

Editorial

¿Qué sabemos de la función de la proinsulina en la vida embrionaria?

CATALINA HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ Y ALICIA MANSILLA

Grupo de Factores de Crecimiento en el Desarrollo de Vertebrados. Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC). Madrid. España.

La purificación de la insulina en 1921¹ a partir de extractos de páncreas de perro supuso un drástico cambio en la esperanza y la calidad de vida de los enfermos diabéticos. Posteriormente, la insulina se convirtió en proteína modelo de estudios bioquímicos y moleculares debido a su pequeño tamaño, su disponibilidad y su importancia biológica. Así, Fred Sanger² en 1953 publicó por primera vez la secuencia de aminoácidos de una proteína, la insulina. Durante los 80 años desde su descubrimiento se ha avanzado mucho en el conocimiento de su función en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa y en su acción anabólica. Sin embargo, en las últimas décadas nuestro laboratorio y otros han puesto de manifiesto otras funciones biológicas distintas de su acción metabólica, así como la producción de insulina por tejidos no pancreáticos donde presenta una regulación de la expresión génica diferente de la caracterizada en los islotes pancreáticos. ¿Qué procesos biológicos está regulando la proinsulina/insulina durante el desarrollo embrionario? Los procesos son múltiples y variados según el tipo celular y el estado funcional de las células. En el embrión temprano es un factor de supervivencia celular, ya que la inhibición de la expresión del gen de la proinsulina o del receptor de insulina mediante el uso de oligonucleótidos antisentido incrementa la muerte celular programada³. En cultivos de explantes de mesodermo precardiogénico, la insulina promueve la diferenciación final a tejido cardíaco⁴. La insulina se ha utilizado y comúnmente se utiliza en el medio de cultivos de múltiples tipos celulares; en células madre neurales de bulbo olfativo, la insulina estimula la proliferación y la diferenciación de precursores neurales, y coopera con el factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF-2) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) promoviendo la proliferación⁵. Aún más sorprendente ha sido la inesperada función biológica de la proinsulina. El primer indicio de que la proinsulina era fisió-

lógicamente activa se remonta a hace una década. En nuestro laboratorio estábamos estudiando el efecto en proliferación y diferenciación de factores de la familia de la insulina en neurorretinas embrionarias en cultivo, y decidimos utilizar como control proinsulina, el precursor con poca actividad metabólica de la insulina; encontramos que la proinsulina tenía un efecto en neurogénesis similar a la insulina y al IGF-I (factor de crecimiento similar a la insulina tipo I)⁶. Posteriormente vimos que, en embriones de pollo en neurulación, la proinsulina prevenía la muerte celular inducida por el ayuno de factores de crecimiento con una potencia también similar a la de la insulina⁷. Adicionalmente a su acción en supervivencia y crecimiento, la proinsulina induce la expresión de marcadores cardíacos durante la cardiogénesis⁸.

¿Mediante qué receptor está señalizando la proinsulina? El receptor de insulina y el receptor de IGF-I pertenecen a la gran familia de receptores con actividad tirosincinasa; ambos receptores son dímeros formados por la unión covalente de 2 subunidades α y 2 β . Aunque no se ha caracterizado el receptor por el que la proinsulina señala preferentemente, estudios en retinas neurales embrionarias indican que podría tratarse de un receptor híbrido formado por un monómero $\alpha\beta$ del receptor de insulina y otro monómero $\alpha\beta$ del receptor de IGF-I que tendría poca capacidad de discriminación entre los diferentes ligandos de la familia⁹. La unión del ligando al receptor promueve la actividad tirosincinasa, fosforilando varios sustratos clave en la activación de las rutas de señalización. Algunas de las moléculas implicadas en la señalización a partir del receptor, en tejidos con funciones metabólicas, son las mismas que actúan en la acción antiapoptótica de la insulina; por ejemplo, la fosforilación de Akt incrementa en la retina neural en proliferación y embrión de pollo en neurulación después de la adición de insulina (datos nuestros no publicados). Por todo ello, la naturaleza de las vías de activación de proinsulina son de gran interés y merecen estudios específicos.

En individuos adultos, la expresión del gen de la proinsulina en las células beta pancreáticas ha sido considerada un paradigma de expresión génica especí-

Correspondencia: Dra. C. Hernández-Sánchez.
Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC).
Ramiro de Maeztu, 9 E. 28040 Madrid. España.
Correo electrónico: chernandez@cib.csic.es

fica de tejido; sin embargo, estudios de las últimas décadas han mostrado la expresión del gen de la proinsulina en tejidos no pancreáticos. Durante el desarrollo embrionario temprano de varios vertebrados se ha demostrado expresión del gen de proinsulina previa a la formación del primordio pancreático¹⁰. En particular, en el embrión de pollo, el ARNm de la proinsulina se detecta desde etapas embrionarias tempranas como la gastrulación, donde aparece en células discretas localizadas en las 3 capas embrionarias. En estas etapas, la expresión del gen de la proinsulina antecede a la del IGF-I, clásicamente considerado factor de crecimiento. Sin embargo, los ARNm de los receptores de insulina e IGF-I se expresan comparablemente, desde estadios tempranos. Por ello, es la disponibilidad de los ligandos, lo que determina la relevancia fisiológica de la señalización de cada tipo de receptor.

Paralelamente a la caracterización de nuevas funciones, también se han descubierto nuevos mecanismos de control de la expresión del gen de proinsulina. Las células β del páncreas maduras reúnen todos los elementos necesarios para ser auténticas fábricas de insulina; altos grados de transcripción del gen de proinsulina, y mecanismos eficientes de maduración de proinsulina a insulina (por la acción de las endopeptidasas PC2 y PC3 específicas), acumulación de la hormona en gránulos de secreción y regulación de su liberación. La producción de proinsulina por parte del embrión prepancreático difiere sustancialmente de la pancreática; en el embrión, los grados de expresión tanto de ARNm como de proteína son en varios órdenes de magnitud inferiores a los pancreáticos; la proteína permanece sin procesar, como proinsulina, por la falta de al menos una de las convertasas, la PC2⁷. Esta situación ocurre en otros tejidos embrionarios como la retina neural y el hígado que tampoco expresan la PC2, y producen principalmente proinsulina¹¹; el saco de la yema de rata hacia el final de la gestación produce cantidades similares de proinsulina e insulina. Como los embriones tempranos carecen de los típicos gránulos secretorios, probablemente en estos estadios la proinsulina se secreta siguiendo una vía constitutiva. De hecho, en retinas neurales embrionarias cultivadas, se observa una rápida secreción de proinsulina al medio de cultivo; incluso en ausencia de secretagogos, la proinsulina se acumula en el medio de cultivo en pocas horas⁶. Conocer el procesamiento de la proinsulina es esencial en el caso de los experimentos encaminados a conseguir la diferenciación de células madre embrionarias a células endocrinas capaces de secretar insulina con una finalidad terapéutica.

En organismos posnatales, la concentración de glucosa en el plasma es un elemento regulador clave de la síntesis y la secreción de insulina por el páncreas; la glucosa estimula tanto la expresión génica como la síntesis y la secreción de la proteína. En cambio, las cantidades embrionarias de ARNm de proinsulina no

se afectan por la glucosa, sino que están reguladas por la generación de isoformas de ARNm con diferente actividad de traducción. Nosotros hemos encontrado 2 variantes embrionarias (pro1B y pro1B1)^{8,12} del transcrito de la proinsulina diferentes en la región 5' no traducida (UTR, *untranslated region*) pero que comparten su región codificante con la forma pancreática (pro1A), por lo que dan lugar a la misma proteína. La variante embrionaria pro1B se genera por el uso de un sitio de inicio de transcripción alternativo al pancreático. Éste ARNm tiene significativamente reprimida su traducción debido a la presencia de 2 AUG (upAUG) en la región 5' UTR, adicionales al AUG de la proinsulina. La represión de la traducción por upAUG se ha seleccionado fisiológicamente para prevenir la expresión inapropiada de proteínas con funciones críticas. Este parece ser el caso de la proinsulina, ya que la adición de un exceso induce malformaciones embrionarias y dosis elevadas de proinsulina o insulina son teratogénicas para el embrión en organogénesis temprana¹³.

Los trabajos comentados aquí definen nuevas funciones y formas de regulación de la prohormona proinsulina durante el desarrollo embrionario temprano. La proinsulina es sintetizada por el embrión temprano antes de la diferenciación del páncreas, permanece no procesada, como proinsulina, y estimula la cardiogénesis a la vez que previene de la muerte celular programada durante la fase crítica de la neurulación, con un gran impacto en el desarrollo embrionario. A pesar del mejor control metabólico de gran parte de las pacientes diabéticas, la prevalencia de defectos congénitos en hijos de madres diabéticas es aún mayor que en la población no diabética. Estudios en modelos animales han demostrado que altas concentraciones de glucosa inducen muerte celular programada en el embrión, y esta desregulación está implicada en la génesis de la embriopatía diabética, hecho que no sorprende, dado el papel esencial de la muerte celular programada en el desarrollo embrionario¹⁴. Sin embargo, estudios recientes indican que, aunque la hiperglucemia materna es un factor etiológico importante, no es el único. El grupo de la Dra. Corcoy (Hospital de la Santa Creu i Sant Pau)¹⁵ ha encontrado mayor correlación entre las malformaciones congénitas en hijos de madres diabéticas y el índice de masa corporal que con los valores de glucosa en sangre materna. Incluso, en la población general, la obesidad y la hiperinsulinemia podrían ser factores de predicción del riesgo de defectos en el tubo neural. A la luz de los estudios comentados aquí proponemos la inclusión de la desregulación en la expresión y la acción de la proinsulina entre los factores que participan en las anomalías presentadas por los hijos de madres diabéticas, y por ello consideramos importante continuar explorando el sorprendente papel de la proinsulina en el desarrollo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Banting FG, Best CH. The internal secretion of the pancreas. *J Lab Clin Med.* 1922;7:256-71.
2. Sanger F. Chemistry of insulin; determination of the structure of insulin opens the way to greater understanding of life processes. *Science.* 1959;129:1340-4.
3. Morales AV, Serna J, Alarcon C, de la Rosa EJ, de Pablo F. Role of prepancreatic (pro)insulin and the insulin receptor in prevention of embryonic apoptosis. *Endocrinology.* 1997;138:3967-75.
4. Antin PB, Yatskievych T, Dominguez JL, et al. Regulation of avian precardiac mesoderm development by insulin and insulin-like growth factors. *J Cell Physiol.* 1996;168:42-50.
5. Vicario-Abejon C, Yusta-Boyo MJ, Fernandez-Moreno C, de Pablo F. Locally born olfactory bulb stem cells proliferate in response to insulin-related factors and require endogenous insulin-like growth factor-I for differentiation into neurons and glia. *J Neurosci.* 2003;23:895-906.
6. Hernandez-Sanchez C, Lopez-Carranza A, Alarcon C, de la Rosa EJ, de Pablo F. Autocrine/paracrine role of insulin-related growth factors in neurogenesis: local expression and effects on cell proliferation and differentiation in retina. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:9834-8.
7. Hernandez-Sanchez C, Rubio E, Serna J, de la Rosa EJ, de Pablo F. Unprocessed proinsulin promotes cell survival during neurulation in the chick embryo. *Diabetes.* 2002;51:770-7.
8. Mansilla A, Lopez-Sanchez C, de la Rosa EJ, Garcia-Martinez V, Martinez-Salas E, de Pablo F, et al. Developmental regulation of a proinsulin messenger RNA generated by intron retention. *EMBO Rep.* 2005;6:1182-7.
9. Garcia-de Lacoba M, Alarcon C, de la Rosa EJ, de Pablo F, et al. Insulin/insulin-like growth factor-I hybrid receptors with high affinity for insulin are developmentally regulated during neurogenesis. *Endocrinology.* 1999;140:233-43.
10. Hernandez-Sanchez C, Bartulos O, De Pablo F. Proinsulin: much more than a hormone precursor in development. *Rev Endocr Metab Disord.* 2005;6:211-6.
11. Alarcon C, Serna J, Perez-Villamil B, Pollerberg GE, Martinez-Salas E, de Pablo F, et al. Synthesis and differentially regulated processing of proinsulin in developing chick pancreas, liver and neuroretina. *FEBS Lett.* 1998;436:361-6.
12. Hernandez-Sanchez C, Mansilla A, De la Rosa EJ, et al. Upstream AUGs in embryonic proinsulin mRNA control its low translation level. *EMBO J.* 2003;22:5582-92.
13. De Pablo F, Hernandez E, Colia F, Gomez JA. Untoward effects of pharmacological doses of insulin in early chick embryos: through which receptor are they mediated? *Diabetologia.* 1985;28:308-13.
14. Loeken MR. Current perspectives on the causes of neural tube defects resulting from diabetic pregnancy. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2005;135:77-87.
15. Garcia-Patterson A, Erdozain L, Ginovart G, Adelantado JM, Cubero JM, Gallo G, et al. In human gestational diabetes mellitus congenital malformations are related to pre-pregnancy body mass index and to severity of diabetes. *Diabetologia.* 2004;47:509-14.