uma segunda fase também transiente nas ilhotas controle. A primeira fase da secreção induzida por tolbutamida (min 55 - 60) foi significativamente maior nas ilhotas tratadas com INGAP-PP quando comparadas com as controle, com a área sob a curva de $34 \pm 1,0$ e $15 \pm 0,4$ pg/ilhota/min, respectivamente (P < 0,05). Por outro lado, a segunda fase secretora de insulina (min 61 - 68) foi maior nas ilhotas controle do que nas tratadas (P < 0,05) (Fig. 5B).

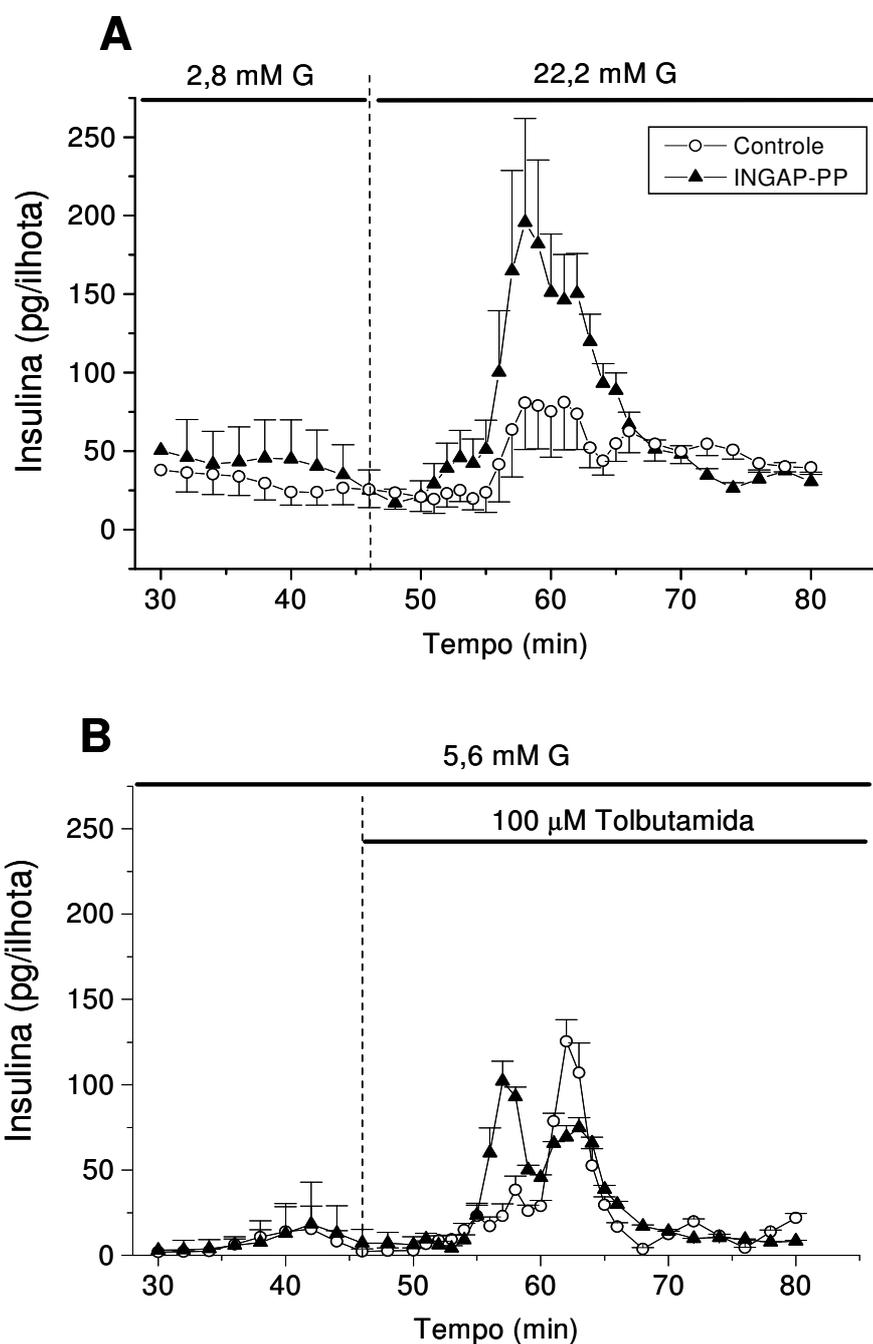


Figura 5. Alterações induzidas pelo tratamento com INGAP-PP sobre o perfil dinâmico secreção de insulina estimuladas com 22,2 mM de glicose ou 100 μM tolbutamida. Depois de quatro dias em cultura com ou sem INGAP-PP, as ilhotas

foram perfundidas durante 80 min. Em **A**, iniciou-se com solução contendo 2,8 mM de glicose e durante o experimento a concentração foi aumentada para 22,2 (45 - 70 min). Em **B**, solução contendo 5,6 mM de glicose esteve presente durante todo o experimento e a tolbutamida (100 μ M) foi introduzida no min 46 até o final do experimento. Valores representam média \pm EPM de 4 experimentos.

Efeito do INGAP-PP no efluxo de ^{86}Rb :

A razão do efluxo de ^{86}Rb (utilizado como substituto ao K^+) na ausência de glicose (min 26 - 40) foi similar em ambos os grupos. A adição de 22,2 mM de glicose à solução de perfusão induziu redução significativa do efluxo ^{86}Rb em ambos os grupos. Este efeito da glicose foi rápido, sustentado e, rapidamente revertido com a remoção da glicose do meio (min 60) (Fig. 6). A razão média do efluxo (min 48-60) foi de $4,37 \pm 0,06$ e $5,16 \pm 0,06$ para as ilhotas tratadas com INGAP-PP e as controle, respectivamente ($P < 0,05$). A velocidade de redução na razão do efluxo de ^{86}Rb , induzido por 22,2 mM de glicose (min 40 - 46), foi maior nas ilhotas tratadas com INGAP-PP quando comparada às ilhotas não tratadas, como mostrado pela regressão linear ($-13,1 \pm 3,7$ para INGAP-PP vs. $-6,6 \pm 0,3$ para as ilhotas controle; $P < 0,05$) (inserto da Fig. 6).

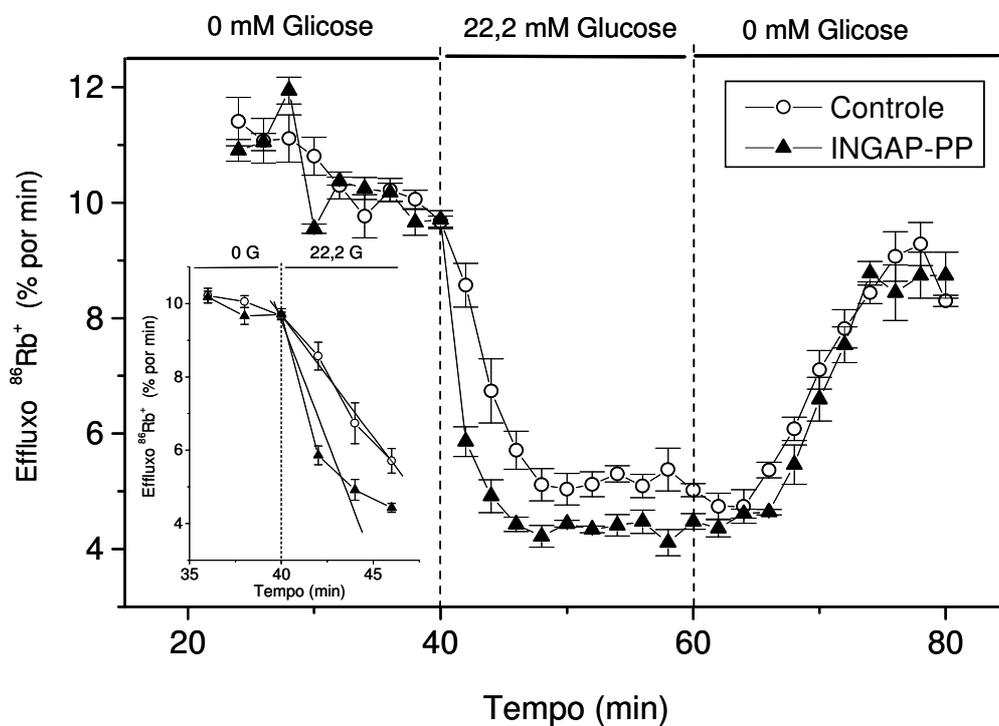


Figura 6. Efeito de 22,2 mM de glicose sobre o efluxo de ^{86}Rb de ilhotas controle e tratadas com INGAP-PP. Após quatro dias em cultura com ou sem 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ INGAP-PP, grupos de 100 ilhotas foram pré-incubadas com $^{86}\text{RbCl}$ (1-2 MBq/ml) em presença de 8.3 mM glicose, lavadas três vezes, e transferidas para a câmara de perfusão. Depois de 25 min de adaptação, o meio efluente foi continuamente coletado a cada dois min, até o min 80. Glicose (22.2 mM) esteve presente apenas entre os min 40 e 60. Valores representam médias \pm EPM de quatro experimentos. A figura inserida ilustra a regressão linear de cada curva entre os min 40 e 46.

Efeito do INGAP na utilização da glicose:

A razão de utilização da glicose, mensurada como a produção de $^{14}\text{CO}_2$ a partir da $\text{U}(^{14}\text{C})\text{D}$ -glicose foi semelhante entre os grupos estudados ($47 \pm 2,7$ vs. $45 \pm 2,8$ pmol/ilhota.h, respectivamente) (Fig. 7).

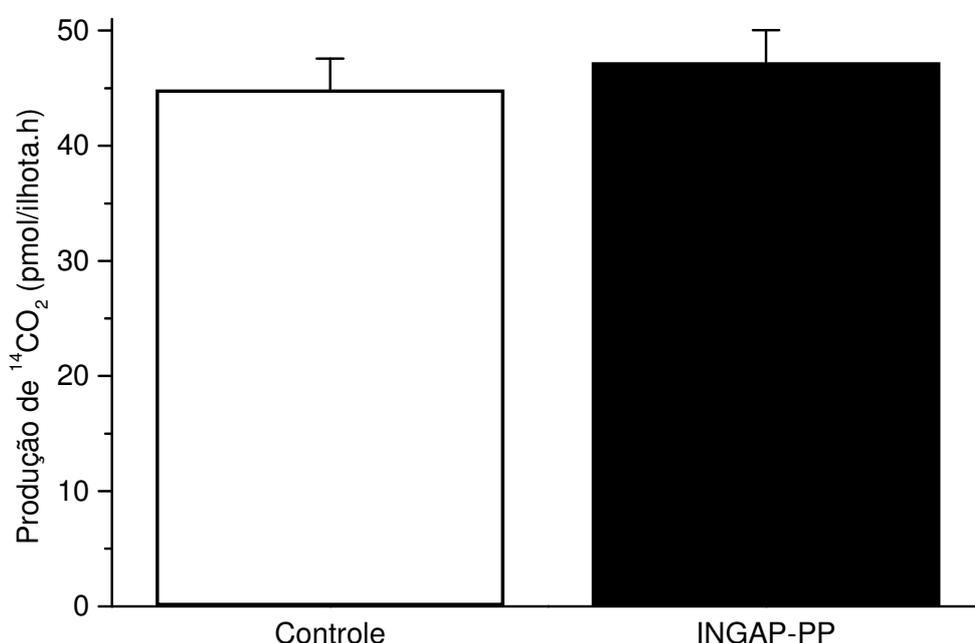


Figura 7. Produção de $^{14}\text{CO}_2$ em ilhotas controle e tratadas com INGAP-PP. Ilhotas isoladas de ratos adultos após cultura por quatro dias com ou sem 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de INGAP-PP foram separadas em grupos de 30 ilhotas e inicialmente pré-incubadas por 1h em meio contendo 5.6 mM de glicose. Em seguida, foram incubadas por 2 h em solução contendo 11,1 mM de glicose e traços de $\text{U}(^{14}\text{C})\text{D}$ -glicose. Barras representam média \pm EPM de 6 experimentos.

5 – DISCUSSÃO

Os resultados obtidos mostram que ilhotas isoladas de ratos Wistar adultos cultivadas com INGAP-PP apresentam maior secreção de insulina em resposta a estímulos metabólicos (glicose) e não metabólicos (40 mM KCL e 100 µg/mL tolbutamida) quando comparadas às ilhotas cultivadas sem o peptídeo. Esses dados sugerem que o efeito do INGAP-PP sobre o aumento da secreção de insulina poderia resultar de sua ação sob uma via não metabólica, uma vez que estes estímulos fazem parte de um passo comum da despolarização da membrana da célula β , com conseqüente abertura dos canais de Ca^{2+} voltagem-dependente, aumento das concentrações intracelulares de Ca^{2+} resultando na secreção de insulina (MEARS, D., 2004). O aumento da expressão dos componentes do canal K_{ATP} (SUR1 e Kir6.2) e reduções no efluxo de ^{86}Rb , mas sem alterar a oxidação da glicose nas ilhotas tratadas com INGAP-PP confirmam essa hipótese. Assim, podemos inferir que no modelo estudado o INGAP-PP potencializou a secreção de insulina a diferentes secretagogos através aumento do número dos canais de K_{ATP} .

Ilhotas frescas incubadas por 1 h secretam insulina de maneira dose-dependente como mostrado na figura 3 (linha pontilhada). Após cultura por 4 dias em meio RPMI, a secreção é sabidamente menor que ilhotas frescas (Fig. 3, controle) (BOSCHERO *et al*, 1990). A adição de INGAP-PP ao meio de cultura promoveu aumentos significativos na secreção de insulina em todas as concentrações de glicose estudadas, comparado às cultivadas controles. Pode-se

observar que o INGAP-PP restaurou a secreção de insulina trazendo-a a níveis comparáveis àqueles encontrados em ilhotas frescas quando da utilização de concentrações fisiológicas de glicose (5,6 – 8,3 mM de glicose). Com base nestes resultados, cremos que o INGAP-PP poderá ser utilizado como ferramenta para manutenção da resposta induzida por glicose em ilhotas estocadas para futuros transplantes.

Na presença de concentrações sub-limiáres de glicose, a tolbutamida estimulou a secreção de insulina com maior propriedade em ilhotas cultivadas com INGAP-PP do que em ilhotas controles (Fig. 4A). Entretanto, o efeito da tolbutamida não apresentou diferença entre os grupos quando do uso de 22.2 mM de glicose (Fig. 4B). Estes resultados podem indicar que em 22.2 mM de glicose a maior parte dos canais K_{ATP} já se encontravam fechados tanto nas ilhotas controle quanto nas cultivadas com INGAP-PP.

INGAP-PP também aumentou significativamente a secreção estimulada por glicose no modelo de secreção dinâmica. Em ilhotas perfundidas com 5.6 mM de glicose a adição de tolbutamida ao meio de perfusão provocou resposta bifásica de insulina, mas em menor proporção que a encontrada em resposta à alta concentração de glicose. Sob essas condições as ilhotas controles apresentaram uma primeira fase secretora pequena, entretanto o tratamento com INGAP-PP aumentou, significativamente, o tamanho da primeira fase e diminuiu a segunda fase secretora. Este efeito sobre a primeira fase secretora é particularmente interessante, uma vez que esta fase é menor ou inexistente em pessoas com

intolerância à glicose e diabetes tipo 2, respectivamente (DEL PRATO *et al.*, 2002.).

Da mesma forma que ocorre em ilhotas de ratos neonatos (BARBOSA *et al.*, 2006), INGAP-PP induziu em ilhotas de ratos adultos um aumento simultâneo da expressão dos genes das subunidades SUR1 e Kir6.2, bem como do Foxa2, que regula a expressão dessas duas proteínas. Foxa2 também age como fator de transcrição requerido para a manutenção do PDX-1 e sua deleção reduz a expressão gênica e protéica do PDX-1 em células β (LANTZ & KAESTNER, 2005). Desta maneira, todos esses efeitos do Foxa2 desempenhariam uma função importante no controle da massa e atividade da célula β (LEE *et al.*, 2002; LANTZ, K.A., 2004; LANTZ & KAESTNER, 2005).

Artigos recentes mostram que o INGAP-PP promove aumentos na secreção de insulina induzida por glicose, na massa de célula β , na razão de replicação da célula β , da neogênese de ilhotas e diminui a razão de apoptose de células β com aumento simultâneo de células alojadas no ducto, nas ilhotas e nos ácinos pancreáticos. Estes co-expressam INGAP/PDX1 apresentando alta razão de replicação celular em animais neonatos (7 dias) descendentes de hamsters com diabetes induzida por sacarose (GAGLIARDINO *et al.*, 2005). Camundongos *Foxa2*^{loxP/loxP}; Ins.Cre apresentam uma redução na expressão protéica de PDX-1 (LEE *et al.*, 2002). Estes dados sugerem uma ligação funcional entre INGAP, Foxa2/PDX1, manutenção e massa de células β e os canais K_{ATP}.

Esses resultados justificam estudos futuros para desenvolvimento do uso do INGAP-PP para a manutenção da secreção de insulina em resposta a glicose em ilhotas cultivadas e talvez para seu uso no tratamento do diabetes.

6- CONCLUSÕES

1. As ilhotas de ratos adultos cultivadas por 4 dias em presença de 10 $\mu\text{g/ml}$ de INGAP-PP tornaram-se mais sensíveis a diferentes concentrações de glicose, concentrações despolarizantes de K^+ e tolbutamida quando comparado com ilhotas controles. O efeito benéfico do tratamento com o polipeptídeo foi mais evidente na presença de concentrações fisiológicas de glicose, ou seja, 8,3 mM.
2. O tratamento com INGAP-PP também recuperou a primeira fase secretora da insulina, fato esse de grande importância uma vez que o desaparecimento da resposta rápida à glicose é uma das primeiras anomalias registradas quando da instalação do diabetes tipo 2.
3. Ilhotas tratadas com INGAP-PP apresentaram maior expressão das proteínas formadoras dos canais K^+_{ATP} , SUR1 e Kir6.2, bem como do fator de transcrição Foxa2 que controla a expressão dessas proteínas.
4. O efeito da glicose (22.2 mM) em reduzir a permeabilidade ao ^{86}Rb foi mais acentuada nas ilhotas tratadas com INGAP-PP quando comparado às ilhotas controles. Permitindo-nos inferir que o efeito sobre as expressões das proteínas formadoras do canal K^+_{ATP} resultou na maior sensibilidade do canal à hexose.

O conjunto desses resultados indica que o INGAP-PP tornou as ilhotas mais sensíveis à glicose e tolbutamida pelo aumento do número e/ou sensibilidade dos canais K^+_{ATP} . O tratamento com INGAP-PP, de modo geral, protegeu as

ilhas das condições adversas impostas pela cultura, corroborada pela maior secreção de insulina pelas ilhotas tratadas com o polipeptídeo mesmo em condições onde não há participação dos canais K^+_{ATP} , por exemplo, quando da estimulação por altas concentrações de KCl.

7 – REFERÊNCIAS

AGUILAR-BRYAN, L. & BRYAN, J. Molecular biology of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. **Endocr Rev.** 20:101-35, 1999.

AGUILLAR-BRYAN L, CLEMENT IV J.P, GONZALEZ G, KUNJILWAR, K, BABENKO A, BRYAN J. Toward understanding the assembly and structure of KATP channels. **Physiol. Rev.** 78: 227-45, 1998.

ACKERMANN, A.M. & GANNON, M. Molecular regulation of pancreatic (-cell mass development, maintenance, and expansion. **Journal of Molecular Endocrinology.** 38: 193-206, 2007.

ASHCROFT, F.M. KATP channels and insulin secretion: a key role in health and disease. **Biochemical Society Transactions** 34:243-246, 2006.

BARBOSA H, BORDIN S, STOPPIGLIA LF, SILVA KE, DEL ZOTTO H, GAGLIARDINO JJ, BOSCHERO AC. Islet Neogenesis Associated Protein (INGAP) modulates gene expression in cultured neonatal rat islets. **Regulatory Peptides**136: 78-84, 2006.

BONNER-WEIR, A.; DEERY,D.; LEARHY, J.L.; WEIR, G. Compensatory growth of pancreatic B-cells in adult rats after short-term glucose infusion. **Diabetes** 38:49,53, 1989.

BORELLI, M.I.; DEL ZOTTO, H.; FLORES, L.E.; GARCÍA, M.E.; BOSCHERO, A.C.; GAGLIARDINO, J.J. Transcription, expression and tissue binding in vivo of INGAP and INGAP-related peptide in normal hamsters. **Regul. Pept.** 140: 192-7, 2007.

BORELLI, M.I.; STOPPIGLIA, L.F.; REZENDE L.F.; FLORES, L.E., DEL ZOTTO H.; BOSCHERO, A.C.; GAGLIARDINO, J.J. INGAP-related pentadecapeptide: its modulatory effect upon insulin secretion. **Regul Pept.**,131:97-102, 2005.

BOSCHERO, A.C. Acoplamento da estimulação-secreção de insulina pelas células β pancreáticas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, 40: 149-55, 1996.

BOSCHERO, A.C.; BORDIN, S.; HERCHUELZ, A.; LEBRUN, P. Effects of glucose concentration and insulin release from freshly isolated and cultured adult rat islets. **Cell Calcium**, 11:603-609, 1990.

BOSCHERO, A.C.; BORDIN, S.; PLASMAN, P.O.; HERCHUELZ, A. Effect of glucose and K^+ depolarization on cytosolic free Ca^{2+} in cultured neonatal islets. **Horm Metab Res.**, 24:51-2,1992.

BOUWENS, L. & ROOMAN, I. Regulation of pancreatic beta-cell mass. *Physiol. Rev* 85: 1255-70, 2005.

DEL PRATO, S.; MARCHETTI, P.; BONADONNA, R.C. Phasic insulin release and metabolic regulation in type 2 diabetes. **Diabetes** 51:S109-S116, 2002.

DEL ZOTTO, H., MASSA, L.; RAFAELOFF, R.; PITTENGER, G.L.; VRANIK, A.; GOLD, G.; REIFEL-MILLER, R.; GAGLIARDINO, J.J. Possible relationship between changes in islet neogenesis and islet neogenesis-associated protein-positive cell mass induced by sucrose administration to normal hamsters. **J Endocrinol** 165:725-33, 2000.

DONATH, M.Y. & HALBAN, P.A. Decreased beta-cell mass in diabetes: significance, mechanisms and therapeutic implications. **Diabetologia**, 47: 508-589, 2004.

GAGLIARDINO, J.J.; DEL ZOTTO, H.; MASSA, L.; FLORES, L.E.; BORELLI, M.I. Pancreatic duodenal homeobox-1 and islet neogenesis-associated protein: a possible combined marker of activatable pancreatic cell precursors. **J Endocrinol** 177:249-59, 2003.

GLOYN, A. L.; PEARSON, E. R.; ANTCLIFF, J. F.; PROKS, P.; BRUINING, G. J.; SLINGERLAND, A. S.; HOWARD, N.; SRINIVASAN, S.; SILVA, J. M.C.L.; MOLNES, J.; EDGHILL, E.L.; FRAYLING, T. M.; TEMPLE, K.; MACKAY, D.; SHIELD, J. P.H.; SUMNIK, Z.; VAN RHIJN, A.; WALES, J.K.H.; CLARK, P.; GORMAN, S.; AISENBERG, J.; ELLARD, S.; NJØLSTAD, P. R.; ASHCROFT, F.

M.; HATTERSLEY, A. T.. Activating Mutations in the Gene Encoding the ATP-Sensitive Potassium-Channel Subunit Kir6.2 and Permanent Neonatal Diabetes. **N. Engl. J. Med.** 350:1838-1849, 2004.

HENQUIN, J. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. **Diabetes.** 49:1751-60, 2000.

HUSSAIN, K.; COSGROVE, K.E. From congenital hyperinsulinism to diabetes mellitus: the role fo pancreatic β -cell K_{ATP} channels. **Pediatric Diabetes.** 6:103-113, 2005.

LAKEY, J.R.T.; BURRIDGE, P.W; SHAPIRO, A.M.J. Technical aspects of islets preparation and transplantation. **Transplant Int.**, 16: 613-632, 2003.

LANTZ, K.A.; VATAMANIUK, M.Z.; BRESTELLI, J.E.; FRIEDMAN, J.R.; MATSCHINSKY, F.M.; KAESTNER K.H. Foxa2 regulates multiple pathways fo insulin secretion. **The Journal of Clinical Investigation**, 114: 512-520, 2004.

LANTZ, K.A.; KAESTNER, K.H. Winged-helix transcription factors and pancreatic development. **Clinical Science.** 108: 195-204, 2005.

LEE, C.S.; SUND, N.J.; VATAMANIUK, M.Z.; MATSCHINSKY, F.M.; STOFFERS D.A.; KAESTNER, K.H.: Foxa2 controls Pdx1 gene expression in pancreatic beta-cells in vivo. *Diabetes*. 51:2546-2551, 2002.

LEE, H.C.; BONNER-WEIR, S.; WEIR, G.C.; LEAHY, J.L. Compensatory adaptation to partial pancreatectomy in the rat. **Endocrinology**, 124: 1571-1575, 1989.

LEITE, M. Stem Cell research in Brazil: a difficult launch. **Cell**, 124: 1107-09, 2006.

LIPSETT, M.; AIKIN, R.; CASTELLARIN, M.; HANLEY, S.; JAMAL, A.; LAGANIERE, S.; ROSENBERG, L. Islets neogenesis: a potential therapeutic tool in type 1 diabetes. **IJBCB**, 38: 498-503, 2006

LOMBARDO, Y.; CHICCO, A.; MOCCHIUTTI, N.; RODI, M.A.; NUSIMOVICH, B.; GUTMAN, R. Effect of sucrose diet on insulin secretion in vivo and in vitro and on triglyceride storage and mobilization of the heart of rats. **Horm Metab Res** 15:69-76, 1983.

LOUBATIERES, A. Effect of prolonged administration of hypoglycemic Sulfonylurea (chloropropamide) on the sub totally pancreatectomized dog. In: **The Structure and Metabolism of the Pancreatic Islets**, Eds SE Brolin, b Hellman & H Knutson, N York: the Macmillan Company, pp 437-50, 1964.

LUMELSKY, N.; BLONDEL, O; LAENG, P; VELASCO, I; RAVIN, R.; MCKAY, R. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. **Science** 292: 1389-94, 2001.

LUO, J.; QUAN, J.; TSAI, J.; HOBENSACK, C.; SULLIVAN, C.; HECTOR, R.; REAVEN, G. Nongenetic mouse models of a non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Metabolism** 47:663-668, 1998.

MALAISSSE, W.J.; SENER, A.; MAHY, M. The stimulus-secretion coupling of glucose induced insulin release. Sorbitol metabolism in isolated islets. **Eur J Biochem** 47:365-370, 1974.

MATSCHINSKY, F.M. Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. **Diabetes**, 45: 223-241, 1996.

MEARS, D. Regulation of insulin secretion in islets of Langerhans by Ca²⁺ channels. **J Membr Biol** 200:57-66, 2004.

MIKI, T.; NAGASHIMA, K.; SEINO, S. The structure and function of the ATP-sensitive K⁺ channel in insulin-secreting pancreatic β -cells. **Journal of Molecular Endocrinology** 22: 113-23, 1999.

NICHOLS, G.C. K_{ATP} channels as molecular sensors of cellular metabolism. **Nature**. 440: 470-5, 2006.

OHARA-IMAIZUMI, M.; FUJIWARA, T.; NAKAMICHI, Y.; OKAMURA, T.; AKIMOTO, Y.; KAWAI, J.; MATSUSHIMA, S.; KAWAKAMI, H.; WATANABE, T.; AKAGAWA, K.; NAGAMATSU S. Imaging analysis reveals mechanistic differences between first- and second-phase insulin exocytoses. **The Journal of Cell Biology**. 177: 695-705, 2007

PARSONS, J.A. ; BRELJE, T.B. ; SORENSON, R.L. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increases islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. **Endocrinology** 130:1459-66, 1992.

PITTENGER, G.L. ; VRANIK, A.I. ; ROSENBERG, L. The partial isolation and characterization of ilotropin, a novel islet-specific growth factor. **Adv Exp Med Biol** 321:123-30, 1992.

PITTENGER, G.L.; TAYLOR-FISHWICK, D.A.; JOHNS, R.H.; BURCUS, N.; KOSURI, S.; VINIK, A.I. Intramuscular injection of islet neogenesis-associated protein peptide stimulates pancreatic islet neogenesis in healthy dogs. **Pancreas**. 34:103-11, 2007.

RAFAELOFF, R.; SCHIMITT, E.; EDLUND, H.; GOLD, G.; VINIK, A.I. Expression of INGAP during ontogeny of the pancreas. **Diabetes** 47:A259, 1998.

RORSMAN, P. & RENSTRÖM, E. Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. **Diabetologia**. 46: 1029-45, 2003.

ROSENBERG, L.; BROWN, R.A.; DUGUID, W.P. A new model for the development of duct epithelial hyperplasia and the initiation of nesidioblastosis. **J Surg Res** 35:75-8, 1983.

SEGHERS, V.; NAKAZAKI, M.; DEMAYO, F.; AGUILAR-BRYAN, L.; BRYAN J. Sur1 Knockout Mice – A model for K_{atp} channel-independent regulation of insulin secretion. **The Journal of Biological Chemistry** 275: 9270–9277, 2000.

STRAUB, S.G.; SHARP, G.W.G. Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. **Diabetes/ Metabolism Research and Reviews** 18:421-463, 2002.

SUND, N. J. ; VATAMANIUK, M. Z.; CASEY, M.; ANG, S.; MAGNUSON, M. A.; STOFFERS, D. A.; MATSCHINSKY, F. M.; KAESTNER K. H. Tissue-specific deletion of Foxa2 in pancreatic β cells results in hyperinsulinemic hypoglycemia. **Genes & Development** 15:1706–1715, 2001.

TAYLOR-FISHWICK, A.R.; RITTMAN, S.; KENDALL, H.; ROY, L.; SHI, W.; CAO, Y.; PITTENGER, G.L.; VINIK, A.I. Cloning genomic INGAP: a Reg-related family member with distinct transcriptional regulation sites. *Biochem Biophys Acta*. 1638: 83-89, 2003.

TAYLOR-FISHWICK, D.A.; SHI, W.; PITTENGER G. L.; VINIK, A.I. PDX-1 can repress stimulus-induced activation of the INGAP promoter. *Journal of Endocrinology*, 188: 611-21, 2006.

TARASOV, A.; DUSONCHET, J.; ASHCROFT F. Metabolic Regulation of the Pancreatic β -Cell ATP-Sensitive K_{ATP} Channel – A Pas de Deux. *Diabetes*. 53: S113–S122, 2004

VINIK, A.; PITTENGER, G.; RAFAELOFF, R.; ROSENBERG, L; DUGUID W.P. Determinants of pancreatic islets cell mass: a balance between neogenesis and senescence/apoptosis. *Diabetes* 4:235-63, 1996.

WANG, R.N.; KLÖPPEL, G; BOUWENS, L. Duct- to islet-cell differentiation and islet growth in the pancreas of duct-ligated adult rats. *Diabetologia* 38:1405-11, 1995.

WHITE M.F., Insulin signaling in health and disease. *Science*, 302: 1710-1711, 2003.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global Prevalence of Diabetes. **Diabetes Care**, 27:1047 -1053, 2004.

Apêndice I

**INGAP-PP up-regulates the expression of genes and proteins
related to K⁺_{ATP} channel in cultured adult rat islets**

Kelly E. Silva^a, Helena C. Barbosa^a, Luiz F. Stoppiglia^a, Everardo M. Carneiro^a,
Maria I. Borelli^b, Hector DelZotto^b, Juan J. Gagliardino^b, Antonio C. Boschero^{a*}

^a*Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia Universidade Estadual de Campinas, 13083-970, Campinas-SP, Brazil;* ^b*CENEXA. Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (UNLP-CONICET, Centro Colaborador de la OPS/OMS), Facultad de Ciencias Médicas Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.*

Corresponding author. Tel: 55 19 35216202; Fax: 55-19-35216185; E-mail:

boschero@unicamp.br

Keywords: cultured pancreatic islets; Foxa2; insulin secretion; INGAP-PP, K⁺_{ATP} channels; Kir6.2; SUR1

ABSTRACT

Cultured adult rat islets were used to study the effect of INGAP-PP upon: a) gene expression of Kir6.2 and SUR1 of K⁺ATP channels and of their transcription factor Foxa2 (RT-PCR), b) protein levels (Western blotting) of SUR1 and Foxa2, c) static and dynamic insulin secretion elicited by metabolic and non metabolic stimuli and d) ⁸⁶Rb efflux from perfused islets. INGAP-PP increased significantly the expression of Kir6.2, SUR1 and Foxa2 and the protein levels of SUR1 and Foxa2. Islets cultured with INGAP-PP and further incubated for 1 h with 2.8 mM glucose, significantly enhanced the release of insulin in response to 40 mM KCl, and 100 μM tolbutamide. The dose-response curve of insulin secretion to increasing glucose concentrations (2.8 to 22.2 mM) shifted to the left in INGAP-PP-cultured islets with an EC₅₀ of 10.0 ± 0.4 vs. 13.7 ± 1.5 mM glucose of the controls (P < 0,05). In dynamic studies INGAP-PP increased significantly the first-phase of insulin secretion elicited by either 22.2 mM glucose or 100 μM tolbutamide and promotes a higher glucose-induced reduction of ⁸⁶Rb efflux from perfused islets. These results confirm the enhancing effect of INGAP-PP upon insulin release induced by different secretagogues and provide new evidence that such effect is due, at least partly, to an enhanced expression of the SUR1 and Kir6.2 genes of K⁺ATP channels and of the Foxa2 gene that controls their expression. They would also suggest that INGAP-PP could potentially be used to maintain the capacity of cultured islets to release insulin in response to glucose and maybe for the treatment of diabetes.

INTRODUCTION

INGAP (Islet Neogenesis Associated Protein) was identified as the active part of a pancreatic protein complex (Ilotropin) isolated from normal hamsters, whose pancreas heads were previously wrapped in cellophane (1). INGAP gene originates a transcript of 850 bp forming a protein of 19,940 Da (2) and seems to be a member of the Reg family with great homology with Reg III δ , but with different sites of regulation and distribution within islet cells (3, 4).

INGAP is apparently one of the factors that initiates pancreatic β -cell differentiation (5) and presents some characteristics that turn it an interesting tool for the study and induction of islet-cells differentiation. In fact, INGAP is produced only in the pancreas (islets, duct and exocrine cells), is detected at the onset of pancreatic cell differentiation, and possesses promoter regions distinct from those observed for Reg III δ gene that is sometimes expressed in response to inflammatory reactions (3, 5–7).

A pentadecapeptide with the 104-108 aminoacid sequence of INGAP (INGAP-PP) increased ^3H -thymidine incorporation into both pancreatic duct cells and a duct-cell line (1, 2), while its administration to normal hamsters and dogs as well as to diabetic mice enhanced islet neogenesis (8, 9). INGAP-PP injection to streptozotocin-induced diabetic mice produced a simultaneous decrease in blood glucose levels and increased rate of islet neogenesis (9). On the other hand, the increase of β -cell mass observed in hamsters with insulin resistance induced by a sucrose-rich diet (SRD), was accompanied by a concomitant increase in the

number of INGAP-positive cells in the exocrine, endocrine and duct pancreatic subsectors (4). Seven-day old pups from dams treated with SRD during pregnancy showed lower glycemia, higher β -cell mass, increased β -cell replication rate and islet neogenesis together with a decreased rate of β -cell apoptosis. These animals also had duct-, islet- and acinar-cells that co-expressed INGAP/PDX1, which did not react with antibodies against islet hormones and had a high replication rate (10). Since PDX1 is a transcription factor essential for the development of the pancreas and is considered a marker for β -cell precursors in pancreas from adult mammals, the presence of a large number of INGAP/PDX1 positive cells suggests the importance of this cell population as an origin of new insulin-producing cells (10).

We have recently demonstrated that neonatal and adult normal rat islets cultured with INGAP-PP showed an increase in the size of their β -cells and released significantly more insulin in response to glucose and other secretagogues (11, 12). Using macroarray analysis, we also observed that INGAP-PP up-regulated several genes related with islet metabolism, insulin secretion machinery, β -cell mass, and islet neogenesis. Some of these genes were related with the K^+_{ATP} channels that play a crucial role in the mechanism of insulin secretion (12). Otherwise, we have also observed (unpublished data), that addition of INGAP-PP to the culture medium, enhanced tolbutamide-induced insulin secretion in neonatal islets.

Considering the key participation of K^+_{ATP} channels in such a response, we decided to further investigate the possible mechanism by which INGAP-PP affects

insulin secretion in cultured adult rat islets. In the present work, we showed that addition of INGAP-PP to adult rat islets cultured for four days increased the protein expression of components of the K^+_{ATP} channels and their transcription factor Foxa2 (13, 14), and rendered these islets more sensitive to glucose, KCl and tolbutamide stimuli.

MATERIAL AND METHODS

Animals and islets. Islets of adult Wistar rats were isolated by collagenase digestion and cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 5% fetal bovine serum, 11 mM glucose, 100 IU of penicillin/mL, 100 µg of streptomycin/mL at 37°C in a 5% CO₂/air atmosphere for 4 days. At day 0 of culture, we added 10 µg/mL of INGAP-PP to half of the plates, using the remaining ones as control (no INGAP-PP). The medium was renewed every other day. All animal experiments were approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation of the State University of Campinas, SP (CEEA/IB/UNICAMP).

Static insulin secretion. Cultured adult isolated islets were rinsed in Krebs-bicarbonate buffer, pH 7.4, previously gassed with a mixture of CO₂/O₂ (5/95%), and preincubated in 1.0 mL of KREBS-bicarbonate buffer containing 3% (w/v) BSA and 5.6 mM glucose at 37°C for 30 min. After this period, groups of 5 islets were incubated for one hour in 1.0 mL of the same buffer with the addition of increasing concentrations of glucose (2.8 to 22.2 mM), 40 mM KCl, or 100 µM tolbutamide. At the end of the incubation period, aliquots of the medium were collected for insulin determination by radioimmunoassay.

Dynamic insulin secretion and ⁸⁶Rb efflux. Cultured adult islets were perfused in the presence of a 2.8 or 5.6 mM glucose (baseline secretion). A 30-min adaptation period was allowed before the first sample was taken for insulin assay and was followed by a further 15 min control period before changing glucose concentration in or tolbutamide addition to the perfusate. Pancreatic effluents were

collected every min during the first 5 min, immediately before and 10 min after the beginning of the stimuli. Effluents were collected in plastic tubes, immediately frozen and maintained at -20°C for insulin radioimmunoassay measurement.

Cultured adult islets were preincubated for 90 min in Krebs-bicarbonate solution containing $^{86}\text{RbCl}$ (1.0 – 2.0 MBq/mL) and 8.3 mM glucose, washed 3 times, and transferred to the perfusion system. After an adaptation period of 25 min, the effluent medium was collected every 2 min and the ^{86}Rb efflux was expressed as a functional outflow rate (% instantaneous islet content/min). Different concentrations of glucose were introduced in the perfusion medium as show in figure 6.

Glucose oxidation. Groups of 15 cultured islets each were placed in wells containing 100 μL of KREBS-bicarbonate buffer supplemented with trace amounts of D-(U- ^{14}C) glucose (0.1 – 0.2 MBq/mL), plus non-radioactive glucose to a final concentration of 11.1 mM. The wells were maintained in empty 20 mL scintillation vials, which were gassed with 5% O_2 and 95% CO_2 and capped airtight with rubber membranes. The vials were shaken continuously for 2 h at 37°C in a water bath. After incubation, 0.1 mL HCl (0.2 mol/L) and 0.2 mL hyamine hydroxide was injected through the rubber cap into the glass cup containing the incubation medium and into the counting vial, respectively. After 1 h at room temperature, 2 mL of scintillation fluid was added to the hyamine and the radioactivity was counted. The rate of glucose oxidation was expressed as pmol/islet.h.

RT-PCR analysis. Semi-quantitative RT-PCR was done using specific primers to confirm the differential expression of three genes. Reverse transcription was done with 3 μg of total RNA using Moloney murine leukemia virus-reverse transcriptase

(Superscript II) and random hexamers, according to manufacturer's instructions (Invitrogen, USA). RT-PCR assays were done in quadruplicate using recombinant *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, USA) and 10 pmol of each primer in a master mix of 50 μ l. The primers set used in RT-PCR analysis are Kir6.2: sense 5'TTAGCGCCACCATTTCATATG3', antisense 5'TCCGGAAGATGCTAAACTTG3', 31 cycles, 62°C; SUR1: sense 5'TTCCACATCCTGGTCACACCG3', antisense: 5'AGAAGGAGCGAGGACTTGCCAC3', 29 cycles, 62°C; Foxa2: sense: 5'CTGAGTGGAACATTGGGG3', antisense: 5'GATTTGTGGA ACTCTGGCCA3'; 29 cycles, 62°C; RPS29: sense: 5'AGGCAAGATGGGTCACCAGC3', antisense: 5'AGTCGAATCATCCATTCAGGTCG3', 29 cycles, 54°C. The number of cycles for each gene was defined after titration using 20 to 42 cycles and was within the logarithmic phase of amplification. PCR products were separated on 1.5% EtBr-agarose gels and the band intensities were determined by digital scanning (GelDoc 2000, BioRad) followed by quantification using Scion Image analysis software (Scion Corp., Frederick, MD). The results were expressed as a ratio of target to RPS-29 signals. The RNAs used for RT-PCR analysis were obtained from five sets of experiments.

Western blotting. Cultured islets were homogenized in 100 μ l of solubilization buffer (10% Triton-X 100, 100 mM Tris, pH 7.4, 10 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 10 mM sodium vanadate, and 2 mM PMSF) for 30 s using a Polytron PT 1200 C homogenizer (Brinkmann Instruments, NY) and boiled for 5 min. The extracts were then centrifuged at 12,600 g at 4°C for 20 min to remove insoluble material. The protein concentration in the supernatants was assayed using the Bradford dye method and the BioRad reagent. The proteins

were treated with Laemmli sample buffer containing dithiothreitol and boiled for 5 min. Seventy μg of protein from each sample was applied to a 10% polyacrylamide gel and separated by SDS-PAGE in a BioRad miniature slab gel apparatus. The electrotransfer of proteins from the gel to nitrocellulose was done at 120 V for 50 min or 1 h in a BioRad miniature transfer apparatus. Before incubation with the primary antibody, the nitrocellulose filters were treated with a blocking buffer (5% non-fat dried milk, 10 mM Trizma, 150 mM NaCl, and 0.02% Tween 20) for 2 h at 22°C. The membranes were incubated for 4 h at 22°C with antibodies against, Foxa2 (1:500) and SUR1 (1:500) (Santa Cruz, CA, USA), diluted in blocking buffer with 3% non-fat dried milk and then washed for 30 min in blocking buffer without milk. The blots were subsequently incubated with peroxidase-conjugated second antibody for 1 h. Specific protein bands were revealed using commercial enhanced chemiluminescence reagents with exposure to photographic film. The band intensities were quantified by optical densitometry (Scion Image, Frederick, MD).

Statistical analysis. Results are expressed as means \pm SEM. Statistical comparisons between INGAP-treated islets and the respective control groups were done using the Student's unpaired t-test or ANOVA. P values < 0,05 indicated a significant difference.

RESULTS

Effects of INGAP-PP on gene and protein expressions. Figure 1 shows that INGAP-PP increased the transcription of Kir6.2 and SUR1 genes that encode the protein components of the K^+_{ATP} channels in pancreatic islets (2.3- and 1.5-fold increase vs. control, respectively; $P < 0,05$). INGAP-PP also increased the expression of Foxa2 gene that encodes an important transcription factor that controls the expression of SUR1 and Kir6.2 genes (1.5-fold increased vs. control islets; $P < 0,05$).

Western blot analysis also showed a 2.8- and 1.5-fold increase in the protein expression of SUR1 and Foxa2, respectively, in INGAP-PP-treated islets compared with controls (Fig. 2).

Effect of INGAP-PP on insulin secretion. Pancreatic adult islets cultured with INGAP-PP and then incubated for 1 h with increasing concentrations of glucose (2.8-22.2 mM), released significantly more insulin at every glucose concentration tested than those cultured without the pentadecapeptide (Fig. 3). As a consequence INGAP-PP curve was shifted to the left showing an EC_{50} of 10.0 ± 0.4 vs. 13.7 ± 1.5 mM of the control islets ($P < 0,05$). For comparison, Fig. 3 also shown a dose-response curve to glucose obtained with freshly isolated islets. At low and intermediate concentrations of glucose (2.8-8.3 mM), the insulin secretion from freshly isolated and INGAP-PP-treated islets was similar, but, the secretion was significantly greater in fresh than INGAP-PP-treated islets at higher

concentrations of glucose (11.1 – 22.2 mM glucose) ($P < 0,05$). Depolarizing concentrations of KCl also induced a greater insulin response in INGAP-PP-treated islets compared with control (Fig. 4A). At 2.8 mM glucose, INGAP-PP rendered the islets more sensitive to tolbutamide (100 μ M). However, this enhancing effect of INGAP-PP upon tolbutamide-induced insulin secretion was not any longer observed at 22.2 mM glucose (Fig. 4B).

Dynamic secretion studies revealed that in the presence of 2.8 mM glucose (min 30-45), insulin secretion was slightly higher, but not significantly different, in INGAP-PP-treated islets compared with controls. Addition of 22.2 mM glucose to the perfusate (min 46) however, induced a significant increase in the biphasic release of insulin (Fig. 5A) in both groups of islets. At the first phase (min 58), insulin secretion reached a peak of 196 ± 66 and 81 ± 30 pg/islet¹ in INGAP-PP-treated and control islets, respectively ($P < 0,05$). The area under the curve (AUC) (min 55 to 68) was also significantly higher in INGAP-PP-treated compared with control islets (1400 ± 100 vs. 700 ± 60 ng/islets/10 min, respectively; $P < 0,05$).

In the presence of 5.6 mM glucose, tolbutamide (100 μ M) induced a biphasic release of insulin, characterized by a short first phase followed by an also short second phase in control islets. The first phase of the tolbutamide-induced secretion (min 55-60) was significantly greater in INGAP-PP-treated compared with control islets with an integrated secretion of 34 ± 1.0 and 15 ± 0.4 pg/islets/min for INGAP-PP and control islets, respectively ($P < 0,05$). Conversely, the second phase of insulin release (min 61-68) was greater in control than in INGAP-PP-treated islets ($P < 0,05$ (Fig. 5B).

Effect of INGAP-PP on ^{86}Rb efflux. The efflux rate of ^{86}Rb (used as a substitute for K^+) in the absence of glucose (min 26-40), was similar in both groups. Addition of 22.2 mM glucose to the perifusate induced a marked and comparable reduction of ^{86}Rb efflux in both INGAP-PP treated and untreated islets. The effect of glucose was rapidly sustained but rapidly reversed with the withdrawal of the sugar from the perifusate (min 60 onward) (Fig. 6). After the ^{86}Rb effluxes were stabilized (min 48-60), the mean efflux rate was 4.37 ± 0.06 and 5.16 ± 0.06 for INGAP-PP and control islets, respectively ($P < 0,05$). The velocity of reduction in ^{86}Rb efflux rate induced by 22.2 mM glucose (min 40-46), was greater in INGAP-PP-treated than in control islets as shown by the regression line (-13.1 ± 3.7 for INGAP-PP vs. -6.6 ± 0.3 for control islets; $P < 0,05$) (inset Fig. 6).

Effect of INGAP-PP on glucose utilization. Glucose oxidation rate, measured as the $^{14}\text{CO}_2$ production from $\text{U}(^{14}\text{C})\text{D}$ -glucose, was not significantly different in INGAP-PP-treated and control islets (47 ± 2.7 vs. 45 ± 2.8 pmol/islet.h), respectively.

FIGURES

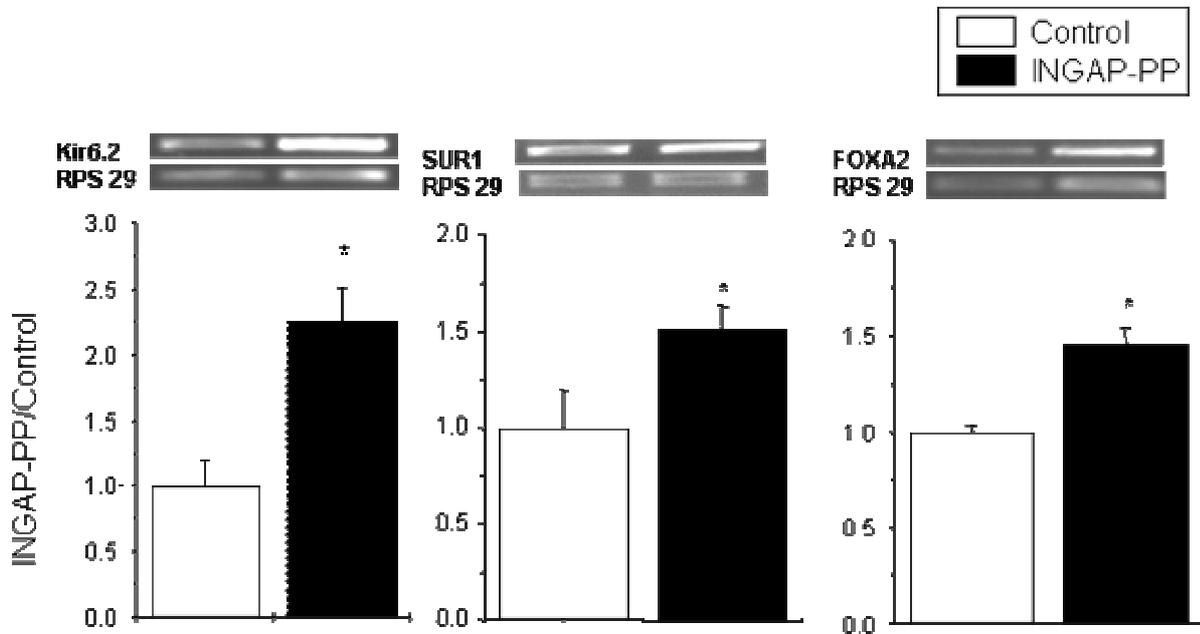


Figure 1. Semiquantitative RT-PCR analysis of Kir6.2, SUR1 and Foxa2 gene expression in adult rat islets cultured for four days with or without 10 µg/ml of INGAP-PP. The bars represent the mean \pm SEM of five experiments done with specific sets of primers (see Methods) and normalized against RPS-29. *P < 0,05 for control vs. INGAP-PP.

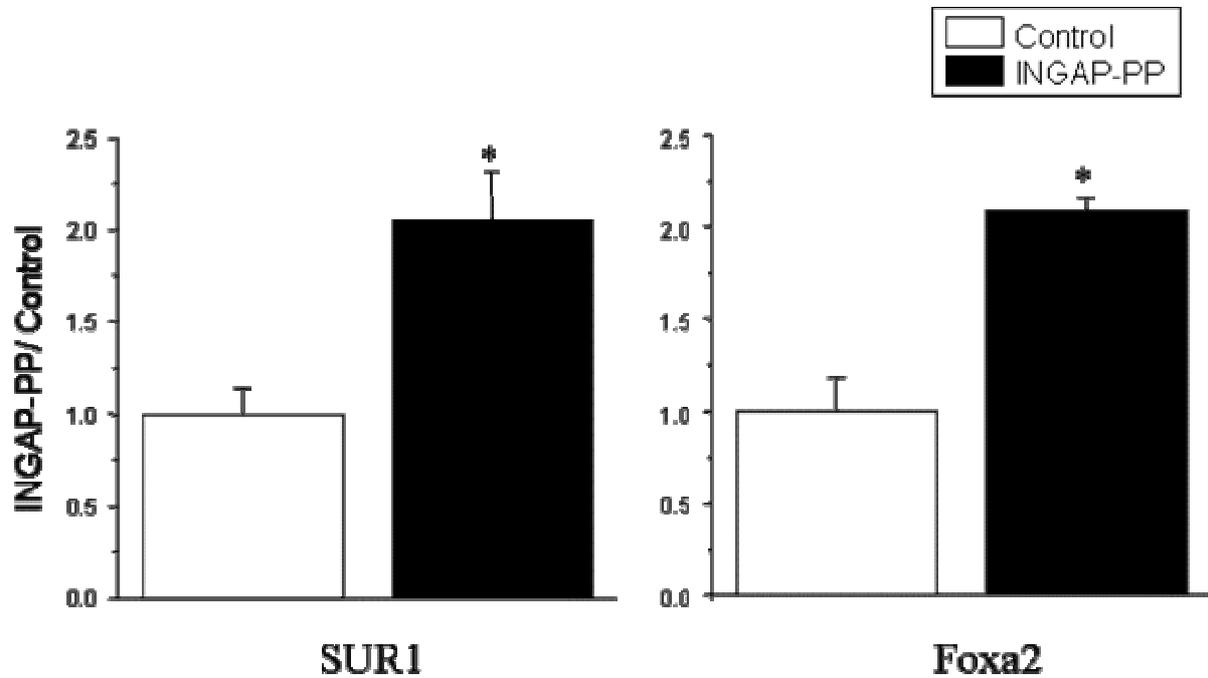


Figure 2. SUR1 and Foxa2 protein expression in adult rat islets cultured for four days in the absence or presence of 10 $\mu\text{g/ml}$ of INGAP-PP. Equal amounts of protein extracts were submitted to SDS-PAGE electrophoresis, transferred to a nitrocellulose membrane and then incubated with specific anti-SUR1 and anti-Foxa2 antibodies. The normalized values represent the mean \pm SEM of three experiments. * $P < 0,05$ for control vs. INGAP-PP-treated islets.

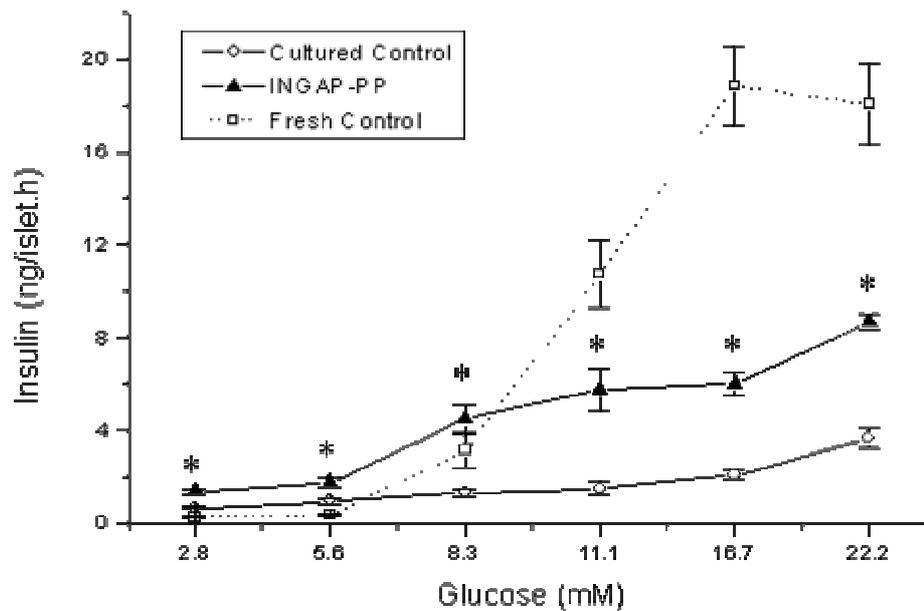


Figure 3. Effects of INGAP-PP-treatment upon insulin secretion. Isolated adult rat islets were cultured for four days with or without 10 $\mu\text{g/ml}$ of INGAP-PP, and then incubated for 1 h with increasing concentrations of glucose (2.8 to 22.2 mM). Values represent the mean \pm SEM of 6 cases from two different experiments. * $P < 0,05$ for control vs. INGAP-PP-treated islets. For comparison, a dose-response curve of insulin secretion to glucose, obtained in fresh isolated islets, was also shown (dashed line).

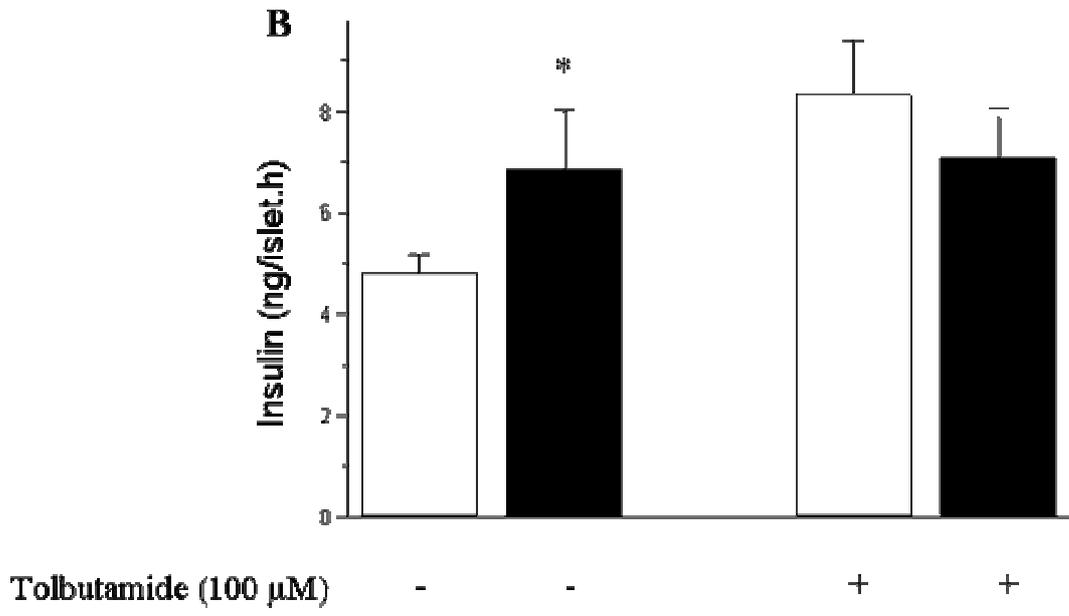
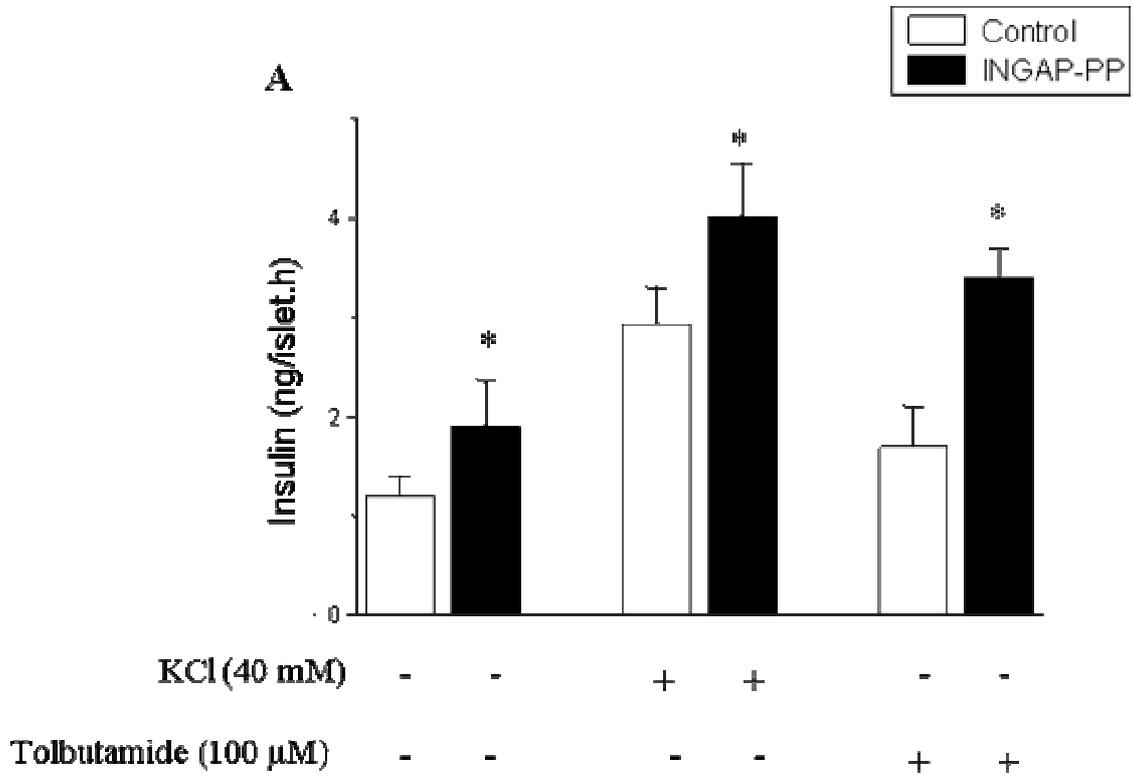


Figure 4. Effects of 40 mM KCl and 100 μ M tolbutamide on insulin secretion from INGAP-PP-treated and control islets. Isolated adult rat islets were cultured for four days with or without 10 μ g/ml of INGAP-PP, and then incubated for 1 h with 2.8 (**A**) or 22.2 mM glucose (**B**). Values represent the mean \pm SEM of 6 cases from two different experiments. *P < 0,05 for control vs. INGAP-PP-treated islets.

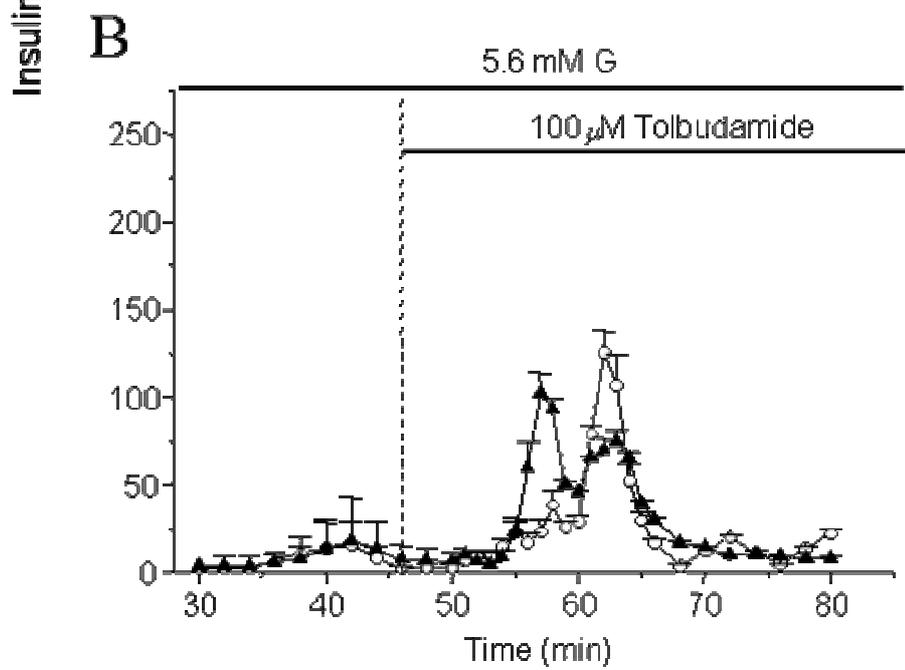
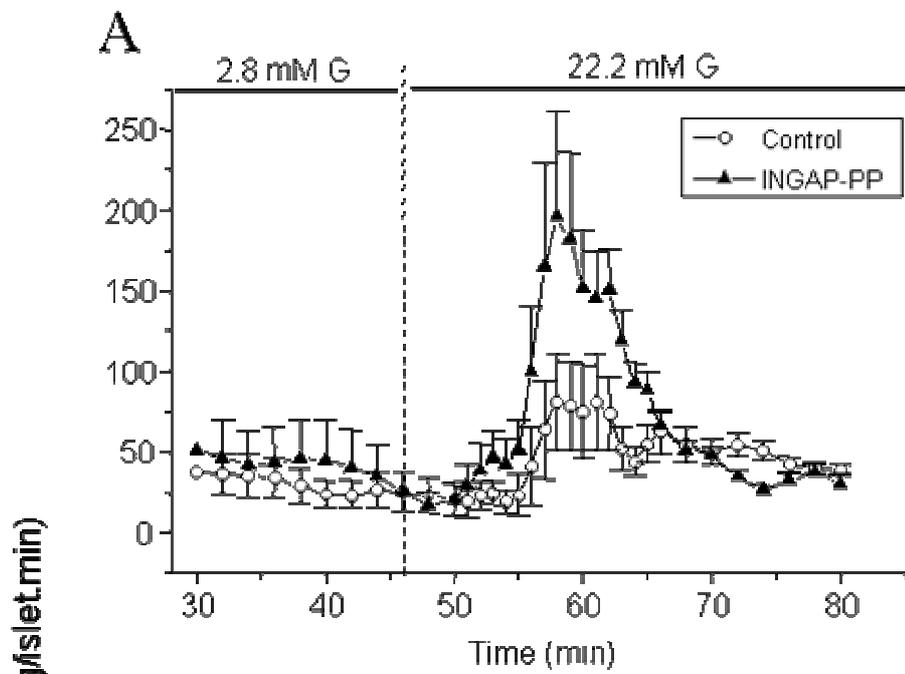


Figure 5. Changes induced by INGAP-PP upon the dynamic pattern of insulin secretion elicited by 22.2 mM glucose and 100 μ M tolbutamide. After 4 days in culture with or without 10 μ g/ml of INGAP-PP, the islets were transferred to a chamber and perfused for 80 min. In **A**, glucose 2.8 mM was present from the onset of the experiment being increased to 22.2 mM between 45-70 min. In **B**, glucose 5.6 mM was present from the onset until the end of the perfusion period and tolbutamide (100 μ M) was introduced at the min 46 remaining in the perfusate until min 80. Batches of 100 islets were perfused in each experiment. Values are the mean \pm SEM of four experiments.

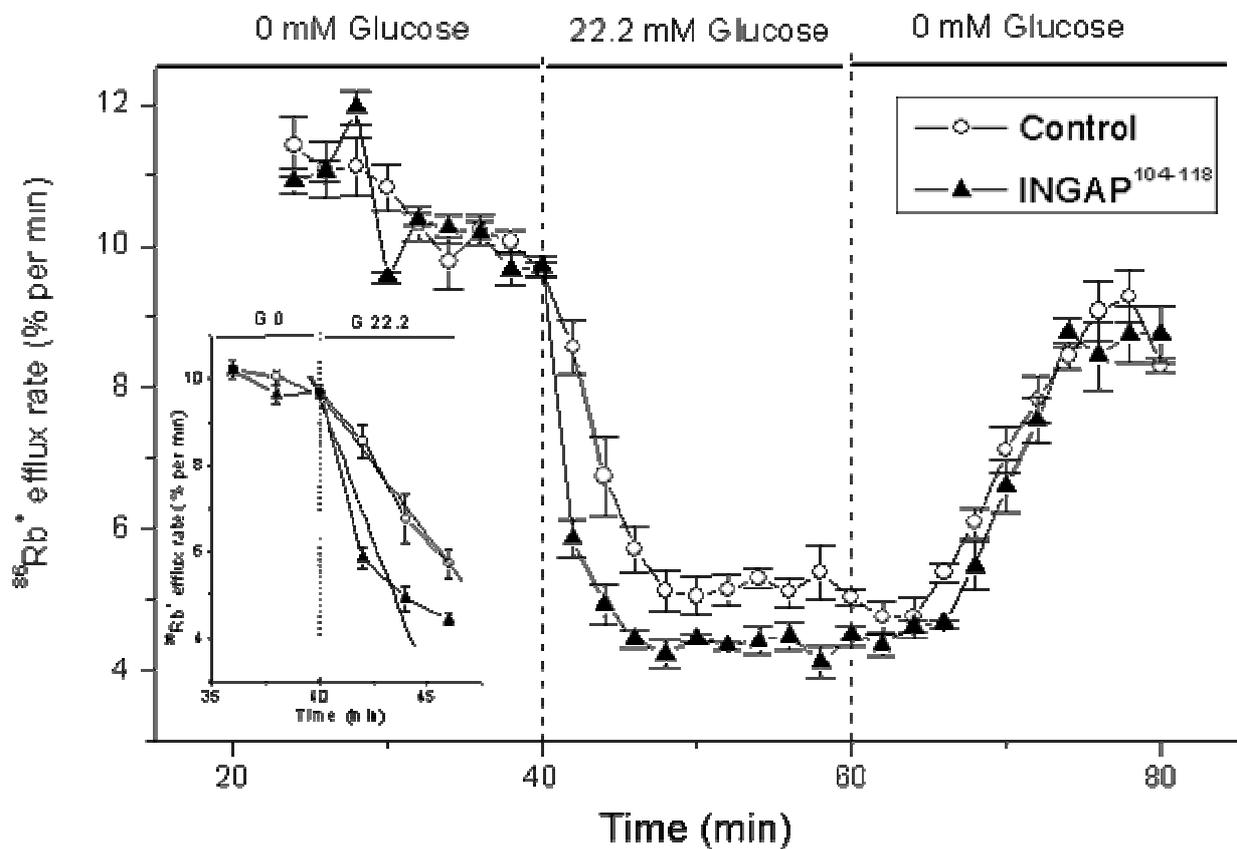


Figure 6. Effect of 22.2 mM glucose on the ^{86}Rb efflux rate from control and INGAP-PP-treated islets. After 4 days in culture with or without 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of INGAP-PP, batches of 100 islets were pre-labeled with $^{86}\text{RbCl}$ (1-2 MBq/ml) in the presence of 16.7 mM glucose, washed 3 times, and transferred to the perfusion chamber. After an adaptation period of 25 min, the effluent medium was continuously collected every 2 min until the end of the perfusion (min 80). Glucose (22.2 mM) was present in the medium from min 40 to 60. Values are the mean \pm SEM of four experiments. The inset of the figure illustrates the slope of the linear regression from each curve (min 40-46).

DISCUSSION

Our current results show that islets isolated from normal adult rats cultured with INGAP-PP and further incubated for one hour release more insulin in response to either metabolic (glucose) or non metabolic (40 mM KCL and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tolbutamide) stimuli than islets cultured without the pentadecapeptide. These data suggest that the enhancing effect of INGAP-PP upon insulin release might result from its action upon a common non metabolic pathway. Since all these stimuli share a common step of β -cell membrane depolarization, opening of voltage dependent Ca^{2+} -channels, increased of cytosolic Ca^{2+} concentration and final release of insulin (15), those paths become a suitable candidate. The lack of INGAP-PP effect upon glucose oxidation rate, the enhanced expression of the two components (SUR1 and Kir6.2) and the changes in ^{86}Rb efflux support such assumption. Thus, we can conclude that at least in our model, INGAP-PP enhances the release of insulin by increasing and rendering $\text{K}^{+}_{\text{ATP}^{-}}$ channels in β -cells more sensitive to different secretagogues.

The enhancing effect of INGAP-PP upon insulin secretion showed some characteristics that merits a further analysis. Freshly isolated islets, incubated for one hour, release more insulin than islets previously cultured with or without INGAP-PP in response to high (≥ 11.1 mM) glucose (Fig. 3, dashed line). Addition of INGAP-PP to the culture medium enhances significantly the release of insulin at every glucose concentration tested and restored insulin response to levels

comparable of those observed in freshly isolated islets when challenged with a concentration of glucose comparable to those normally measured in blood in intact animals (5.6 - 8.3 mM). Thus, this effect might be a useful tool to maintain the glucose-induced insulin response of islets stored in culture for future transplants.

On the other hand, in the presence of low glucose, tolbutamide stimulated the release of insulin in precultured islets, but such release was significantly higher in islets exposed to INGAP-PP (Fig. 4A). However, such enhancing effect of tolbutamide was not longer observed when tested in the presence of 22.2 mM glucose (Fig. 4B). This lack of effect might probably indicate that at 22.2 mM glucose the majority of the K^+_{ATP} channels were already closed in the INGAP-PP⁻ treated but not in the untreated islets.

INGAP-PP also enhanced significantly the glucose-stimulated secretion of insulin in a dynamic model. In islets perfused with 5.6 mM glucose, addition of tolbutamide also induced a biphasic insulin response but of lower magnitude than high glucose. Under these conditions, control islets released a tiny first phase and INGAP-PP treatment increased significantly the size of this phase while lowered the second phase. This effect of INGAP-PP upon first phase insulin secretion is particularly challenging on account that this phase is decreased and blunted in people with impaired glucose tolerance and diabetes, respectively (16). We are thus tempted to speculate that INGAP-PP could be, in such circumstances, an effective alternative to restore normal first phase response. The issue deserves the performance of a more specific experimental design to test the consistence of such hypotheses.

As it occurs with neonatal islets (12), INGAP-PP induced in adult rat islets a simultaneous increased expression of SUR1 and Kir6.2 genes, as well as of Foxa2 that controls the expression of these two proteins. Foxa2 also acts as a transcriptional activator required for the maintenance of Pdx-1 transcription and its deletion down regulates in β -cells Pdx1 mRNA and protein levels (14). On account of all these effects Foxa2 would play an important role in the control of β -cell function and mass (13, 14, 17) and its mutations in human beings might contribute to the development of abnormal glucose homeostasis and diabetes (14). We have previously reported an increase of glucose-induced insulin secretion, of β -cell mass, of β -cell replication rate, of islet neogenesis and a decrease in the rate of β -cell apoptosis with a simultaneous increase in the number of cells located in duct-, islet- and acinar-compartments, that co-express INGAP/PDX1 and had a high replication rate in seven-days old pups from SDR dams (10). These observations would suggest a functional link between INGAP, Foxa2/PDX1, K^+_{ATP} channels expression and β -cell function and mass (17).

In conclusion, the current results confirm our previous report that INGAP-PP enhances the release of insulin in response to different stimuli (11, 12). They also provide new evidence that INGAP-PP exerts such effect, at least in cultured islets, by enhancing the expression of the genes that encode the two components of K^+_{ATP} channels (SUR1 and Kir6.2) and of the gene that controls the expression of these two proteins (Foxa2). These results deserve future studies on account of the potential usefulness of INGAP-PP to maintain in cultured islets their capacity to

release insulin in response to glucose and maybe also for the treatment of diabetes.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Lécio D. Teixeira for the technical assistance and Nicola Conran for editing the English. This work was partially supported by the Brazilian foundations: CAPES, CNPQ, and FAPESP.

REFERENCES

1. Pittenger GL, Vinik AI, Rosenberg L: The apertial isolation and characterization of ilotropin, a novel islet-specific growth factor. *Adv Exp Med Biol* 321:123-130, 1992
2. 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.* 99:2100-2109,1997
3. Taylor-Fishwick AR, Rittman S, Kendall H, Roy L, Shi W, Cao Y, Pittenger GL, Vinik AI: Cloning genomic INGAP: a Reg-related family member with distinct transcriptional regulation sites. *Biochem Biophys Acta.* 1638:83-89, 2003
4. Del Zotto H, Massa L, Rafaeloff R, Pittenger GL, Vranik A, Gold G, Reifel-Miller R, 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* 165:725-733, 2000
5. Vinik A, Pittenger G, Rafaeloff R, Rosenberg L, Duguid WP: Determinants of pancreatic islets cell mass: a balance between neogenesis and senescence/apoptosis. *Diabetes Rev* 4:235-263, 1996

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* 177:243–8, 2003
7. Borelli MI, Del Zotto H, Flores LE, García ME, Boschero AC, Gagliardino JJ: Transcription, expression and tissue binding *in vivo* of INGAP and INGAP-related peptide in normal hamsters. *Regul Pept* 140:192-197, 2007
8. Pittenger GL, Taylor-Fishwick DA, Johns RH, Burcus N, Kosuri S, Vinik AI: Intramuscular injection of islet neogenesis-associated protein peptide stimulates pancreatic islet neogenesis in healthy dogs. *Pancreas* 34:103-111, 2007
9. 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* 240:875–884, 2004
10. Gagliardino JJ, Del Zotto H, Massa L, Flores LE, Borelli MI: Pancreatic duodenal homeobox-1 and islet neogenesis-associated protein: a possible combined marker of activatable pancreatic cell precursors. *J Endocrinol* 177:249-259, 2003
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. *Regul Pept*, 131:97-102, 2005

12. Barbosa H, Bordin S, Stoppiglia L, Silva K, Del Zotto H, Gagliardino J, Boschero A: Islet Neogenesis Associated Protein (INGAP) modulates gene expression in cultured neonatal rat islets. *Regul Pept*, 136:78-84, 2006
13. Lantz KA, Vatamaniuk MZ, Brestelli JE, Friedman JR, Matschinsky FM, Kaestner KH: Foxa2 regulates multiple pathways of insulin secretion. *J Clin Invest*. 114:512-520, 2004
14. Lantz KA, Kaestner KH: Winged-helix transcription factors and pancreatic development. *Clinical Science*. 108: 195-204, 2005
15. Mears D: Regulation of insulin secretion in islets of Langerhans by Ca(2+)channels. *J Membr Biol* 200:57-66, 2004
16. Del Prato S, Marchetti P, Bonadonna RC: Phasic insulin release and metabolic regulation in type 2 diabetes. *Diabetes* 51:S109-S116, 2002.
17. Lee CS, Sund NJ, Vatamaniuk MZ, Matschinsky FM, Stoffers DA, Kaestner KH: Foxa2 controls Pdx1 gene expression in pancreatic beta-cells in vivo. *Diabetes*. 51:2546-2551, 2002



Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

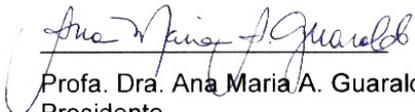
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1128-1, sobre "Mecanismos de ação do INGAP (Islet Neogenesis Associated Protein) sobre a regulação a secreção de insulina em células b de ratos adultos", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero / Kelly Elizeu da Silva, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 29 de novembro de 2006.

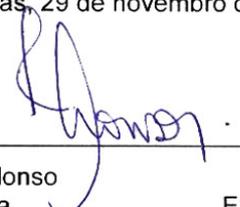
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1128-1, entitled " _____ ", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on November 29, 2006.

Campinas, 29 de novembro de 2006.



Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva