



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



EFFECTO *IN VITRO* DE LA TEMPERATURA SOBRE LA  
SECRECIÓN DE INSULINA EN ISLOTES DE LANGERHANS  
DE RATAS SPRAGUE-DAWLEY

**MARCELO JAVIER LÓPEZ ARANCIBIA**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Ciencias Biológicas  
Animales.

**PROFESOR GUIA: ILLANI JEANNE ATWATER**

SANTIAGO – CHILE  
2008



# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



## EFFECTO *IN VITRO* DE LA TEMPERATURA SOBRE LA SECRECIÓN DE INSULINA EN ISLOTES DE LANGERHANS DE RATAS SPRAGUE-DAWLEY

### MARCELO JAVIER LÓPEZ ARANCIBIA

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Ciencias Biológicas  
Animales.

NOTA FINAL: .....

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : ILLANI AT WATER	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: BESSIE URQUIETA	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: GUSTAVO FARIAS	.....	.....

SANTIAGO – CHILE  
2008

## **AGRADECIMIENTOS.**

En primer lugar quiero agradecer al laboratorio de Endocrinología y Cirugía Experimental de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile por permitirme realizar mi memoria de pregrado. Deseo agradecer especialmente a mi profesora guía, Illani Atwater, por el apoyo y confianza que me otorgó durante la realización de mi investigación.

También deseo agradecer al personal del Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Así también deseo nombrar y agradecer a todas las personas que me ayudaron de una u otra forma a realizar y llevar a cabo este trabajo durante sus distintas etapas, por brindarme su amistad y talento. A Pedro Martínez, Paola Llanos, David Mears, Cristian Arriagada, Daniela Parrau, Juan Carlos Soto Campos, Juan Carlos Soto Zúñiga, Gloria Meneses Arancibia, Bernardita Silva, Rodrigo Valenzuela y Edgard Bonnet. Finalmente deseo dar especialmente las gracias a mi esposa Gemmy, mi hijo Nicolás, mi madre y Raúl Álvarez, por todo su apoyo y confianza en todo momento.

*Dedico esta memoria de título a mi madre, mi esposa y mi hijo.*

## INDICE.

INDICE	i
RESUMEN	ii
SUMMARY	iv
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS	15
MATERIALES Y MÉTODOS	16
RESULTADOS	21
a. Secreción de insulina en islotes de Langerhans incubados a 37°C, 30°C, 23°C, 17°C, 10°C y 3°C en un descenso progresivo de la temperatura.	21
b. Secreción de insulina en islotes de Langerhans sometidos a perfusión con solución fisiológica a distintas temperaturas y concentraciones de glucosa.	22
DISCUSIÓN	24
CONCLUSIÓN	30
BIBLIOGRAFÍA	31
ANEXOS	37

## RESUMEN.

La Diabetes es una de las enfermedades crónicas de mayor incidencia y prevalencia en las sociedades occidentales. Su tratamiento mediante la administración de insulina exógena presenta diversas dificultades como la imposibilidad de regular correctamente la glicemia. Por esto, la búsqueda de nuevos tratamientos y específicamente la búsqueda de una cura definitiva como el trasplante de islotes de Langerhans es de suma importancia. El trasplante de islotes pancreáticos mejora día a día sus resultados clínicos gracias a numerosos adelantos en el proceso desarrollados en los últimos años.

Varios estudios han sugerido que la temperatura influye, condiciona y modula la secreción de insulina, en algunos casos inhibiéndola y en otros estimulándola. A pesar de estos antecedentes, aún no existen reportes de cómo el enfriamiento influye en la secreción de insulina en concentraciones basales de glucosa.

Como una forma de analizar el efecto *in vitro* de la temperatura sobre la secreción de insulina de los islotes de Langerhans, en el presente trabajo de memoria de título procedimos a incubar a diferentes temperaturas, islotes de Langerhans de ratas Sprague-Dawley en medio de cultivo con concentraciones basales de glucosa, para posteriormente medir la insulina secretada a cada una de las temperaturas.

Los datos de secreción de insulina obtenidos, son valores normales para una concentración basal de glucosa. Las temperaturas a las que fueron sometidos a incubación los islotes de Langerhans en un primer experimento fueron de 37°C, 30°C, 23°C, 16°C, 10°C y 3°C. Este descenso progresivo de la temperatura se realizó con intervalos de una hora. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las distintas concentraciones de insulina secretada entre los grupos incubados en el rango de 37°C a 16°C. Sin embargo, se demostró que eran estadísticamente distintas las secreciones de insulina de los grupos incubados a 10°C y 3°C, al compararlas con el grupo incubado a 37°C. Además, en una segunda experiencia se demostró que el frío actúa como estímulo para la secreción de insulina en concentraciones basales de glucosa.

Se concluyó que el frío induce la secreción de insulina en condiciones basales de glucosa; la necesidad de que se realicen nuevos experimentos conducentes a dilucidar el real efecto y mecanismo por el cual el enfriamiento induce esta secreción. Finalmente surge la sugerencia de estandarizar las técnicas de trabajo para el aislamiento de islotes de Langerhans, sobre todo en el proceso de digestión pancreática.

## SUMMARY.

Diabetes is one of the chronic diseases with the highest impact and prevail in western societies. Its treatment through the administration of exogenous insulin presents several difficulties such as the inability to regulate the glycemia appropriately. Therefore, the search for new treatments and specifically the search for a definitive cure such as islets of Langerhans transplant are extremely important. Also, the pancreatic islets transplant daily improves their clinical results thanks to several improvements in the process itself, which have been developed in the last years.

Several studies have suggested that temperature influences, determines and modulates insulin secretion. In some temperatures, this can be inhibited or stimulated. In spite of these antecedents, there are no reports of how the cooling procedure influences in insulin secretion on glucose basal concentrations.

As a way to analyze the effect of temperature on insulin secretion of the islets of Langerhans *in vitro*, in the present thesis work we proceeded to incubate some islets of Langerhans of Sprague-Dawley rats to different temperatures with basal levels of glucose to measure the produced insulin to each temperature.

The obtained information about insulin secretion represented normal values for a glucose basal concentration. In the first experiment, islets of Langerhans were submitted to incubation temperatures such as 37°C, 30°C, 23°C, 16°C, 10°C and 3°C respectively and no significant differences were statistically found on the different concentrations of secreted insulin among the incubated groups in the

range from 37°C to 16°C, but it was already demonstrated that insulin secretions were statistically different in the groups incubated at 3°C and 10°C with the group incubated to 37°C. Besides, in a second experience, it was demonstrated that cold temperature acts as a stimulus for the insulin secretions in glucose basal concentrations.

Finally, it was concluded that cold temperature induces the secretion of insulin in glucose basal conditions. The need to carry out new experiments aimed to elucidate the real effect and the mechanism with which cooling procedure is inducing this secretion; and the suggestion to level the work techniques for the isolation of islets of Langerhans, especially in the process of pancreatic digestion.

## **INTRODUCCIÓN.**

La **Diabetes Mellitus** (DM), es una enfermedad metabólica crónica caracterizada por un déficit absoluto o relativo de insulina, resultando en una hiperglicemia en los pacientes que presentan esta enfermedad. Se ha considerado que es una enfermedad multifactorial en donde intervienen factores genéticos, inmunológicos y adquiridos. La hiperglicemia crónica condiciona, a largo plazo, el desarrollo de nefropatía, retinopatía, neuropatía periférica, micro y macroangiopatía y complicaciones cardiovasculares, lo que determina una alta morbilidad y mortalidad de los pacientes diabéticos respecto a la población general.

La DM constituye hoy en día una verdadera epidemia. Las cifras muestran que actualmente existen 230 millones de personas con diabetes en el mundo (casi un 6% de la población mundial) y que esta cifra podría alcanzar los 350 millones en el año 2025.

En Chile, la DM corresponde a la octava causa de muerte, con una tasa creciente que el año 1998 alcanzó 24 casos por cada 100.000 habitantes.

Los pacientes diabéticos fallecen principalmente de enfermedades cardiovasculares como infarto al miocardio, accidentes vasculares cerebrales, coma cetoacidótico, infecciones e insuficiencia renal.

Hoy en día se establece una clasificación de DM que incluye tres categorías de pacientes y dos grupos de individuos que tienen glicemias anormales que condicionan un alto riesgo de desarrollar diabetes: 1) DM tipo I, caracterizada por

una destrucción de las células beta pancreáticas, deficiencia absoluta de insulina, tendencia a la cetoacidosis y necesidad de tratamiento con insulina exógena para vivir; 2) DM tipo II, determinada por insulinoresistencia y deficiencia (no absoluta) de insulina; y 3) Diabetes gestacional, caracterizada por una alteración de la regulación de la glucosa que aparece en el curso del embarazo; e intolerancia a la glucosa y anormalidad de la glicemia en ayunas.

Desde 1921, año en que se descubrió la insulina, la DM tipo I dejó de ser una enfermedad inevitablemente mortal, gracias a la administración exógena de ésta. Lamentablemente, esto no se trata de una terapia curativa, entendiéndose como aquélla que restituye en el paciente la capacidad endógena de producir insulina de manera regulada y de ese modo, normalizar sus concentraciones sanguíneas de glucosa. Este sería el principal objetivo del tratamiento de pacientes con DM tipo I.

El trasplante de islotes de Langerhans podría ser una forma segura y relativamente sencilla de restaurar la producción endógena de insulina, ya que requiere de una técnica más fácil, menos invasiva, y por lo tanto, es menos restringida que el trasplante del órgano completo, pudiendo llegar a un número mayor de pacientes. En este proceso, la etapa de aislamiento de los islotes es la más crítica, ya que el páncreas está expuesto a condiciones no fisiológicas, como altas concentraciones de potasio, temperaturas que bordean los 3°C y condiciones isquémicas, lo que tiene efecto negativo en la viabilidad celular. Resultados discretos en trasplante de islotes debidos seguramente a las condiciones de temperatura en que se preservan los órganos antes del implante han motivado

este trabajo de investigación. La poca funcionalidad y viabilidad de los islotes después de los procesos de extracción del páncreas, aislamiento y cultivo de islotes puede deberse al shock térmico al que éstos son expuestos al momento de someterlos a bajas temperaturas para su preservación. Se cree que esto estaría induciendo una gran secreción de insulina, degranulación de los islotes y pérdida de funcionalidad y viabilidad.

Otro de los aspectos interesantes del proceso de secreción de insulina es el relacionado a la transducción de señales y los segundos mensajeros que participan en el proceso de exocitosis de los gránulos de insulina, es por eso que en este estudio se investigó el efecto de la temperatura sobre la secreción de insulina en condiciones basales de glucosa, comparando condiciones fisiológicas con las condiciones usadas en los procedimientos de aislamiento de islotes.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

### 1. Conceptos generales.

El páncreas está compuesto por dos tipos principales de tejidos: 1) páncreas exocrino, que está compuesto por los acinos pancreáticos, cuya función es secretar jugos digestivos al duodeno y 2) el páncreas endocrino, que está compuesto por los islotes de Langerhans, cuya función es secretar ciertos tipos de hormonas a la sangre. El volumen de los islotes de Langerhans comprende el 1 a 2% del tejido pancreático (Haro-Hernández y Méndez, 2001; Srinivasan *et al.*, 2007). Estos contienen tres tipos principales de células,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ , y un cuarto tipo, PP, que se distinguen entre sí por sus características morfológicas y tintoriales. Las células  $\beta$ , que constituyen aproximadamente el 60% de todas las células pancreáticas, están situadas principalmente en el centro de cada islote y secretan insulina; las células  $\alpha$ , que constituyen aproximadamente el 25% del total y secretan glucagón; las células  $\delta$ , que corresponden alrededor de un 10% del total, secretan somatostatina; y las células PP, que comprenden una escasa cantidad, y secretan una hormona denominada polipéptido pancreático (Guyton y Hall, 1996).

La insulina es una hormona polipeptídica sintetizada exclusivamente por las células  $\beta$  pancreáticas y cumple la función de regular de manera muy precisa la concentración plasmática de glucosa, actuando principalmente sobre hepatocitos, adipocitos y células del músculo estriado, para favorecer la captación de glucosa.

Además, posee una actividad anabólica, favoreciendo la síntesis de glucógeno, lípidos y proteínas (Haro-Hernández y Méndez, 2001).

## **2. Diabetes Mellitus.**

La Diabetes Mellitus es un trastorno metabólico de etiología múltiple, caracterizado por hiperglicemia crónica debido a alteraciones del metabolismo de los hidratos de carbono, grasas y proteínas, a consecuencia de defectos en la secreción de insulina, acción de la hormona o de ambos (García de los Ríos, 2003). Entre las causas de esta enfermedad se encuentran una reacción autoinmune, factores genéticos (herencia poligénica) y factores ambientales (Geneser, 2003)

La Diabetes Mellitus se clasifica según su etiología en:

- Diabetes Tipo I: producida por una destrucción de las células  $\beta$  por una causa autoinmune o desconocida (Nielsen *et al.*, 1999; García de los Ríos, 2003). Este tipo de diabetes afecta principalmente a individuos menores de 20 años de edad (Gartner y Hiatt, 2002).
- Diabetes Tipo II: producida por un déficit relativo de la producción de insulina y una deficiente utilización periférica de la glucosa por los tejidos, fenómeno conocido como resistencia a la insulina (Nielsen *et al.*, 1999; García de los Ríos, 2003).

- Diabetes gestacional: producida sólo en gestación, aparece en un 2 a 5 % de las gestaciones y desaparece después del parto (García de los Ríos, 2003).
- Intolerancia a la glucosa y glicemia en ayunas alterada (García de los Ríos, 2003).
- Individuos que tienen glicemias anormales que condicionan un alto riesgo de desarrollar diabetes (García de los Ríos, 2003).

La Diabetes Mellitus es una enfermedad que se estima afecta al menos a 9 millones de individuos en América del Sur (Barceló *et al.*, 2003) y 135 millones de personas en el mundo, equivalente a más del 5% de la población adulta (Kendall *et al.*, 2001). Esta enfermedad posee una significativa morbilidad y temprana mortalidad, por ser una enfermedad crónica y hasta la fecha incurable. En Chile, los costos directos e indirectos relacionados con la enfermedad alcanzan los US\$294 millones incluyendo desde medicamentos, hospitalizaciones, consultas médicas, tratamiento de complicaciones, hasta ingresos no percibidos como consecuencia de mortalidad prematura y a la discapacidad atribuidas a la Diabetes Mellitus (Barceló *et al.*, 2003).

La Diabetes tipo I se caracteriza por la destrucción autoinmune de las células secretoras de insulina (células  $\beta$ ) en los islotes de Langerhans (Feldman, 2003). Dado que la función principal de la insulina es la regulación de la concentración plasmática de glucosa, una disminución en su producción

desencadena estados crónicos de hiperglicemia que generan estrés oxidativo sobre las células y, posiblemente, daño en diversos tejidos (Kaneto *et al.*, 1999).

### **3. Terapias para la cura de la diabetes.**

La cura de la diabetes ha sido un sueño esquivo para los investigadores. Los grandes avances en la investigación de la diabetes han sido en el tratamiento de ésta y muy poco en su cura. Pero un gran objetivo es buscar la cura no sólo para el 10% de pacientes que padecen diabetes tipo I, sino que también para el 90% de pacientes que presentan diabetes tipo II, con una condición metabólica muy diferente.

La administración parenteral de insulina ha sido la terapia empleada por más de siete décadas para el tratamiento de la DM tipo I. Sin embargo, debido a que la ciencia médica no ha podido imitar la forma tan precisa en que el páncreas secreta insulina, comunmente se presentan alteraciones a largo plazo que dañan a otros órganos, lo que ha propiciado la búsqueda de nuevas opciones de tratamiento (Haro-Hernández y Méndez, 2001).

Por ahora, para pacientes crónicos, el trasplante de páncreas completo, así como el de islotes de Langerhans se presentan como las mejores alternativas para el tratamiento definitivo de esta enfermedad.

#### **3.1 Transplante pancreático.**

Aunque el trasplante de páncreas puede restablecer la homeostasis de la glucosa, persisten profundas controversias que deben ser resueltas para que éste

sea aceptado como una técnica de rutina. Los riesgos del procedimiento quirúrgico, la pérdida del injerto, la cistitis química, la infección urinaria, la calidad de vida bajo la terapia de inmunosupresión que exige la toma diaria y el control estricto de ciclosporinas, lo que se estaría cambiando una enfermedad, “la diabetes” por otra, “la inmunosupresión” (Ruso, 1999). Todo esto hace que este procedimiento no constituya la mejor alternativa de tratamiento (Adamec, 2003).

El trasplante pancreático, en la práctica, se realiza como un trasplante combinado junto a riñón y por esto, es practicado principalmente en pacientes con enfermedad avanzada y que presentan patologías renales. Este trasplante combinado, generalmente ofrece tasas reducidas de rechazo inmune en comparación con el trasplante exclusivo de páncreas, aunque los regímenes de drogas antirrechazo mejoradas han disminuido las tasas de rechazo en ambos tratamientos. Ha habido una mejora significativa en la supervivencia del transplantado en los últimos años (Sutherland *et al.*, 2001). Esto se ha debido principalmente al desarrollo de inmunosupresores más selectivos que la combinación de azatioprina, prednisolona y ciclosporina, como micofenolato, tacrolimo, sirolimo y anticuerpos monoclonales para receptor de interleuquina-2 (IL-2) (Ciancio *et al.*, 2001). Aunque la cirugía ha probado ser exitosa, existe sólo un pequeño grupo de donantes disponibles, limitando así su uso en grandes poblaciones. Además, los pacientes transplantados deben tratarse con terapia inmunosupresiva de por vida, con los riesgos conocidos de malignidad a largo plazo (Aaron *et al.*, 2004).

### **3.2 Transplante de Islotes de Langerhans.**

Actualmente existe una gran tendencia a la investigación del transplante de islotes de Langerhans para la cura del gran número de pacientes con diabetes. Los esfuerzos iniciales para resolver este problema estaban dirigidos al aislamiento de Islotes de Langerhans y su ubicación en microcápsulas semiporosas (Suzuki *et al.*, 1998). El objetivo es permitir la secreción de insulina y el ingreso a la célula de su secretagogo primario, la glucosa, pero al mismo tiempo prevenir su infiltración y destrucción por parte del sistema inmune.

El transplante de islotes, frente al transplante de páncreas, tiene ventajas como ser una técnica mínimamente invasiva (Kendall *et al.*, 2001; Kandaswamy y Sutherland, 2006; Balibrea del Castillo *et al.*, 2007), con escasísima morbilidad y prácticamente nula mortalidad y con un costo económico previsiblemente menor (Balibrea del Castillo *et al.*, 2007), constituyendo un promisorio y razonable método alternativo para restaurar la normoglicemia y aliviar las complicaciones a largo plazo de la diabetes (Kendall *et al.*, 2001; Papas *et al.*, 2001). En este procedimiento, los islotes son extraídos del páncreas del donante y embolizados directamente al hígado por la vena porta. A pesar de que hoy en día los resultados del transplante de islotes son cada vez más esperanzadores, para que esta técnica sea utilizada masivamente, deberá superar algunos problemas (Rosenberger *et al.*, 1999; Balibrea del Castillo *et al.*, 2007). Una de las principales dificultades de esta técnica es que durante este proceso muchos islotes resultan dañados, ya sea por el proceso de digestión del páncreas exocrino, como por el procedimiento de embolización de los islotes a la vena porta, produciendo una

pérdida de islotes de un 30% en el mejor de los casos. Por esta razón, se requiere obtener islotes de 2 a 5 donantes para revertir la diabetes de un receptor. Además, en muchos pacientes se requiere hacer un segundo trasplante (Kendall *et al.*, 2001; Ryan *et al.*, 2005; Balibrea del Castillo *et al.*, 2007). Esto hace que este procedimiento hoy en día sea más costoso (Srinivasan *et al.*, 2007). Independientemente a la pérdida de islotes durante el período de aislamiento, hoy se sabe que la mayoría de las pérdidas de islotes se producen después de hacer el implante (Balibrea del Castillo *et al.*, 2007).

Resulta evidente pensar que si se encontrara la forma de estimular la proliferación de las células  $\beta$ , de manera que se lograra la recuperación de la masa celular inicial a partir de una población disminuida en el paciente transplantado o al menos, hacer posible la recuperación parcial de la función pancreática en el paciente con diabetes, su tratamiento sería más prometedor, puesto que se evitarían complicaciones a largo plazo que la administración de insulina exógena no es capaz de prevenir (Haro-Hernández *et al.*, 2002).

#### **4. Anatomía e implantación de los islotes de Langerhans después de su trasplante.**

Los islotes pancreáticos poseen una angioarquitectura densa, similar a un glomérulo, la cual asegura una óptima entrega de oxígeno y nutrientes a las células, proporciona señales desde otras células en el cuerpo y distribuye las hormonas secretadas. El trasplante de islotes implica la interrupción de sus conexiones vasculares. El implante del islote por lo tanto depende de células

endoteliales y microvasos originados desde el órgano de implantación, para el desarrollo de un nuevo sistema vascular. El restablecimiento del flujo sanguíneo ocurre dentro de los 7-14 días después del trasplante, principalmente a través de neovascularización. Los vasos sanguíneos recientemente formados adquieren las mismas características morfológicas de aquéllos presentes en los islotes endógenos. En islotes transplantados al hígado vía intraportal, los islotes se revascularizan casi exclusivamente de arterias tributarias de la hepática. La contaminación exocrina de los islotes transplantados podría obstaculizar el proceso de revascularización, mientras que ni la criopreservación ni drogas inmunosupresoras como la ciclosporina y prednisolona tienen algún efecto esencial sobre la angiogénesis.

Algunos investigadores han observado mejoras en la supervivencia y funcionalidad del islote implantado, mediante su exposición al factor de crecimiento fibroblástico (bFGF), FGF ácido y al factor de crecimiento endotelial (VEGF). Las propiedades funcionales de los islotes transplantados son bastante desconocidas, pero la evidencia de trasplantes experimentales sugiere que tanto la perfusión sanguínea como la tensión de oxígeno en los tejidos con los islotes implantados disminuyen crónicamente, indicando un sistema vascular insuficiente. Con el fin de conseguir una condición óptima para la supervivencia y funcionalidad de las células beta transplantadas, es importante averiguar cuáles son los perjuicios presentes en la función vascular que ocurren después del trasplante clínico de los islotes.

Aún existe una falta de capacidad metabólica en trasplantes de islotes, la cual no puede ser compensada mediante el trasplante de una masiva cantidad de islotes. Este fenómeno puede ser principalmente atribuido a un detrimento nutricional y condiciones inflamatorias contra las cuales los islotes no poseen protecciones significativas. En particular, una insuficiente y tardía revascularización del islote puede privar de oxígeno a los recientemente transplantados, resultando esto en una muerte prematura de células  $\beta$  y contribuir a la temprana falla de implante (Linn *et al.*, 2006).

Moléculas inflamatorias, como FasL y citoquinas como interleuquina-1 (IL-1), factor de necrosis tumoral-1e (TNF-1e) e interferón-  $\delta$  (IFN- $\delta$ ), tienen el potencial de dañar las células  $\beta$  (Kawasaki *et al.*, 2004). Ellas, junto a moléculas tóxicas inespecíficas como especies reactivas de oxígeno (ROS, Reactive Oxygen Species), promueven insulitis y destrucción celular en diabetes autoinmune. Las ROS provocan daño al ADN de las células  $\beta$ , las cuales por activación de enzimas de reparación, comprometen su producción de ATP (Szabo, 2005). La glucosa en exceso crónico produce efectos tóxicos en la función y estructura de órganos, incluyendo el islote pancreático. Se han sugerido múltiples vías bioquímicas y mecanismos de acción para la toxicidad de la glucosa, incluyendo la activación de protein-quinasa C, metabolismo de hexosamina y fosforilación oxidativa. Se han encontrado metabolitos de glucosa circulando por estas vías relacionadas al daño de células  $\beta$ . Estas vías tienen en común la formación de ROS, que con el tiempo da como resultado un estrés oxidativo crónico, el cual a su vez causa una expresión genética de insulina defectuosa,

reducción de secreción de insulina y aumento de apoptosis de células  $\beta$  (Linn *et al.*, 2006).

Se describió que la insulinitis pancreática estaba relacionada a un incremento del flujo sanguíneo en islotes (Carlsson *et al.*, 1998). El tejido inflamatorio es propenso a inducir neoformación de vasos sanguíneos en diferentes enfermedades, como infección bacteriana en heridas de la piel, artritis reumatoidea y cáncer (Esposito *et al.*, 2004). Por otra parte, los islotes transplantados a un medio singénico no inducen suficiente angiogénesis para asegurar una óptima oferta de oxígeno (Menger *et al.*, 2001). Los islotes transplantados parecen sufrir una deficiencia crónica de oxígeno. Tanto la hipoxia como la inflamación son factores inhibidores para el éxito del trasplante de islotes pancreáticos (Carlsson *et al.*, 2000).

## **5. Baja temperatura y secreción de insulina.**

El efecto directo de la hipotermia en la inhibición de la secreción de insulina puede ser el resultado de la disminución de disponibilidad de sustratos energéticos y/o la falta de señales metabólicas. Muchos estudios han sido orientados a explicar y conocer los diferentes agentes implicados en la exocitosis de los gránulos de insulina, tales como el ATP, calcio, calmodulina, anexinas, entre otros, y, sea cuál sea el mecanismo implicado, se ha demostrado que está influenciado por la temperatura. Se ha estudiado que la inhibición de la secreción de insulina inducida por glucosa es parcial a 27°C y completa a 17°C (Atwater *et al.*, 1984; Escolar *et al.*, 1990). Por otra parte, la exposición de islotes pancreáticos

(de rata y ratón) a bajas temperaturas (3°C) produce un incremento de tres veces en la secreción de insulina independiente de la concentración de glucosa en el medio de incubación y causa una degranulación completa de las células  $\beta$  (Dahl y Henquin, 1978). Esta liberación de insulina inducida por frío es transitoria y el recalentamiento a 37°C restaura la sensibilidad de las células  $\beta$  a la estimulación por glucosa (Dahl y Henquin, 1978). Se sugiere que una redistribución del  $\text{Ca}^{2+}$  desde compartimentos intracelulares, posiblemente mediado por una entrada de  $\text{Na}^+$  e incremento de  $\text{Na}^+$  intracelular, gatilla la exocitosis de gránulos de insulina expuestos al frío (Dahl y Henquin, 1978).

No se ha encontrado más información acerca de los mecanismos celulares que regularían la secreción de insulina en condiciones de frío. Así, la realización de esta investigación busca explorar el efecto de bajas temperaturas sobre la secreción de insulina, comparando condiciones fisiológicas con aquellas condiciones usadas en el procedimiento de aislamiento de islotes de Langerhans.

## **OBJETIVOS: GENERAL Y ESPECÍFICOS.**

### **1. Objetivo general:**

- Observar el efecto de los cambios de temperatura entre 3°C y 37°C sobre la secreción de insulina basal de islotes de Langerhans *in vitro*.

### **2. Objetivos específicos:**

- Aislar islotes de Langerhans de rata.
- Medir la secreción de insulina de islotes de Langerhans aislados e incubados *in vitro* a varias temperaturas (3°C, 10°C, 17°C, 23°C, 30°C y 37°C) con concentración basal de glucosa.
- Medir la secreción de insulina a distintas temperaturas y concentraciones de glucosa en un sistema de perfusión de islotes de Langerhans.

## **MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **1. Lugar y período del estudio.**

Este estudio fue realizado en el Laboratorio de Endocrinología y Cirugía Experimental, Programa de Genética Humana del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

### **2. Animales y condiciones.**

Se utilizaron 9 ratas (*Rattus norvegicus*) de la cepa Spragwe Darwley, machos de aproximadamente 200 g. de peso obtenidos desde el Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Los animales se encontraban en ayunas por lo menos durante 12 h.

### **3. Aislamiento de islotes de Langerhans.**

Para la eutanasia del animal<sup>1</sup> se administró 1 mL de una solución de Tiopental sódico al 2,5% por vía intraperitoneal. Se realizó abordaje ventral con exposición completa de la cavidad abdominal. Se llevó a cabo una ligadura del conducto pancreático en su porción terminal, a nivel de la ampolla de Vater y otra en su porción proximal, antes de la unión con el colédoco. Posteriormente, con una tijera de microcirugía tipo “Castroviejo”, se realizó una fenestración al conducto pancreático, por donde se introdujo una aguja de calibre 29G y 5 mm de

---

<sup>1</sup>Protocolo autorizado por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

longitud para luego perfundir aproximadamente 6 mL de solución de colagenasa al 0,2%, a 3°C (Sigma-Aldrich® Cat#C0130). Luego se extrajo el páncreas desprendiendo primeramente la porción asociada al estómago y bazo y posteriormente se tomó el intestino y se desprende de la porción asociada a éste. El páncreas se colocó sobre una placa Petri y se retiraron ligaduras, grasa y linfonódulos, se trabajó sobre hielo, y fue llevado a un tubo con 9 mL de solución de colagenasa 0,2% para ser sometido a digestión enzimática por 20 min en baño con agua a 37°C. Se detuvo la actividad enzimática con solución Hanks a 3°C adicionado con 2% de albúmina bovina ultra pura y glucosa 2,6 mM. Con esta solución se lavó 3 veces el tejido digerido, con el fin de extraer la colagenasa. Se sacó el sobrenadante y se pasó el tejido tres veces por una aguja de calibre 19G y luego por un colador metálico de 1 mm. Éste se llevó a un tubo (Falcon®) y se centrifugó por 2 min a una velocidad de 939,12 G. Se retiró el sobrenadante y se centrifugó en una gradiente de densidad con Histopaque®-1077 (Sigma® Cat#10771) por 20 min a una velocidad de 939,12 G obteniéndose los islotes de Langerhans en la interfase resultante.

#### **4. Protocolo (1). Descenso progresivo de la temperatura.**

Se trabajó con un total de 15 islotes de Langerhans por placa Petri. Dos grupos de Islotes fueron inmersos en 2 mL de solución Hanks, glucosa basal 2,6 mM (1 g/L), Hepes 5 mM y 0,5% albúmina. El Grupo 1 se utilizó como control para demostrar la funcionalidad de los Islotes de Langerhans y el Grupo 2 se sometió a condiciones basales de glucosa. Ambos grupos se pre-incubaron en estufa con

5% CO<sub>2</sub> y 100% de humedad durante 120 min a 37 °C para su recuperación del proceso de aislamiento. Posteriormente, se extrajo el medio y se agregaron a la placa con el Grupo 1, 2 mL de solución Hanks-Glucosa 16,7 mM (3 g/L), Hepes 5 mM y 0,5 % albúmina y a la placa con el Grupo 2 se le agregaron 2 mL de solución Hanks-Glucosa 2,6 mM, Hepes 5 mM y 0,5 % albúmina, ambas placas se incubaron a 37°C durante 60 min. Se extrajeron 2 mL de medio de la placa con el Grupo 1 y la muestra fue congelada a -20 °C para su posterior cuantificación de insulina, también se sacaron los 2 mL de medio de la placa que contenía al Grupo 2 y se congelaron a -20°C para la medición de insulina (muestra Control). A continuación, se procedió con el experimento sólo en condiciones basales de glucosa, o sea, sólo con el Grupo 2 de islotes agregándole 2 mL de solución Hanks-Glucosa 2,6 mM, Hepes 5 mM y 0,5 % albúmina, este procedimiento se repitió para las temperaturas de 30°C, 23°C, 16°C, 10°C y 3°C en un descenso progresivo de éstas con un intervalo de 60 min, guardándose la muestra cada vez para medición posterior de insulina.

Este protocolo se realizó con islotes de Langerhans provenientes de una rata. El experimento tuvo un total de 8 repeticiones (n=8).

## **5. Protocolo (2). Islotes sometidos a perfusión con solución fisiológica a diferentes temperaturas y concentraciones de glucosa.**

La totalidad de los islotes obtenidos del páncreas fueron inmersos en solución Hanks, glucosa 2,6 mM, Hepes 5 mM y 0,5% albúmina y sometidos a una

preincubación en estufa con 5% CO<sub>2</sub> y 100% de humedad durante 120 min a 37°C, para su recuperación del proceso de aislamiento. Posteriormente fueron seleccionados según tamaño y repartidos en números iguales, en 4 cámaras con papel filtro que forman parte del sistema de perfusión. El montaje del sistema de perfusión constó además de dos baños termorregulados, una bomba de perfusión y un sistema de recolección de las muestras. Inicialmente los islotes fueron perfundidos con solución Krebs (ajustada a pH 7,4) a 37°C con concentración basal de glucosa 2,6 mM (1 g/L) por 15 min y se recolectaron muestras cada 5 min. Terminado este tiempo (15 min), los islotes se perfundieron con la solución Krebs a 37°C con estímulo de glucosa 16,7 mM (3 g/L) por 30 min y las muestras se recolectaron cada 5 min. Posteriormente, se cambió nuevamente la solución Krebs a concentración basal de glucosa y fueron perfundidos los islotes por 40 min, recolectándose las muestras, tres veces cada 10 min y dos veces cada 5 min. Por último, se cambió la solución Krebs con concentración basal de glucosa a 37°C por otra que estaba a 4°C con concentración basal de glucosa y se perfundieron los islotes por 30 min recolectándose muestras cada 5 min. Todas las muestras fueron congeladas a -20°C para su posterior cuantificación de insulina.

## **6. Cuantificación de insulina.**

Las muestras se analizaron sin diluir. La cuantificación de insulina se realizó mediante el Kit LINCO® Rat/Mouse Insulin ELISA KIT (Cat. # EZRMI-13K); su medición en lector (VERSAMax® Tunable Microplate Reader Molecular Devices®) a 450 y 590 nm y la obtención de datos y análisis mediante un programa

computacional (Origin Pro 6). Se expresaron los resultados como total de insulina secretada por los islotes de Langerhans.

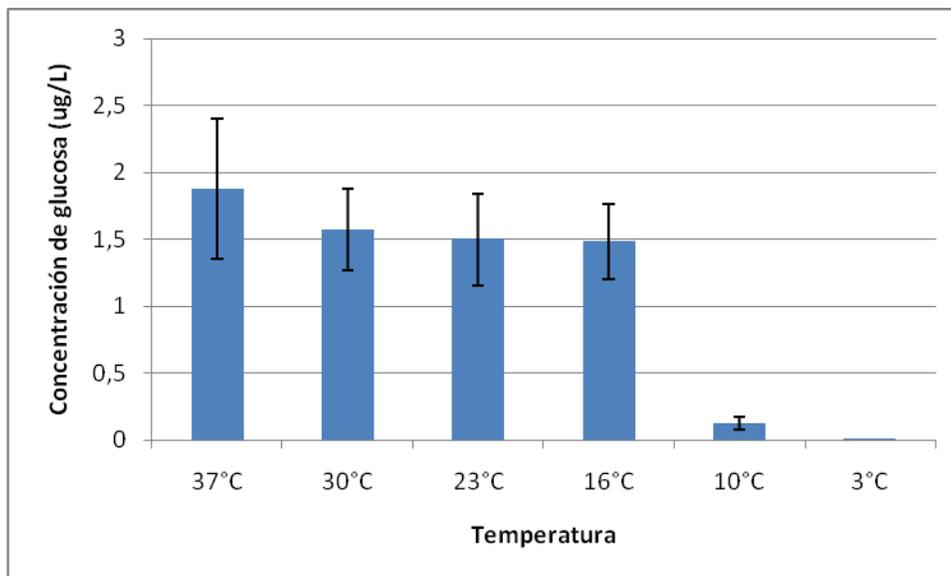
## **7. Análisis estadístico.**

Los valores obtenidos del programa computacional Softmax Pro 5 fueron analizados mediante el software Origin® 6.1 (OriginLab® Corporation). Los valores finales fueron expresados como el total de insulina secretada por los grupos de islotes de Langerhans. Estos datos fueron graficados y analizados estadísticamente (prueba T de Student y desviación estándar) mediante el programa Microsoft Excel® (Microsoft® Corporation).

## RESULTADOS.

### a. Secreción de insulina en islotes de Langerhans incubados a 37°C, 30°C, 23°C, 17°C, 10°C y 3°C en un descenso progresivo de la temperatura.

Los datos que se muestran a continuación corresponden a las mediciones de las concentraciones de insulina secretada por cada grupo de islotes (Fig. 1).

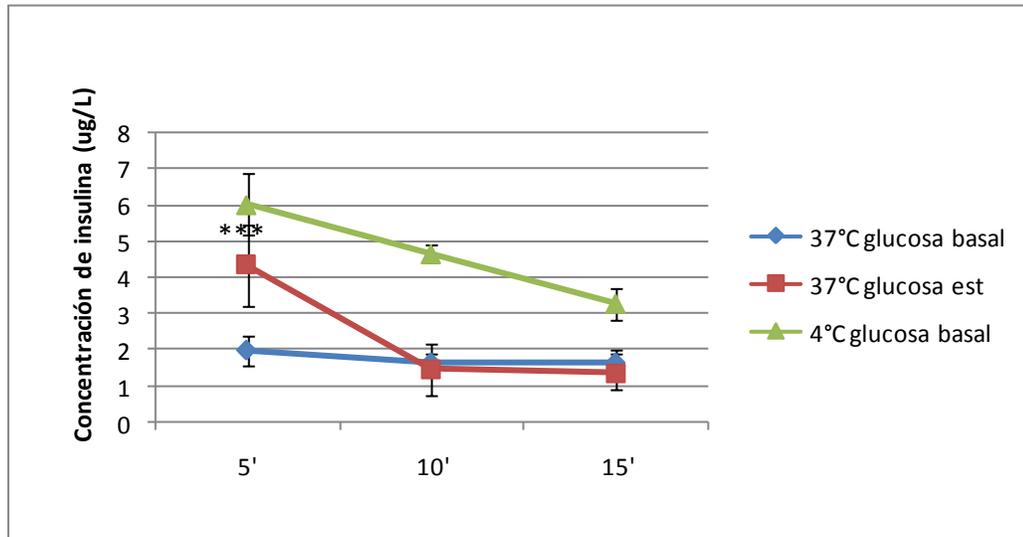


**Fig. 1. Secreción de insulina de islotes de Langerhans incubados a distintas temperaturas por períodos de 1 h en un descenso progresivo de ésta con concentración basal de glucosa.**

Al medir la cantidad de insulina secretada promedio no se observó una diferencia estadísticamente significativa entre el promedio de las temperaturas de 37°C, 30°C, 23°C y 16°C. Sin embargo, habiendo sometido los datos a análisis estadístico, los islotes de los grupos incubados a 10°C y 3°C son estadísticamente distintos ( $p < 0,05$ ) al grupo incubado a 37°C, todos en condiciones fisiológicas basales y sometidos a incubación durante una hora.

**b. Secreción de insulina en islotes de Langerhans sometidos a perfusión con solución fisiológica a distintas temperaturas y concentraciones de glucosa.**

Los datos que se muestran a continuación corresponden a las mediciones de la insulina secretada cada 5 min, por cada grupo de islotes durante 15min (Fig. 2).

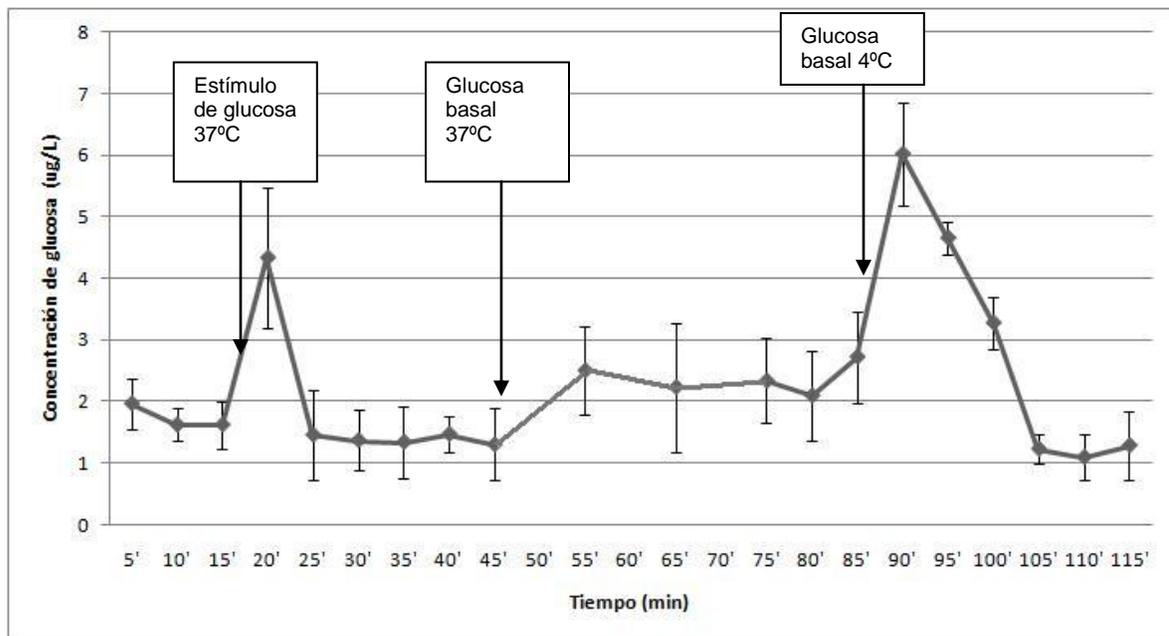


**Fig. 2. Secreción de insulina en islotes de Langerhans sometidos a perfusión con solución fisiológica a diferentes temperaturas y concentraciones de glucosa.**

En condiciones de perfusión con solución Krebs a 37°C y estímulo de glucosa de 3 g/L y perfusión con solución fisiológica a 4°C y concentración basal de glucosa (1 g/L), no se observaron aumentos importantes en la secreción de insulina (Fig. 2). Por otra parte el grupo sometido a perfusión con solución fisiológica a 4°C con concentración basal de glucosa (1 g/L) demostró ser estadísticamente distinto ( $p < 0,001$ ) al grupo de islotes perfundidos con solución

fisiológica a 37°C con concentración basal de glucosa (1g/L). Además la secreción de insulina en los islotes sometidos a perfusión con solución Krebs a 4°C con concentración basal de glucosa demostró ser más sostenida en el tiempo que la secreción de insulina de los islotes sometidos a perfusión con solución Krebs con estímulo de glucosa a 37C.

Se ha querido mostrar la progresión de la secreción de insulina a través de todo el tiempo que duró la experiencia. Se aprecia el pick que se logra en la secreción al cambiar la temperatura del medio de perfusión a 4°C (Fig. 3).



**Fig. 3. Secreción de insulina de islotes de Langerhans sometidos a diferentes temperaturas y concentraciones de glucosa.**

## **DISCUSIÓN.**

1. Experimentos de evaluación de la secreción de insulina en islotes de Langerhans incubados durante una hora en solución fisiológica con concentración basal de glucosa, a distintas temperaturas, con un descenso progresivo de ésta.

Al analizar la secreción de insulina en islotes de Langerhans de rata incubados a distintas temperaturas en solución fisiológica, se observa que a 37°C, 30°C, 23°C y 16°C no existe una diferencia importante en los valores obtenidos, pero sí existen diferencias entre las mediciones de secreciones a estas temperaturas y las mediciones de secreción de insulina a 10°C y 3°C, siendo éstas mucho menores a las antes mencionadas. Cuando la temperatura de incubación fue bajando progresivamente de 37°C a 16°C, no se observó respuesta de secreción inducida por frío. De esta forma, se da cuenta que la secreción de insulina con glucosa basal no es muy sensible a la temperatura en ese rango. Así, al bajar la temperatura de incubación a 10°C y posteriormente a 3°C se observó que la secreción de insulina tenía valores mucho más bajos, lo que es un resultado distinto a lo anteriormente reportado (Dahl y Henquin, 1978), donde se afirmaba tener respuesta al estímulo de secreción inducido por frío, independiente de la concentración de glucosa en el medio de incubación. Es posible que la técnica utilizada por estos autores sea distinta a la del presente trabajo, en términos de tiempo de incubación, o bien, el cambio de temperatura fue mucho más violento. Se conoce que a temperaturas entre los 17°C y 27°C, se depolariza

la membrana celular de las células  $\beta$ , lo cual activaría los canales de  $\text{Ca}^{++}$  dependientes de voltaje, por un tiempo mayor que en condiciones fisiológicas (Atwater *et al.*, 1984). Para dilucidar de mejor forma este fenómeno, se plantea como un tema interesante de estudiar la medición de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular en células  $\beta$  expuestas a bajas temperaturas.

La inhibición de secreción de insulina inducida por temperaturas entre  $10^{\circ}\text{C}$  y  $3^{\circ}\text{C}$ , en condiciones fisiológicas, puede ser explicada por la inactivación de los mecanismos enzimáticos propios de la célula. Como la estructura proteica es la que determina la actividad enzimática, cualquier causa que perturbe esta estructura puede llevar a una disminución de su actividad. La mayoría de las enzimas celulares de mamíferos poseen una actividad a temperaturas que bordean los  $37^{\circ}\text{C}$  (Schmidt y Pennacchiotti, 2001) con pocas excepciones que varían entre los  $10^{\circ}\text{C}$  y  $42^{\circ}\text{C}$ . A menor temperatura, la velocidad de reacción enzimática disminuye considerablemente, con una consecuente reducción en el metabolismo celular.

Por lo tanto, el cambio que existe entre los valores de las mediciones de secreción de insulina que se realizaron en este trabajo (diferencias entre el rango de  $3^{\circ}\text{C}$  a  $10^{\circ}\text{C}$  y el rango de  $16^{\circ}\text{C}$  a  $37^{\circ}\text{C}$ ), debiera explicarse porque sea cual sea el mecanismo de exocitosis de los gránulos de insulina, se encuentran influenciados por las bajas temperaturas. Por lo tanto, a la luz de este trabajo, se puede decir que este proceso es sensible a temperaturas inferiores a  $10^{\circ}\text{C}$ .

Con lo anteriormente discutido, es de esperar que la secreción basal de insulina a bajas temperaturas, hubiese sido nula o por lo menos reducida tal como aconteció en esta experiencia, en contraposición a lo descrito en estudios anteriores (Dahl y Henquin, 1978). Debido a esto, se propuso un segundo experimento, pensando en que la secreción de insulina es transitoria y se produce en los primeros minutos del estímulo, al cabo de una hora ya ha habido tiempo suficiente para que se produzca la recaptación de insulina del medio por parte de la célula  $\beta$ , donde se perfundieron los islotes por un tiempo determinado y se recolectaron muestras cada 5 min para observar la dinámica de la secreción de insulina.

2. Experimentos de evaluación de la secreción de insulina en islotes de Langerhans sometidos a perfusión de solución fisiológica a distintas temperaturas y concentraciones de glucosa.

El diseño experimental fue propuesto debido a la controversia presentada al comparar los resultados obtenidos en la experiencia anterior con los resultados propuestos por otros autores, en que se expone que la secreción de insulina es inducida por frío (Dahl y Henquin, 1978). Estos investigadores incluso obtuvieron fotografías de gránulos de secreción de insulina fusionados con la membrana celular de la célula  $\beta$  a 4°C, denominándola como “figura  $\Omega$ ”.

En nuestra experiencia pudimos en parte reproducir estos resultados, ya que obtuvimos valores tres veces más altos, en condiciones de 4°C con

concentración basal de glucosa, que a 37°C con la misma concentración de glucosa. Si bien es cierto y a la luz de nuestros resultados, podríamos decir que el frío si induce la secreción de glucosa en condiciones basales. Sin embargo, también podríamos atribuir estos resultados al posible shock mecánico al que pudieron ser expuestos los islotes en el desarrollo de la experiencia. Por esto se plantean otros experimentos como una forma de comprobar esta hipótesis: 1) aplicar la reversibilidad a nuestra experiencia, es decir, cambiar la perfusión de los islotes de Langerhans de una solución fisiológica a 4°C con concentración basal de glucosa por una solución fisiológica a 37°C con igual concentración de glucosa; y 2) ocupando el mismo diseño de nuestro experimento, al momento de cambiar los islotes a 4°C, no hacerlo con todos ellos, sino que cambiar sólo dos de las cuatro cámaras que los contienen y hacer la misma manipulación con las restantes dos cámaras, pero volviéndolas a someter a una perfusión con solución fisiológica a 37°C con concentración basal de glucosa, de esta forma, en ambos casos podríamos demostrar si es el frío lo que realmente induce la secreción de insulina o es el shock mecánico quién lo hace.

### 3. Otras consideraciones.

Uno de los factores determinantes en el éxito del aislamiento de los islotes pancreáticos es la solución enzimática empleada. En este trabajo se utilizó la enzima colagenasa, la cual elimina al máximo el tejido exocrino del páncreas,

permitiendo la liberación de los islotes de Langerhans. Conforme esta digestión es más intensa y prolongada, la pureza es mayor; sin embargo, las consecuencias para los islotes no siempre son buenas. Algunas células mueren y otras ven afectada su funcionalidad y/o viabilidad. Por otra parte, la extrema variabilidad entre las diferentes partidas de colagenasa, así como la casi constante contaminación con sustancias bacterianas, hace que sea necesario buscar una alternativa para estudios posteriores. Actualmente, la mejor de éstas es la liberasa, una combinación de proteasas de gran pureza, potencia y especificidad, aunque con la desventaja que su costo es considerablemente mayor al de la colagenasa.

En esta experiencia, se pudo advertir que la realización de un aislamiento enzimático “a la carta”, es decir, variando los tiempos de exposición a la enzima en función de su calidad y de la calidad del páncreas, permitió mejorar mucho el rendimiento del número de islotes de Langerhans aislados, del mismo modo que se logró recuperar islotes a priori “subóptimos” con muy buenos resultados.

Un error en el cual se pudo haber incurrido, guarda relación al origen de parte de la insulina medida en los distintos experimentos. Es posible que se haya producido cierta mortalidad de las células  $\beta$  durante el proceso de preincubación e incubación a distintas condiciones a las que fueron sometidas. Como se explicó antes, puede existir un efecto negativo de la colagenasa sobre los islotes de Langerhans, sumado al estrés mecánico y térmico tanto del proceso de aislamiento de islotes como el de incubación a distintas temperaturas, lo cual necesariamente ejerce algún detrimento en la funcionalidad y viabilidad celular.

Se sugiere, entonces, que para estimar este error para el modelo de experimentos de secreción, se evalúe la mortalidad celular, tratando las células con ethidium homodímero y calceína AM (Live/Death kit, Molecular Probes, u otro similar) y su posterior conteo en microscopía de fluorescencia.

## **CONCLUSIONES.**

- La secreción basal de insulina se ve fuertemente inhibida a temperaturas por debajo de los 16°C.
- La secreción de insulina transitoria producida a 4°C con concentración basal de glucosa es 3 veces sobre el nivel basal.
- Estas observaciones sugieren que el shock a 4°C puede ser dañino para los islotes en el páncreas del donante preservado antes del trasplante y que la mejor temperatura podría ser de 16°C.

## **BIBLIOGRAFIA.**

**AARON, I.; TAYLOR, D.; PITTENGER, G.** 2004. Advances in Diabetes for the Millennium: Toward a Cure for Diabetes. *Med. Gen. Med.* 6(3 Suppl):12-12.

**ADAMEC, M.** 2003. Transplantation of the pancreas. *Cas. Lek. Cesk.* 142 (12): 4133-4200.

**ATWATER, I.; GONCALVES, A.; HERCHUELZ, A.; LEBRUN, P.; MALAISSE, W.; ROJAS, E.; SCOTT, A.** 1984. Cooling dissociates glucose-induced insulin release from electrical activity and cation fluxes in rodent pancreatic islets. *J. Physiol. Mar.* 348: 615-627.

**BALIBREA DEL CASTILLO, J.; VARA, E.; ARIAS, J.; GARCÍA, M.; GARCÍA, J.; BALIBREA, J.** 2007. Estado Actual del Transplante de Islotes Pancreáticos. *Cir. Esp.* 81(4): 177-191.

**BARCELÓ, A.; AEDO, C.; RAJPATHAK, S.; ROBLES, S.** 2003. The cost of Diabetes in Latin America and the Caribbean. *Bull. World Health Organ.* 81(1): 19-28.

**CARLSSON, P.; SANDLER, S.; JANSSON, L.** 1998. Pancreatic islet blood perfusion in the nonobese diabetic mouse: diabetes-prone female mice exhibit a higher blood flow compared with male mice in the prediabetic phase. *Endocrinology*. 139: 3534–3541.

**CARLSSON, P.; PALM, F.; ANDERSSON, A.; LISS, P.** 2000. Chronically decreased oxygen tension in rat pancreatic islets transplanted under the kidney capsule. *Transplantation*. 69: 761–766.

**CIANCIO, G.; MILLER, J.; BURKE, GW.** 2001. The use of intravenous tacrolimus and mycophenolate mofetil as induction and maintenance immunosuppression in simultaneous pancreas -- kidney recipients with previous transplants. *Clin. Transplant*. 15: 142-145.

**DAHL, G.; HENQUIN, J.** 1978. Cold-induced insulin release in vitro: evidence for exocytosis. *Cell Tissue Res*. 194 (3): 387-398.

**ESCOLAR, J.; HOO-PARIS, R.; CASTEX, C.; SUTTER, B.** 1990. Effect of low temperatures on glucose-induced insulin secretion and glucose metabolism in isolated pancreatic islet of the rat. *J Endocrinol*. 125(1): 45-51.

**ESPOSITO, I.; MENICAGLI, M.; FUNEL.** 2004. Inflammatory cells contribute to the generation of an angiogenic phenotype in pancreatic ductal adenocarcinoma. J. Clin. Pathol. 57: 630–636.

**FELDMAN, L.** 2003. Oxidative stress and diabetic neuropathy, a new understanding of an old problem. J. Clin. Invest. 3: 431-433.

**GARCIA DE LOS RÍOS, M.** 2003. Clasificación, diagnóstico y pesquisa de la Diabetes Mellitus. In: Diabetes Mellitus. 2ª ed. Fundación de Investigación y perfeccionamiento médico. Santiago, Chile. Pp. 23-41.

**GARTNER, L.; HIATT, J.** 2002. Texto atlas de histología. 2º ed. Edit. McGraw-Hill Internamerica. México. Pp.397-402.

**GENESER, F.** 2003. Histología. 3º ed. Edit. Médica Panamericana S.A. Pp 551-618.

**GUYTON, A.; HALL, J.** 1996. Insulina, glucagón y Diabetes Mellitus. In: Tratado de Fisiología Médica. 9ª ed. McGraw-Hill Interamericana, España. Pp. 1063-1069.

**HARO-HERNANDEZ, R.; MÉNDEZ, JD.** 2001. Pancreatic beta cell neogenesis and regeneration. Gac. Med. Mex. 138(6): 557-564.

**KANDASWAMY, R.; SUTHERLAND, D.** 2006. Pancreas versus islet Transplantation in Diabetes mellitus: How of allocate Deceased Donor Pancreata?. *Transpl. Proc.* 38: 365-367.

**KANETO, H.; KAJIMOTO, Y.; MIYAGAWA, J.; MATSUOKA, T.; FUJITANI, Y.; UYAHARA, Y.; HANAFUSA, T.; MATSUZAWA, Y.; YAMASAKI, Y.; HORI, M.** 1999. Benefical effect of antioxidants in Diabetes: possible protection of pancreatic  $\beta$  cells against glucose toxicity. *Diabetes.* 48(12): 2398-2406.

**KAWASAKI, E.; ABIRU, N.; EGUCHI, K.** 2004. Prevention of type 1 diabetes: from the viewpoint of beta cell damage. *Diab. Res. Clin. Prac. (Suppl.1):* S27–32.

**KENDALL, W JR.; COLLINS, B.; OPARA, E.** 2001. Islet cell transplantation for the treatment of Diabetes Mellitus. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 1 (1): 109-119.

**LINN, T.; SCHMITZ, J.; HAUCK-SCHMALENBERGER, I.; LAI, Y.; BRETZEL, R.; BRANDHORST, H.; BRANDHORST, D.** 2006. Ischaemia is linked to inflammation and induction of angiogenesis in pancreatic islets. *Clin. Exp. Immun.* 144: 179–187.

**MENGER, M. ; YAMAUCHI, J. ; VOLLMAR, B.** 2001. Revascularization and microcirculation of freshly grafted islets of Langerhans. *World J. Surg.* 25: 509–515.

**NIELSEN, J.; SVENSSON, C.; DOUGLAS, E., MOLDRUP, A; BILLESTRUP, N.** 1999. Beta cell Proliferation and Growth Factors. *J. Mol. Med.* 77: 62-66.

**PAPAS, K.; COLTON, C.; GOUNARIDES, J.; ROOS, E.; JAREMA, M.; SHAPIRO, M.; CHENG, L.; CLINE, G.; SHULMAN, G.; WU, H.; BONNER-WEIR, S.; WEIR, G.** 2001. NMR spectroscopy in beta cell engineering and islet transplantation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 944: 96-119.

**ROSENBERGER, L.; WANG, R.; PARASKEVAS, S.; MAYSINGER, D.** 1999. structural and functional changes resulting from islet isolation lead to islet death. *Surgery.* 126(2): 393-398.

**RUSO, L.** 1999. Transplante de páncreas. Historia y evolución de las Ideas. *Rev. Hosp. Maciel.* 4: 16-21.

**RYAN, E.; PATY, B.; SENIOR, P.; BIGAM, D.; ALFADHLI, E.; KNETEMAN, N.; LAKEY, J.; SHAPIRO, A.** 2005. Five-Year Follow-Up Afetr Clinical Islet Transplantation. *Diabetes.* 54: 2060-2069.

**SCHMIDT, H.; PENNACHIOTTI, I.** 2001. Las enzimas en los alimentos: Su importancia en la química y la tecnología de los alimentos. [en línea] [http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias\\_químicas\\_y\\_farmacéuticas/sc\\_hmidth02/](http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_químicas_y_farmacéuticas/sc_hmidth02/) [consulta:27 Enero 2008].

**SRINIVASAN, P.; HUANG, GC.; AMIEL, SA.; HEATON, ND.** 2007. Islet cell transplantation. *Postgrad. Med. J.* 83(978): 224-229.

**SUTHERLAND, D.; GRUESSNER, R.; DUNN, D.** 2001. Lessons learned from more than 1.000 pancreas transplants at a single institution. *Ann Surg.* 233: 463-501.

**SUZUKI, K.; BONNER-WEIR, S.; TRIVEDI, N.** 1998. Function and survival of macroencapsulated syngeneic islets transplanted into streptozocin-diabetic mice. *Transplantation.* 66: 21-28.

**SZABO, C.** 2005. Roles of poly (ADP-ribose) polymerase activation in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications. *Pharmacol. Res.* 52: 60–71.

## ANEXOS.

### 1. Soluciones:

**Solución HANKS (con ión  $\text{Ca}^{++}$ ) (ajustado a pH 7,4).**

Componentes	g/L
<b><math>\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}</math></b>	<b>0,185</b>
<b><math>\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}</math></b>	<b>0,41</b>
<b>KCl</b>	<b>0,4</b>
<b><math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math></b>	<b>0,06</b>
<b><math>\text{NaHCO}_3</math></b>	<b>0,35</b>
<b>NaCl</b>	<b>8,0</b>
<b><math>\text{Na}_2\text{HPO}_4</math></b>	<b>0,175</b>
<b>D-Glucosa</b>	<b>1,0</b>
<b>HEPES</b>	<b>1,1915</b>

**Solución PBS modificado (sin ión  $\text{Ca}^{++}$  ni  $\text{Mg}^{++}$ ) (ajustado a pH 7.4).**

Componentes	g/L
<b>KCl</b>	<b>0,2</b>
<b><math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math></b>	<b>0,2</b>
<b>NaCl</b>	<b>8,0</b>
<b><math>\text{Na}_2\text{HPO}_4</math></b>	<b>1,15</b>

**Solución de extracción de islotes de Langerhans.**

Componentes	mL
<b>ETOH 70%</b>	<b>700</b>
<b>Agua destilada</b>	<b>300</b>
<b>HCl 1M</b>	<b>15</b>

## 2. Protocolos:

### Protocolo ELISA:

Todos los reactivos del *Kit* deben estar a temperatura ambiente antes de comenzar el ensayo.

1. Diluir el *buffer* de lavado concentrado 10X en 450 mL de agua destilada.
2. Lavar cada pocillo de la placa 3 veces con 300  $\mu$ L de *buffer* de lavado diluido, cada vez. Remover el *buffer* de lavado de todos los pocillos invirtiendo la placa sobre una toalla de papel absorbente, sin dejar secar las placas antes del próximo paso.
3. Agregar 20  $\mu$ L de *buffer* de ensayo a los pocillos blanco y 10  $\mu$ L al resto de los pocillos.
4. Agregar en duplicado 10  $\mu$ L de estándares de Insulina de rata en orden de concentración ascendente en los pocillos correspondientes.
5. Agregar 10  $\mu$ L de QC1 y 10  $\mu$ L de QC2 a los pocillos correspondientes.
6. Agregar secuencialmente 10  $\mu$ L de muestras desconocidas en duplicado a los pocillos restantes.
7. Agregar 80  $\mu$ L de anticuerpo de detección a todos los pocillos. Sellar la placa e incubar por 2 h a temperatura ambiente en un agitador orbital de placas a una velocidad aproximada de 37,6 G a 58,7 G.
8. Una vez finalizado el periodo de incubación, remover el sello de la placa y vaciar las soluciones invirtiéndola sobre toallas de papel absorbente.

9. Lavar los pocillos 3 veces con *buffer* de lavado diluído (con 300  $\mu$ L para cada pocillo), por cada lavado. Remover el *buffer* de lavado de todos los pocillos invirtiendo la placa sobre una toalla de papel absorbente, sin dejar secar las placas antes del próximo paso.
10. Agregar 100  $\mu$ L de solución de enzima a cada pocillo. Sellar la placa e incubar en el agitador orbital a una velocidad aproximada de entre 37,6 G y 58,7 G.
11. Sacar el sello, vaciar las soluciones de la placa y remover el *buffer* residual como se explicó anteriormente.
12. Lavar los pocillos 6 veces con *buffer* de lavado diluido con 300  $\mu$ L para cada pocillo, por cada lavado y remover el *buffer* residual.
13. Agregar 100  $\mu$ L de solución sustrato a cada pocillo, cubrir con el sello y llevar al agitador orbital por aproximadamente 15 min. Debe visualizarse un color azul tanto en los pocillos de los estándares de Insulina como en las muestras, cuya intensidad es directamente proporcional a la concentración de insulina.
14. Remover el sello y agregar 100  $\mu$ L de solución de parada y agitar la placa suavemente. El color azul debe virar a amarillo. Medir inmediatamente la absorbancia a 450 nm y a 590 nm en un lector de placas asegurándose de que no existan burbujas al interior de los pocillos.