



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y
PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



MECANISMOS CELULARES DEL CONTROL DE LA
SECRECIÓN DE INSULINA EN
ISLOTES DE LANGERHANS DE RATA (*Rattus rattus*)
INCUBADOS A 3°C

RODRIGO VALENZUELA ACEVAL

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

PROFESORA GUÍA: ILLANI JEANNE ATWATER

SANTIAGO, CHILE
2007



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y
PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



MECANISMOS CELULARES DEL CONTROL DE LA
SECRECIÓN DE INSULINA EN
ISLOTES DE LANGERHANS DE RATA (*Rattus rattus*)
INCUBADOS A 3°C

RODRIGO VALENZUELA ACEVAL

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

NOTA FINAL: 7.0

PROFESOR GUÍA: ILLANI JEANNE ATWATER 7.0

PROFESOR CONSEJERO: ANDRÓNICO NEIRA 7.0

PROFESOR CONSEJERO: MARÍA SOLEDAD FERNÁNDEZ 7.0

SANTIAGO, CHILE
2007

Agradecimientos:

En primer lugar quisiera agradecer a mi profesora guía, Dra. Illani Atwater. Gracias por haberme acogido en su equipo de trabajo, y permitirme conocer la admirable mujer que usted es. Al Dr. David Mears, por su excelente disposición y sugerencias. A mi compañero, y por sobre todo amigo, Pedro Martínez, por el desinteresado y gratuito apoyo brindado durante la redacción de mi memoria. Recordaré por siempre tan noble gesto. A mis profesores consejeros Dra. María Soledad Fernández y Dr. Andrónico Neira-Carrillo, por su impecabilidad en la revisión de este escrito. Finalmente, no puedo dejar de agradecer a todo el personal del Laboratorio de Neuroendocrinología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. A todos ustedes, sinceramente, muchas gracias.

Dedico esta memoria:

A mis padres, quienes han sido un pilar fundamental en mi vida y mi carrera. Por todo su esfuerzo, dedico a ustedes este trabajo, como una modesta retribución al infinito amor que siempre me han dado.

A mis hermanos y toda mi familia, por su continuo apoyo y compañía, sin los cuales no hubiera sido posible llegar a este momento.

Con admiración al Dr. Luis Alberto Raggi, por guiarme en la vida universitaria, y su apoyo en los momentos difíciles.

A mis amigos, por darme la oportunidad de enriquecer mi espíritu junto a ustedes, compartiendo con alegría tantos sueños.

A ti Natalia, por todo tu amor, energía y paciencia, en este camino que comienza. A ti, compañera de mis días y del porvenir.

INDICE

	Pág.
INDICE	i
RESUMEN	ii
SUMMARY	iv
I) INTRODUCCIÓN	1
II) REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
III) OBJETIVOS: GENERAL Y ESPECÍFICOS	16
IV) MATERIALES Y MÉTODOS	17
V) ANÁLISIS ESTADÍSTICO	21
VI) RESULTADOS	22
a. Secreción de insulina en Islotes de Langerhans incubados durante 20 minutos en solución fisiológica, a distintas temperaturas.	22
b. Secreción de insulina en Islotes de Langerhans incubados a 3°C y 37°C durante 20 minutos en solución con y sin ión Ca ²⁺ .	23
c. Secreción de insulina en Islotes de Langerhans incubados durante 20 minutos a 3°C y 37°C en solución sin Na ⁺ , sustituido por Li ⁺ .	24
VII) DISCUSIÓN	25
VIII) CONCLUSIÓN	30
IX) BIBLIOGRAFÍA	32
X) ANEXOS	38

RESUMEN

La Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad metabólica crónica, de origen multifactorial, en la cual defectos en la secreción y/o en la acción de la insulina sobre los tejidos del organismo resultan en una hiperglicemia. La hiperglicemia crónica condiciona a largo plazo el desarrollo de nefropatía, retinopatía, neuropatía y complicaciones cardiovasculares, determinando una alta morbilidad y mortalidad de los pacientes diabéticos respecto a la población general.

Hoy esta enfermedad se clasifica en 5 grupos de pacientes: DM tipo 1 (insulinodependientes); DM tipo 2 (insulinoresistencia y deficiencia no absoluta de insulina); Diabetes gestacional; pacientes con intolerancia a la glucosa y glicemia de ayunas alterada e individuos que tienen glicemias anormales que condicionan un alto riesgo de desarrollar diabetes.

La DM tipo 1 se presenta en forma predominante en niños y adultos jóvenes, debido a una destrucción de las células beta (β) por causa autoinmune. El objetivo principal del tratamiento de pacientes con DM tipo 1 es la normalización de los niveles de glucosa sanguínea, evitando así complicaciones a largo plazo. El trasplante de islotes de Langerhans puede ser una forma segura y relativamente sencilla de restaurar la producción endógena de insulina en pacientes crónicos, con alteraciones sistémicas que han sido inmunosuprimidos por trasplante renal. En este proceso, la etapa de aislamiento de islotes de Langerhans es la más crítica: el páncreas está expuesto a condiciones no fisiológicas, como bajas

temperaturas, altas concentraciones de potasio (K^+), y condiciones isquémicas calientes, resultando en un efecto negativo en la viabilidad y funcionalidad celular.

En este estudio se investigó el efecto de la mantención de los islotes de Langerhans a $3^{\circ}C$ sobre la secreción de insulina, comparando condiciones fisiológicas con las condiciones usadas en los procedimientos de aislamiento de islotes de Langerhans. Para esto se aislaron islotes de Langerhans de rata y se incubaron a distintas temperaturas, se midió la secreción de insulina en condiciones basales y elevadas de glucosa; secreción de insulina en ausencia de Ca^{2+} , y secreción de insulina en sustitución de Na^+ por Li^+ .

Se determinó que la secreción de insulina aumenta significativamente sobre el nivel basal solamente al incubar en solución fisiológica con 3 g/L de glucosa a $37^{\circ}C$, no observándose tal efecto a $3^{\circ}C$, $17^{\circ}C$ y $27^{\circ}C$. La secreción basal de insulina es insensible a la temperatura, pero sus mecanismos de regulación aún se desconocen. La ausencia de Ca^{2+} inhibe casi completamente la secreción de insulina estimulada por glucosa. La sustitución de Na^+ por Li^+ restaura la sensibilidad a la glucosa por parte de la célula beta (β) a $3^{\circ}C$. Además, se concluyó que la presencia de Na^+ no es indispensable en el mecanismo de secreción de insulina a $3^{\circ}C$ o $37^{\circ}C$. Se indica la necesidad de que se realicen nuevos experimentos conducentes a dilucidar el mecanismo por el cual el Li^+ restaura la secreción de insulina inducida por glucosa a $3^{\circ}C$. Finalmente, se sugiere estandarizar las técnicas de trabajo para el aislamiento de islotes de Langerhans, sobre todo en la etapa de digestión pancreática.

SUMMARY

Diabetes Mellitus (DM) is a chronic metabolic disease, of multifactorial etiology, where secretion and/or insulin action defects on muscle and liver cells leads to hyperglycaemia. Chronic hyperglycaemia results in the development of long term nephropathy, retinopathy, neuropathy and cardiovascular disease, determining a high mortality and morbidity in diabetic patients with respect to the general population.

This disease is classified into 5 patients groups: DM type 1 (insulin-dependent), DM type 2 (insulin-resistance and relative insulin deficiency), Gestational diabetes, Glucose-intolerance with Impaired Fasting Glucose, and subjects with abnormal glucose levels who are with high risk of diabetes development.

DM type 1 is occurs predominantly in children and young adults, caused by an autoimmune beta-cell (β) destruction. The central treatment objective in patients with DM type 1 patients is the normalization of blood glucose levels, in order to avoid long term complications. Transplantation of islets of Langerhans may be a secure and relatively easy way to restore endogenous insulin production in diabetic patients already immunosuppressed for kidney transplant. In this process, the islet isolation step is critical; the pancreas is exposed to non physiological conditions, such as low temperatures, high potassium (K^+) concentrations and warm ischemic conditions, all of which have a negative effect on cellular viability and functionality.

In this study, the effect of cooling on insulin secretion from islets of Langerhans was investigated, comparing physiological conditions with isolation

procedure conditions. Rat islets of Langerhans were isolated, and incubated at different temperatures, with basal and elevated glucose concentration conditions; insulin secretion in the absence of Ca^{2+} , and in the absence of Na^+ with Li^+ substitution.

We determined that insulin secretion is increased over basal level only when islets are incubated in physiological solutions, with glucose 3 g/L at 37°C, and not at 3°C, 17°C or 27°C. Basal insulin secretion is insensitive to temperature. The absence of Ca^{2+} inhibits almost completely glucose-stimulated insulin secretion. Substitution of Na^+ by Li^+ restores beta (β) cell glucose sensitivity at 3°C. We concluded that Na^+ is not essential for the insulin secretion mechanism at 3° or 37°C. Further studies are required to elucidate the mechanism by which Li^+ restores glucose induced insulin secretion at low temperatures. Finally, we suggest to standardize working techniques for islet of Langerhans isolation, especially at the pancreatic digestion step.

INTRODUCCIÓN

La Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad metabólica crónica, que se caracteriza por una hiperglicemia resultante de defectos en la secreción y/o en la acción de la insulina sobre los tejidos del organismo. Se ha considerado una enfermedad multifactorial en donde intervienen factores genéticos, inmunológicos y adquiridos. La hiperglicemia crónica condiciona, a largo plazo, el desarrollo de nefropatía, retinopatía, neuropatía 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 en el mundo. Las cifras muestran que actualmente existen 135 millones de personas con diabetes en todo el orbe, y que esta cifra podría duplicarse en los próximos 10 años (Kendall *et al.*, 2001). La incidencia aumenta con la edad, alcanzando en la mayoría de los países occidentales una prevalencia del 10-20% en la población mayor de 60 años. En Chile, la DM corresponde a la octava causa de muerte, con una tasa creciente que en el año 1998 alcanzó 24 casos por cada 100.000 hab. Los pacientes diabéticos fallecen principalmente de enfermedades cardiovasculares como infarto al miocardio, accidentes vasculares cerebrales, coma cetoacidótico, hipoglicemia, infecciones e insuficiencia renal.

Hoy en día se establece una clasificación de DM que incluye 5 categorías de pacientes: DM tipo 1, caracterizada por una destrucción de las células beta (β), deficiencia absoluta de insulina, tendencia a la cetoacidosis y necesidad de tratamiento con insulina para vivir (insulinodependientes); DM tipo 2, determinada

por insulinoresistencia y deficiencia (no absoluta) de insulina; Diabetes gestacional, caracterizada por una alteración de la regulación de la glucosa que aparece en el curso del embarazo; Intolerancia a la glucosa y glicemia de ayunas alterada; e individuos que tienen glicemias anormales que condicionan un alto riesgo de desarrollar diabetes (García de los Ríos, 2003).

La DM tipo 1 puede aparecer en cualquier edad, pero se presenta en forma predominante en niños y adultos jóvenes, con una mayor incidencia antes de la edad escolar y un alza alrededor de la etapa puberal. Su etiología en el 90% de los casos es autoinmune, mientras que un 10% son idiopáticos.

La DM presenta además una marcada variedad geográfica, con frecuencias muy elevadas en los países nórdicos de Europa, como Finlandia y Suecia (hasta 35 casos anuales por 100.000 hab.) e incidencias bajas en países orientales como China y Corea (alrededor de 0.5 –2 casos anuales por 100.000 hab.). Esta diferencia de frecuencias sugiere la posible influencia de factores ambientales y/o étnicos en el origen de la enfermedad.

El principal objetivo del tratamiento de pacientes con DM tipo I es la normalización de los niveles de glucosa sanguínea, evitando así complicaciones a largo plazo, como alteraciones renales, oculares, nerviosas y cardiovasculares. Para esto existen en la actualidad diversas terapias paliativas que buscan normalizar los niveles de glucosa sanguínea mediante la administración de insulina exógena. Sin embargo, estas terapias no constituyen una óptima alternativa al reemplazo de la función pancreática normal.

El trasplante de islotes de Langerhans puede ser también una forma segura y relativamente sencilla de restaurar la producción endógena de insulina en

pacientes inmunosuprimidos por trasplante renal. En el proceso de trasplante de los islotes de Langerhans la etapa de aislamiento es la más crítica, ya que el páncreas está expuesto a condiciones no fisiológicas, como altas concentraciones de K^+ , temperaturas que bordean los $3^{\circ}C$, y condiciones isquémicas, lo que tiene efecto negativo en la viabilidad celular.

En este estudio se investigaron los mecanismos del control de la secreción de insulina en islotes de Langerhans de rata, incubados a $3^{\circ}C$, comparando condiciones fisiológicas con las condiciones usadas en los procedimientos de aislamiento de islotes de Langerhans.

II) REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Conceptos generales

El **páncreas** esta compuesto por dos tipos principales de tejidos: 1) El páncreas exocrino, que esta compuesto por los acinos pancreáticos, cuya función es secretar los jugos digestivos al duodeno, y 2) el páncreas endocrino, que esta compuesto por los **islotos de Langerhans**, cuya función es secretar ciertos tipos de hormonas a la sangre. El volumen de los islotes de Langerhans comprende del 1 a 2% del tejido pancreático (Haro-Hernández y Méndez, 2002; Srinivasan *et al.*, 2007). Estos contienen tres tipos principales de células, alfa (α), beta (β), delta (δ), y células PP, que se distinguen entre si por sus características morfológicas y tintoriales. Las **células beta (β)**, que constituyen aproximadamente el 60% de todas las células, están situadas principalmente en el centro de cada islote de Langerhans y secretan insulina. Las células alfa (α), que constituyen aproximadamente el 25% del total, secretan glucagón. Las células delta (δ), alrededor de un 10% del total, secretan somatostatina. Y las células PP, que comprenden una escasa cantidad, secretan una hormona denominada polipéptido pancreático (Guyton y Hall, 1996).

La **insulina** es una hormona polipeptídica sintetizada exclusivamente por las células beta (β) pancreáticas y cumple la función de regular de manera muy precisa los niveles de glucosa sanguínea, 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, 2002).

2. Diabetes Mellitus

La **Diabetes Mellitus (DM)** 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 e incurable. 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 1**: producida por una destrucción de las células beta (β) por una causa autoinmune (Feldman, 2003).
- Diabetes **Tipo 2**: 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 (García de los Ríos, 2003; Nielsen *et al.*, 1999).

- Diabetes gestacional: producida sólo durante la 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 de 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).

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 DM (Barceló *et al.*, 2003).

La DM tipo I, o insulino dependiente, afecta principalmente a gente joven menor de 20 años de edad (Gartner y Hiatt, 2002) y se caracteriza por la destrucción de las células secretoras de insulina (células β) en los islotes de Langerhans producto de una reacción de naturaleza autoinmune (Feldman, 2003). Dado que la función principal de la insulina es la regulación de los niveles de glucosa sanguínea, la disminución de su producción y/o secreción desencadena estados crónicos de hiperglicemia, lo que a su vez genera estados de estrés

oxidativo sobre las células, causando así daños en diversos tejidos (Kaneto *et al.*, 1999).

3. Tratamientos actuales para la Diabetes Mellitus tipo 1.

3.1 Insulina exógena

La administración subcutánea de insulina ha sido la terapia empleada por más de siete décadas para el tratamiento de la DM tipo 1 (Haro-Hernández y Méndez, 2002). Existen diversas formas de administración de insulina exógena. Además de la inyección de insulina, hoy se encuentran a disposición modernos implantes de bombas infusoras de insulina, que han probado ser seguros, eficientes y bien aceptados por una amplia variedad de pacientes representantes de todas las edades (Einhorn, 2004). Los problemas reportados durante la década de 1980 y 1990, tales como obstrucción del catéter, desarrollo de infecciones en el sitio de infusión, malfuncionamiento o aceleración en la dosificación de insulina, fueron gradualmente resueltos con la introducción de nuevos materiales, nuevos tipos de insulina, rotación del sitio de infusión y mejoramiento de los componentes electrónicos (Del Roio Liberatore y Damiani, 2006).

Otra ruta de administración es la pulmonar, que ofrece grandes ventajas. El pulmón posee una gran área para la absorción de drogas, con un rango de 100 a 140 m². Además, el epitelio alveolar tiene una permeabilidad que permite una rápida absorción de solutos y debido a que el *clearance* mucociliar del tejido alveolar pulmonar es más lento que el del tejido bronquial, el alvéolo provee una gran oportunidad para la absorción de grandes moléculas como la insulina (Owens *et al.*, 2003). Aunque muchos sistemas inhaladores están en desarrollo, el

Exubera® (Pfizer) y su dispositivo de administración es la primera insulina inhalada en ser aprobada para su uso en Estados Unidos y Europa (Hollander, 2007). Otros tipos de administración de insulina exógena, como el parche de insulina, aún se encuentran en desarrollo.

A pesar de esto, la ciencia médica no ha podido imitar la forma tan precisa en que el páncreas secreta insulina. Comúnmente 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, 2002). Por ahora, y para pacientes crónicos, el trasplante de páncreas completo como también el de Islotes de Langerhans se presentan como las mejores alternativas para el tratamiento de esta enfermedad.

3.2 Trasplante de páncreas

Aunque el trasplante de páncreas puede restablecer la homeostasis de la glucosa, persisten profundas controversias que deben ser resueltas para que este sea aceptado como una técnica de rutina. Existen riesgos tales como el procedimiento quirúrgico, pérdida del injerto, degradación de tejido acinar, cistitis química, infección urinaria y muerte, además del inconveniente de realizar una vigilancia estricta que permita un diagnóstico temprano de rechazo (Ruso, 1999; Adamec, 2003). De esta forma empeora la calidad de vida del paciente, haciéndolo incluso vulnerable a otro tipo de patologías y complicaciones potencialmente letales (Ruso, 1999). Todo esto hace que dentro de las opciones de trasplantes, este procedimiento no constituya la mejor alternativa de tratamiento (Adamec, 2003).

3.3 Transplante de Islotes de Langerhans

El transplante de Islotes de Langerhans frente al transplante de páncreas tiene la ventaja de ser una técnica mínimamente invasiva, (Kendall *et al.*, 2001; Kandaswamy y Sutherland, 2006; Balibrea del Castillo *et al.*, 2007), con escasísima morbilidad y 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). Además, otorga una independencia de los tratamientos suplementarios de insulina, y por lo tanto, una mejora en la calidad de vida.

En este procedimiento, el páncreas del donante cadavérico es sometido a un proceso complejo que incluye la digestión y la purificación de los islotes de Langerhans (Swift *et al.*, 2006). El tejido pancreático es llevado a condiciones no fisiológicas, tales como altas concentraciones de K^+ , temperaturas que bordean los 3°C y condiciones isquémicas. Luego, los islotes de Langerhans son obtenidos y embolizados directamente al hígado por la vena porta. A pesar de que hoy en día los resultados del transplante de islotes de Langerhans son cada vez más esperanzadores, para que esta técnica sea utilizada masivamente, aún debe 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 de Langerhans resultan dañados, ya sea por el proceso de digestión del páncreas exocrino, como por el procedimiento de embolización de los islotes de Langerhans a la vena porta, produciendo una pérdida de estos 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). Por otro lado, se sabe que un número importante de islotes se pierden después de su implante (Balibrea del Castillo *et al.*, 2007).

Hacer posible la recuperación de la función pancreática en el paciente con diabetes mediante el trasplante de islotes de Langerhans, asegura un tratamiento 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).

3.3.1. Anatomía e implantación de Islotes de Langerhans después de su trasplante

Los islotes de Langerhans 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 (Jansson y Carlsson, 2002). Como el trasplante de islotes de Langerhans implica la interrupción de sus conexiones vasculares, su implante depende de células endoteliales y microvasos originados desde el órgano de implantación, para el desarrollo de un nuevo sistema vascular (Carlsson *et al.*, 2000). El restablecimiento del flujo sanguíneo ocurre dentro de los 7-14 días post trasplante, principalmente a través de brote vascular, y los vasos sanguíneos recientemente formados adquieren las mismas características morfológicas de aquellos presentes en los islotes de Langerhans endógenos (Menger *et al.*, 1989). Los islotes de Langerhans transplantados al hígado vía intraportal se revascularizan casi exclusivamente de tributarias de la arteria hepática, y muy pocos desde la vena porta (Andersson *et al.*, 1989).

Las propiedades funcionales de los islotes de Langerhans transplantados son bastante desconocidas, pero la evidencia de trasplantes experimentales sugiere que tanto la perfusión sanguínea como la tensión de oxígeno en los tejidos de los islotes de Langerhans implantados disminuyen crónicamente, indicando un sistema vascular insuficiente (Jansson y Carlsson, 2002).

4. Fisiología de la secreción de insulina

En la célula beta (β) y en muchas otras células endocrinas, las señales eléctricas juegan un rol central en la regulación de la secreción. Cuando la concentración de glucosa extracelular es elevada respecto al nivel basal de 5 mM (en el cual se observa una pequeña secreción de insulina) a 10 mM, la célula beta (β) comienza una lenta depolarización desde el potencial de reposo (-70 mV) a un umbral (-50 mV) desde el cual se obtiene la actividad eléctrica regenerativa. La actividad eléctrica consiste en oscilaciones del potencial de membrana entre mesetas de depolarización, desde las cuales se originan potenciales de acción dependientes de Ca^{2+} , los cuales se separan por intervalos eléctricos silenciosos (repolarizados) (Atwater *et al.*, 1981). La inducción de la actividad eléctrica es una parte central de la cascada de eventos que lleva al inicio de secreción de insulina (Ashcroft y Rorsman, 1989). Recientemente ha sido posible demostrar que los períodos de actividad eléctrica coinciden con liberación pulsátil de insulina (Barbosa *et al.*, 1998).

Experimentos de *Patch-clamp* han revelado que existen 2 tipos de canales iónicos particularmente importantes en la generación de la actividad eléctrica de la célula beta (β): canales de K regulados por ATP (canales K_{ATP}) y canales de Ca^{2+} tipo L dependientes de voltaje (Ashcroft y Rorsman, 1989). En ausencia de glucosa, la relación citoplasmática ATP/ADP es baja, y los canales de K_{ATP} permanecen abiertos. La salida constante de K^+ a través de los canales abiertos de K_{ATP} da cuenta del potencial de membrana negativo de la célula beta (β) en la ausencia de glucosa. Cuando la concentración de glucosa extracelular es elevada,

la rápida entrada de glucosa (vía transportadores GLUT2) y su consiguiente degradación metabólica resulta en una relación ATP/ADP citoplasmática elevada. Esto conlleva el cierre de los canales K_{ATP} , depolarización de membrana, apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, un incremento en la concentración citoplasmática de Ca^{2+} , y finalmente, la exocitosis de los gránulos secretorios contenedores de insulina (Atwater *et al.*, 1996; Rorsman *et al.*, 2000; Mears, 2004).

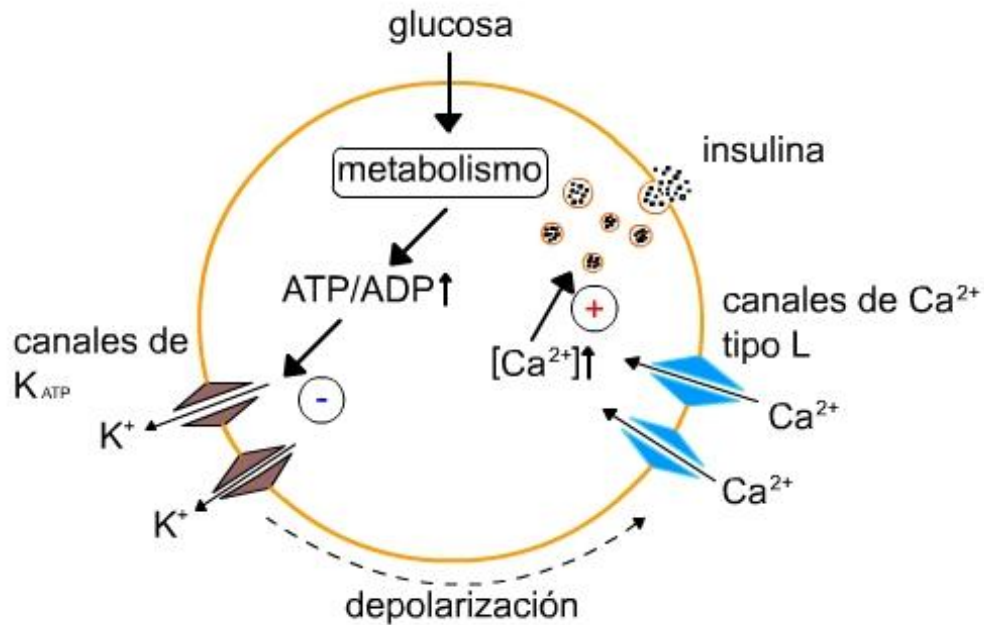


Fig.1. Modelo de estímulo-secreción de las células beta (β) pancreáticas. K_{ATP} , canal de K^+ regulado por ATP.

5. Litio y célula beta (β)

El litio es un metal alcalino muy ligero, de uso terapéutico en enfermedades mentales, como trastorno afectivo bipolar, depresión y manía. Se conocen algunos efectos que tiene sobre las células. El ión litio (Li^+) produce un aumento en los niveles intracelulares de inositol trifosfato (IP_3) e inositol tetrafosfato (IP_4) (Sekar y Hokin, 1986), ambos segundos mensajeros relacionados con la liberación de Ca^{2+} desde reservorios intracelulares. Además, los iones de litio son capaces de inhibir la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa (Beauge, 1978), acumulándose el Na^+ dentro de la célula, estimulando la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares, llevando en el caso de la célula beta (β), a un aumento de la liberación de insulina.

Recientemente se ha descrito que el Li^+ tiene efectos mitogénicos sobre las células beta (β), aunque se sabe poco del mecanismo por el cual ejerce tal efecto (Haro-Hernández *et al.*, 2002).

6. 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 inhibición de disponibilidad de sustratos energéticos y/o la falta de señales metabólicas. Se ha estudiado que la secreción de insulina inducida por glucosa es completamente bloqueada a 17°C y 27°C (Atwater *et al.*, 1984; Escolar *et al.*, 1990). Sin embargo, se reportó que la exposición de islotes de Langerhans (de rata y ratón) a bajas temperaturas (3°C) produjo un incremento de tres veces en la secreción de insulina independiente de la concentración de glucosa en el medio de incubación, y causó una degranulación completa de las

células beta (β) (Dahl y Henquin, 1978). Esta liberación de insulina inducida por frío fue transitoria y el recalentamiento a 37°C restauró la sensibilidad de las células beta (β) a la estimulación por glucosa. Estos autores sugirieron que una redistribución del Ca^{2+} desde compartimentos intracelulares, posiblemente mediado por una entrada e incremento de Na^+ intracelular, gatilló la exocitosis de gránulos de insulina expuestos al frío. De ser efectiva la degranulación de los islotes de Langerhans durante su aislamiento para trasplante, esta podría causar la pérdida de gran parte de ellos y explicar en parte el poco éxito en recuperar un gran número de islotes de Langerhans del páncreas de un donante.

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.

III) OBJETIVOS: GENERAL Y ESPECÍFICOS.

Objetivo general:

- Medir el efecto de baja temperatura sobre la funcionalidad de islotes de Langerhans de rata, sometidos a distintas condiciones de incubación.

Objetivos específicos:

- Medir la secreción de insulina a distintas temperaturas de incubación, en concentraciones basales y elevadas de glucosa.
- Medir la secreción de insulina a distintas temperaturas de incubación en ausencia de Ca^{2+} .
- Medir la secreción de insulina a distintas temperaturas de incubación en sustitución de Na^+ por Li^+ .

IV) MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales: Se utilizaron 24 ratas (*Rattus rattus*) en ayuna, de la cepa Spragwe Dawley machos, de aproximadamente 200 gr. de peso obtenidos desde el Bioterio Central de la Universidad de Chile.
2. Aislamiento de islotes de Langerhans: Para la eutanasia del animal¹ se administra 1 mL de una solución de Tiopental sódico al 2,5% por vía intraperitoneal. Se realiza abordaje ventral con exposición completa de la cavidad abdominal. Se localiza el páncreas y se lleva a cabo una ligadura del conducto pancreático en su porción terminal, a nivel de la ampolla hepatopancreática (Ampolla de Vater), y otra en su porción proximal, antes de su unión con el colédoco. Posteriormente, con una tijera de microcirugía tipo Castroviejo, se realiza una fenestración al conducto pancreático, por donde se introduce una aguja pequeña para luego perfundir aproximadamente 6 mL de solución de colagenasa (Sigma-Aldrich® Cat#C0130) al 0,2%, a 3°C. Luego se extrae cuidadosamente el páncreas, y sobre una placa Petri, éste se limpia retirando ligaduras, grasa y linfonodos. Durante este procedimiento se trabaja sobre hielo. Posteriormente el páncreas es llevado a un tubo con 9 mL de solución de colagenasa al 0,2% para ser sometido a una digestión enzimática durante 20 minutos en baño con agua a 37°C. Transcurrido este tiempo, se detiene la actividad enzimática con solución Krebs a 3°C adicionado con 2% de albúmina bovina ultra pura y 1 g/L de glucosa. Con esta misma solución se

¹ Protocolo autorizado por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

lava 4 veces el tejido digerido, con la finalidad de extraer la colagenasa. Luego, este tejido digerido se centrifuga durante 20 minutos a 2000 rpm (939.12 G) en una gradiente de densidad con Histopaque®-1077 (Sigma® Cat#10771) obteniéndose los islotes de Langerhans en la interfase resultante.

3. Protocolo 1: La totalidad de islotes de Langerhans obtenidos de la interfase son llevados a una placa Petri que contiene una solución Krebs-glucosa al 2,6 mM y 0,5% de albúmina bovina ultra pura (ver anexo soluciones). Luego, se seleccionan grupos homogéneos de 15 islotes de Langerhans, disponiendo cada grupo en un tubo de ensayo, el cual contiene 1 mL del medio antes descrito. Estos islotes de Langerhans se someten a una preincubación en estufa con 5% CO₂ y 100% de humedad, durante 120 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo, se extrae 1 mL del medio. Luego se agrega a los tubos con los islotes de Langerhans 1 mL de solución Krebs-glucosa al 2,6 mM y 0,5% de albúmina bovina ultra pura y se someten a incubación durante 20 minutos a 37°C. Se extrae 1 mL del medio y los islotes de Langerhans se someten a una nueva incubación, esta vez a 3°C durante 20 minutos, previa reposición del volumen de solución Krebs-glucosa al 2,6 mM y 0,5% de albúmina bovina ultra pura. Se extrae otra muestra del medio (1 mL) y se agrega al tubo con los islotes de Langerhans 1 mL de medio de extracción (70% ETOH y HCl 0,15 M, ver anexo soluciones) al tubo que contiene los islotes de Langerhans, dejándolos refrigerados en esta solución durante 7 días a 3°C. Todas las muestras restantes son conservadas a -20°C para su posterior cuantificación de insulina.

4. Protocolo 2: Se realiza el protocolo 1, esta vez cambiando la incubación de 3°C por una de 17°C.
5. Protocolo 3: Se realiza el protocolo 1, esta vez cambiando la incubación de 3°C por una de 27°C.
6. Protocolo 4: Se realiza el protocolo 1, eliminando el ión Ca^{2+} en la totalidad de las soluciones (Krebs modificado 1, ver anexo soluciones).
7. Protocolo 5: Se realiza el protocolo 1, esta vez sustituyendo el ión Na^+ por el ión Li^+ , en la totalidad de las soluciones (Krebs modificado 2, ver anexo soluciones).

Cada protocolo se realizó con islotes de Langerhans provenientes de diferentes animales. La secreción de insulina en condiciones de estímulo de glucosa basales, y el contenido de insulina extraída se utilizan para normalizar los experimentos.

8. Cuantificación de insulina: Las muestras contenidas en medio de extracción de insulina fueron diluidas en razón 1:500, con *buffer* fosfato (PBS) modificado, sin el ión Ca^{2+} ni Mg^{2+} . Esta dilución se realiza porque el alcohol y el pH ácido del medio de extracción interfieren con el *kit* ELISA, mientras que los iones bivalentes tienden a precipitar, lo cual interferiría posteriormente en la lectura de la absorbancia. El resto de las muestras se midieron sin diluir. La cuantificación de insulina se realizó mediante el *Kit* LINCO® Rat/Mouse Insulin

ELISA KIT 96-Well Plate (Cat. # EZRMI-13K), su medición en lector VERSAMax® Tunable Microplate Reader (Molecular Devices®) a 450 y 590 nm, y la obtención de valores mediante el programa computacional Softmax Pro 5.

Se expresan los resultados como porcentaje de insulina secretada, del total de insulina contenida en los islotes de Langerhans. Se entiende total de insulina contenida, como la suma entre la insulina contenida en el medio de extracción y la insulina secretada.

V) ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los valores obtenidos del programa computacional Softmax Pro 5 fueron graficados en una curva de calibración, y estos datos interpolados sobre la curva mediante el software Origin® 6.1 (OriginLab® Corporation). Los datos finales fueron expresados como el porcentaje de insulina secretada, del total de insulina contenida en los islotes de Langerhans. Se entiende total de insulina contenida, como la suma entre la insulina contenida en el medio de extracción y la insulina secretada. Estos datos fueron graficados y analizados estadísticamente (prueba T de Student y desviación estándar) mediante el programa Microsoft Excel® (Microsoft® Corporation).

VI) RESULTADOS

a. Secreción de insulina en Islotes de Langerhans incubados durante 20 minutos en solución fisiológica, a distintas temperaturas.

En condiciones de incubación con glucosa en concentración basal (1 g/L) y de estímulo de secreción (3 g/L), a distintas temperaturas (3°C, 17°C, 27°C y 37°C), no se observaron aumentos importantes en la secreción de insulina, excepto en el grupo de islotes de Langerhans incubados a 37°C, en donde un estímulo de 3 g/L de glucosa aumentó en casi 10 puntos porcentuales la secreción de insulina (Fig. 2) (* $p < 0,05$).

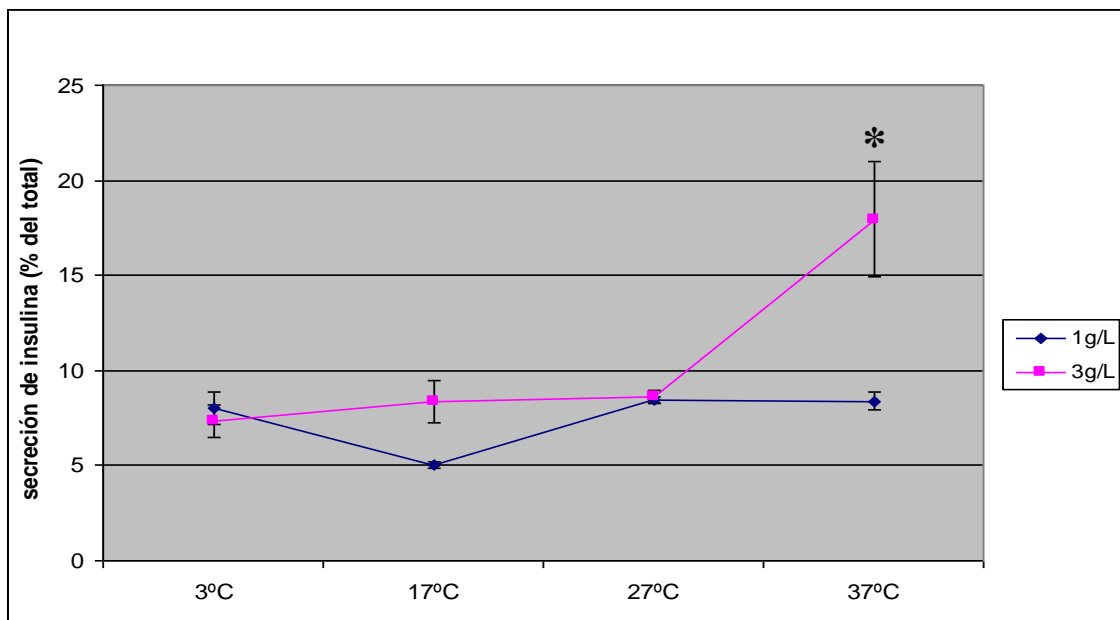


Fig. 2. Secreción de insulina en islotes de Langerhans de rata incubados a distintas temperaturas durante 20 minutos en condiciones fisiológicas con glucosa basal (1 g/L) y de estímulo de secreción (3g/L).

b. Secreción de insulina en Islotes de Langerhans incubados a 3°C y 37°C durante 20 minutos en solución con y sin ión Ca²⁺.

En la Figura 3 se observa una disminución en la secreción de insulina cuando los islotes de Langerhans son incubados en un medio carente del ión Ca²⁺. Este fenómeno se presenta aún cuando la concentración de glucosa en el medio es de 3 g/L, independiente de la temperatura de incubación: 3°C (** $p < 0,01$); 37°C (** $p < 0,001$). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos incubados sin Ca²⁺ con 1 g/L de glucosa, y aquel incubado en presencia de Ca²⁺ y 1g/L de glucosa.

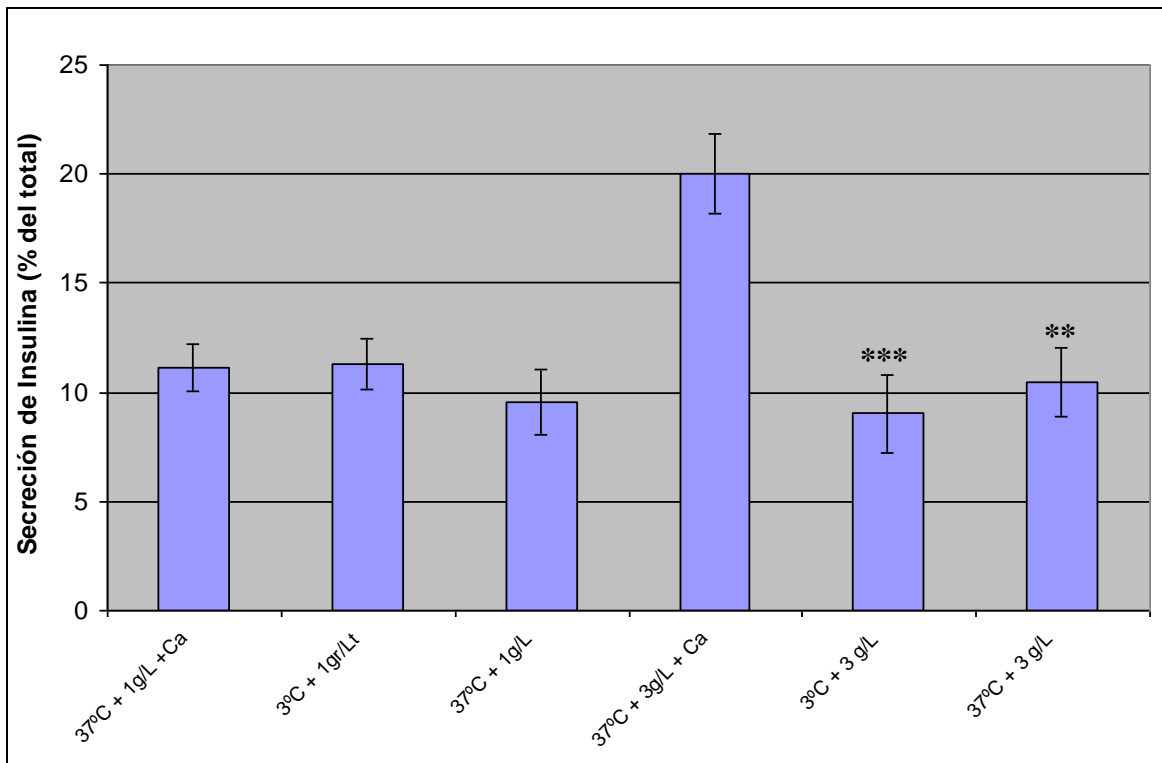


Fig. 3. Secreción de insulina en islotes de Langerhans incubados durante 20 minutos en solución con y sin ión Ca²⁺, con glucosa basal (1 g/L) y estímulo de glucosa (3g/L).

c. Secreción de insulina en Islotes de Langerhans incubados durante 20 minutos a 3°C y 37°C en solución sin Na⁺, sustituido por Li⁺.

En la Figura 4 se observa que los islotes de Langerhans incubados a 37°C y con una concentración de glucosa de 3 g/L respondieron secretando el doble de insulina, respecto al grupo que fue estimulado con glucosa basal (1 g/L) a 37°C (** $p < 0.01$). La secreción de insulina en el grupo sometido a una incubación con estímulo de 3 g/L de glucosa y una temperatura de 3°C fue 3 veces mayor que la obtenida en el grupo sometido a 1 g/L de glucosa y 3°C de temperatura (***) $p < 0,001$).

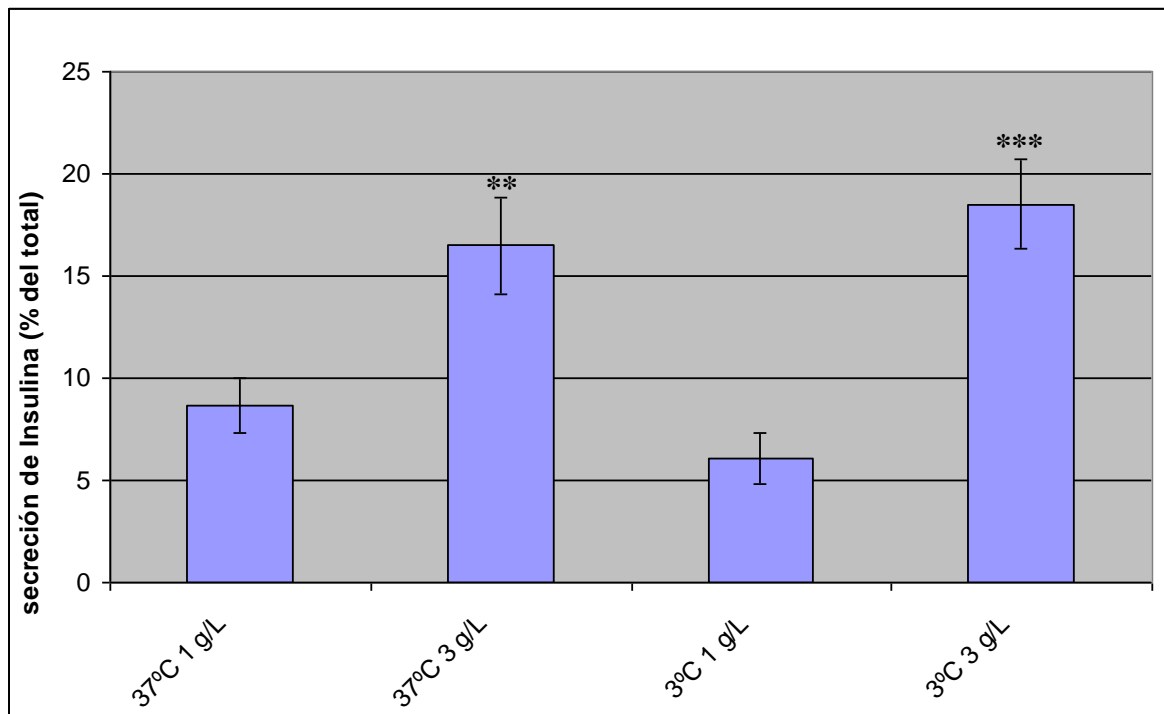


Fig. 4. Secreción de insulina en Islotes de Langerhans incubados durante 20 minutos a 3°C y 37°C en solución de Na⁺ sustituido por Li⁺, con glucosa basal (1 g/L) y estímulo de glucosa (3g/L).

VII) DISCUSIÓN

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 existe un aumento de casi 10 puntos porcentuales en la secreción de insulina, al estimular los islotes de Langerhans con glucosa en una concentración de 3 g/L. Esta es una reacción fisiológica normal, que da cuenta de la funcionalidad y viabilidad de las células beta (β) (Haro-Hernández y Méndez, 2002) utilizados en estos experimentos. Cuando la temperatura de incubación fue de 17°C y 27°C, no se observó respuesta de secreción inducida ya sea por frío o por niveles de glucosa elevada. De esta forma, se da cuenta de que la secreción de insulina estimulada por glucosa es muy sensible a la temperatura. Por otra parte, en el experimento de incubación de islotes de Langerhans a 3°C, se observó secreción basal de insulina independientemente a la concentración de glucosa en el medio, 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 más violento. Hoy se conoce que el frío (17°C y 27°C) depolariza la membrana celular, lo cual activaría los canales de Ca^{2+} 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 Ca^{2+} intracelular en células beta (β) expuestas a bajas temperaturas.

En lo concerniente a la secreción basal de insulina, ésta no mostró diferencias entre las distintas temperaturas de incubación a que fueron sometidos los islotes de Langerhans. La secreción basal de insulina es un proceso de exocitosis. Sin embargo, sus mecanismos de regulación aún se desconocen. De todas formas, y a la luz de esta memoria de título, se puede decir que este proceso no es sensible a la temperatura. Los experimentos donde se incubaron islotes de Langerhans en ausencia de Ca^{2+} y de Na^+ sustituido por Li^+ tampoco alteraron el mecanismo de secreción basal de insulina. Esta secreción basal existe, y no es un artefacto del proceso de aislamiento de islotes de Langerhans, ya que se registra una gran diferencia entre la secreción de insulina basal y de estímulo con glucosa (3 g/L) a 37°C , prueba de que los islotes utilizados en esta experiencia son funcionales.

La ausencia de Ca^{2+} en el medio de incubación inhibe casi completamente el efecto estimulador de una alta concentración de glucosa (3 g/L), disminuyéndola a un nivel de secreción de insulina basal, independiente de la temperatura de incubación. Esta inhibición es explicada por el crítico rol que juega el ión Ca^{2+} en la secreción de insulina. Cuando la concentración de glucosa extracelular es elevada, su rápida entrada a la célula y consiguiente degradación metabólica resulta en una relación ATP/ADP citoplasmática elevada. Esto conlleva

al cierre de los canales K_{ATP} , depolarización de membrana, apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, un incremento en la concentración citoplasmática de Ca^{2+} , y finalmente, la exocitosis de los gránulos secretorios contenedores de insulina (Atwater *et al.*, 1996; Rorsman *et al.*, 2000; Mears, 2004). Al no existir Ca^{2+} en el medio de incubación, este mecanismo acaba en la apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, pero en ausencia del catión, no existe el estímulo para la exocitosis de los gránulos de insulina.

El grupo incubado con presencia del ión Ca^{2+} (solución fisiológica) da cuenta de la viabilidad y funcionalidad de los islotes de Langerhans utilizados en estos experimentos.

Al evaluar la actividad secretora de islotes de Langerhans de rata incubados en ausencia de Na^+ extracelular, sustituido por Li^+ a $37^{\circ}C$, con estímulo de glucosa (3 g/L), estos respondieron secretando el doble de insulina, respecto al grupo que fue estimulado con glucosa basal (1 g/L) a $37^{\circ}C$. Por otra parte, al incubar a $3^{\circ}C$, se observó secreción basal de insulina con glucosa en concentración de 1 g/L, mientras que al estímulo de glucosa (3 g/L) los islotes de Langerhans respondieron triplicando la secreción basal de insulina. Se podría pensar que este proceso a $3^{\circ}C$ sea mediado por un mecanismo distinto que a $37^{\circ}C$. Sin embargo, estas dos respuestas tan similares sugieren que el proceso sería el mismo. Se conoce que el Li^+ produce un aumento en los niveles intracelulares de inositol trifosfato (IP_3) e inositol tetrafosfato (IP_4) (Sekar y Hokin, 1986), ambos relacionados con la liberación de Ca^{2+} desde reservorios intracelulares, como lo es

el retículo endoplasmático. Además, estos segundos mensajeros aumentan la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana celular. Este incremento citoplasmático del catión resulta en un estímulo secretorio de insulina en la célula beta (β). Aún así, es probable que la membrana celular ya esté depolarizada a 3°C , por lo que ciertamente, es necesario realizar nuevos experimentos conducentes a dilucidar este hallazgo. Por ejemplo, evaluar la actividad eléctrica de membrana a 3°C , y la secreción de insulina en ausencia de Na^{+} sustituido por Li^{+} , en presencia y ausencia de Ca^{2+} , a 3°C .

De igual modo, se requieren futuros experimentos donde se sustituya Na^{+} por otras moléculas para aclarar si este fenómeno es producido ya sea por la ausencia de Na^{+} , por la presencia de Li^{+} , o por ambas condiciones. Además, es interesante estudiar tal efecto a diferentes temperaturas, entre 3°C y 37°C .

Existen otras consideraciones relevantes en la realización de esta memoria de título, que se discuten a continuación.

Uno de los factores determinantes en el éxito del aislamiento de los islotes pancreáticos es la solución enzimática empleada. En la presente memoria se utilizó 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 esto, siempre es necesario

comparar los resultados con una prueba de estímulo de glucosa a 37°C, para comprobar que los islotes utilizados no han sido dañados por la colagenasa.

Por otra parte, la extrema variabilidad entre los diferentes lotes de colagenasa hace que sea necesario variar los tiempos de exposición a la enzima en función de la cantidad y calidad del páncreas. Esta práctica permitió mejorar mucho el rendimiento del número de islotes de Langerhans aislados, del mismo modo que se logró recuperar páncreas a priori “subóptimos” con muy buenos resultados. Muchos investigadores han tratado de estandarizar el proceso de aislamiento de islotes de Langerhans. Sin embargo, por las razones anteriormente descritas, ha resultado imposible, incluso utilizando Liberasa, una combinación de proteasas de gran pureza, potencia y especificidad, con un costo considerablemente mayor al de la colagenasa. En síntesis, el proceso de aislamiento de islotes de Langerhans es muy costoso y poco confiable, por lo que es necesario siempre referir los resultados a un control para cada preparación.

VIII) CONCLUSION

- La secreción de insulina estimulada por glucosa es muy sensible a la temperatura, aumentando significativamente sobre el nivel basal en islotes de Langerhans incubados con 3 g/L de glucosa a 37°C, no observándose tal efecto, en esta experiencia, al incubar a 3°C, 17°C y 27°C.
- La secreción basal de insulina es insensible a la temperatura, pero sus mecanismos de regulación aún se desconocen.
- El Ca^{2+} es un agente importante en la secreción de insulina, puesto que su ausencia inhibe casi completamente el efecto estimulador de una alta concentración de glucosa (3 g/L) independiente de la temperatura de incubación, disminuyéndola a un nivel de secreción basal de insulina.
- El Li^+ , en ausencia de Na^+ , restaura la sensibilidad de secreción de insulina estimulada por glucosa a 3°C.

- La presencia de Na^+ no es indispensable en el mecanismo de secreción de insulina a 3°C y 37°C .
- Es necesario que se realicen nuevos experimentos conducentes a dilucidar el mecanismo por el cual el Li^+ y/o la ausencia de Na^+ estimularía la secreción de insulina a bajas temperaturas.
- El proceso de aislamiento de islotes de Langerhans es muy costoso y poco confiable, por lo que es necesario siempre referir los resultados a un control para cada preparación.

IX) BIBLIOGRAFIA

1. **ADAMEC M.** 2003. Transplantation of the pancreas. *Cas. Lek. Cesk.* 142 (12): 4133-4200.
2. **ANDERSSON A, KORSGREN O, JANSSON L.** 1989. Intraportally transplanted pancreatic islets revascularized from hepatic arterial system. *Diabetes* 38 [Suppl 1]:192–195
3. **ASHCROFT F, RORSMAN P.** 1989. Electrophysiology of the pancreatic β -cell. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 54:87-143.
4. **ATWATER I, DAWSON C, EDDLESTONE G, ROJAS E.** 1981. Voltage noise measurements across the pancreatic β cell membrane: calcium channel characteristics. *J. Physiol.(Lond.)*, 314: 195 212.
5. **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.
6. **ATWATER I, MEARS D, ROJAS E.** 1996. Electrophysiology of the pancreatic β -cell. *Diabetes Mellitus - A Fundamental and Clinical Text.* LeRoith, D., Taylor, S.I., Olefsky, J.M. Eds. Lippencott-Raven, Philadelphia,

pp 25-40.

7. **BALIBREA DEL CASTILLO J, VARA E, ARIAS J, GARCÍA M, GARCÍA J, BALIBREA J.** 2007. Estado actual del trasplante de islotes pancreáticos. *Cir. Esp.* 81(4): 177-191.
8. **BARBOSA R, SILVA A, TOME R, STAMFORD J, SANTOS R, ROSARIO L.** 1998. Control of pulsatile 5-HT/insulin secretion from single mouse pancreatic islets by intracellular calcium dynamics. *J. Physiol. (Lond.)* 510:135-143.
9. **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.
10. **BEAUGE L.** 1978. Activation by lithium ions of the inside sodium sites in (Na⁺K⁺) ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta.* 527:472-484.
11. **CARLSSON P, ANDERSSON A, CARLSSON C, HELLERSTROM C, HOGLUND E, KING A, KALLSKOG O, LISS P, MATTSSON G, OLSSON R, PALM F, SANDLER S, TYRBERG B, JANSSON L.** 2000. Engraftment and growth of transplanted pancreatic islets. *Ups. J. Med. Sci.* 105:107-123.

12. **DAHL G, HENQUIN J.** 1978. Cold-induced insulin release in vitro: evidence for exocytosis. *Cell Tissue Res.* Dec 12; 194 (3): 387-398
13. **DEL ROIO LIBERATORE R, DAMIANI D.** 2006. Insulin Pump Therapy in Type 1 Diabetes Mellitus. *J. Pediatr (Rio J).* 82(4):249-54.
14. **EINHORN D.** 2004. Advances in Diabetes for the Millennium: Insulin Treatment and Glucose Monitoring. *MedGenMed.* 6(3 Suppl): 8.
15. **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.* Apr; 125(1):45-51.
16. **FELDMAN L.** 2003. Oxidative stress and diabetic neuropathy, a new understanding of an old problem. *J. Clin. Invest.* 3: 431-433.
17. **GARCÍA DE LOS RÍOS M.** 2003. Clasificación, Diagnóstico y Pesquisa de la Diabetes Mellitus, Epidemiología de la Diabetes Mellitus. In: Diabetes Mellitus. 2ª ed. Fundación de Investigación y perfeccionamiento médico. Santiago, Chile. pp. 23-41.
18. **GARTNER L, HIATT J.** 2002. Texto Atlas de Histología. Edit. McGraw-Hill Internamerica. México. 2º edición. 397-402.

19. **GENESER F.** 2003. Histología. Edit. Médica Panamericana S.A. 3º edición. España. Capítulo 18, 551-618.
20. **GUYTON A, HALL J.** 1996. Insulina, Glucagón y Diabetes Mellitus. In: Tratado de Fisiología Médica. 9º ed. McGraw-Hill Interamericana, España, pp. 1063-1069.
21. **HARO-HERNANDEZ R, MENDEZ J.** 2002. Neogénesis y regeneración de las células beta pancreáticas. Gaceta Médica de México 138(6): 557-564.
22. **HOLLANDER P.** 2007. Evolution of a Pulmonary Insulin Delivery System (*Exubera*) for Patients With Diabetes. Med. Gen. Med. 9(1): 45.
23. **JANSSON L, CARLSSON P.** 2002. Graft vascular function after transplantation of pancreatic islets. Diabetologia 45:749–763.
24. **KANDASWAMY R, SUTHERLAND D.** 2006. Pancreas Versus Islet Transplantation in Diabetes Mellitus: How to Allocate Deceased Donor Pancreata?. Transplantation Proceedings. 38: 365-367.
25. **KANETO H, KAJIMOTO Y, MIYAGAWA J, MATSUOKA T, FUJITANI Y, UYAHARA Y, HANAFUSA T, MATSUZAWA Y, YAMASAKI Y, HORI M.** 1999. Beneficial effect of antioxidants in Diabetes: possible protection of pancreatic β cells against glucose toxicity. Diabetes. 48 (12): 2398-2406.

26. **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.
27. **MEARS D.** 2004. Regulation of insulin secretion in islets of Langerhans by Ca^{2+} channels. *J Membr Biol.* Jul 15;200(2):57-66.
28. **MENGER M, JÄGER S, WALTER P, FEIFEL G, HAMMERSEN F, MESSMER K.** 1989. Angiogenesis and hemodynamics of microvasculature of transplanted islets of Langerhans. *Diabetes* 38 [Suppl 1]:199–202
29. **NIELSEN J, SVENSSON C, DOUGLAS E, MOLDRUP A, BILLESTRUP N.** 1999. Beta cell proliferation and growth factors. *J. Mol. Med.* 77: 62-66.
30. **OWENS D, ZINMAN B, BOLLI G.** 2003. Alternative routes of insulin delivery. *Diabet. Med.* 20:886–898.
31. **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.

32. **RORSMAN P, ELIASSON L, RENSTRÖM E, GROMADA J, BARG S, GÖPEL S.** 2000. The cell physiology of biphasic insulin secretion. *News Physiol. Sci.* 15:72-77.
33. **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.
34. **RUSO L.** 1999. Transplante de páncreas. Historia y evolución de las ideas. *Revista del Hospital Maciel.* 4: 16-21.
35. **RYAN E, PATY B, SENIOR P, BIGAM D, ALFADHLI E, KNETEMAN N, LAKEY J, SHAPIRO A.** 2005. Five-Year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes.* 54: 2060- 2069.
36. **SEKAR M, HOKIN L.** 1986. The role of phosphoinositides in signal transduction. *J. Membr. Biol.* 89:193-210.
37. **SRINIVASAN P, HUANG G, AMIEL S, HEATON N.** 2007. Islet Cell Transplantation. *Postgrad. Med. J.* 83: 224-229.
38. **SWIFT S, KIN T, MIRBOLOOKI M, WILSON R, LAKEY J.** 2006. Comparison of cooling systems during islet purification. *Cell Transplant.* 15 (2): 175-180.

X) ANEXOS

Soluciones:

Solución Krebs (ajustado a pH 7,4)

Componentes	g/L
NaCl	7,01
NaHCO ₃	2,1
KCl	0,373
CaCl ₂	0,27
MgCl ₂	0,47
D-glucosa	1
HEPES (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	2,3

Solución Krebs modificado 1 (sin ión Ca²⁺) (ajustado a pH 7,4)

Componentes	g/L
NaCl	7,01
NaHCO ₃	2,1
KCl	0,373
MgCl ₂	0,47
D-glucosa	1
HEPES (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	2,3

Solución Krebs modificado 2 (Na⁺ sustituido por Li⁺) (ajustado a pH 7,4)

Componentes	g/L
LiCl	7,01
Li ₂ CO ₃	2,1
KCl	0,373
CaCl ₂	0,27
MgCl ₂	0,47
D-glucosa	1
HEPES (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	2,3

Solución PBS modificado (sin ión Ca²⁺ ni Mg²⁺) (ajustado a pH 7,4)

Componentes	g/L
KCl	0,2
KH ₂ PO ₄	0,2
NaCl	8,0
Na ₂ HPO ₄	1,15

Solución de extracción de islotes de Langerhans

Componentes	mL
ETOH 70%	700
Agua destilada	300
HCl 1M	15

Protocolos:

Protocolo ELISA:

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

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 μ L de *buffer* de lavado diluido, cada vez. Remover el *buffer* de lavado de todos los pocillos invirtiendo la placa y golpeándola sobre una toalla de papel absorbente, sin dejar secar las placas antes del próximo paso.
3. Agregar 20 μ L de *buffer* de ensayo a los pocillos blanco y 10 μ L al resto de los pocillos.
4. Agregar en duplicado 10 μ L de Estándares de Insulina de Rata en orden de concentración ascendente en los pocillos correspondientes.
5. Agregar 10 μ L de QC1 y 10 μ L de QC2 a los pocillos correspondientes
6. Agregar secuencialmente 10 μ L de muestras desconocidas en duplicado a los pocillos restantes.
7. Agregar 80 μ L de anticuerpo de detección a todos los pocillos. Sellar la placa e incubar por 2 horas a temperatura ambiente en un agitador orbital de placas a una velocidad aproximada de 400 a 500 rpm.
8. Una vez finalizado el período 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 diluido (con 300 μ L para cada pocillo), por cada lavado. Remover el *buffer* de lavado de todos los pocillos

invirtiendo la placa y golpeándola sobre una toalla de papel absorbente, sin dejar secar las placas antes del próximo paso.

10. Agregar 100 μ L de solución de enzima a cada pocillo. Sellar la placa e incubar en el agitador orbital a una velocidad aproximada de entre 400 y 500 rpm.

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 μ L para cada pocillo, por cada lavado y remover el *buffer* residual.

13. Agregar 100 μ L de solución sustrato a cada pocillo, cubrir con el sello y llevar al agitador orbital por aproximadamente 15 minutos. 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 μ L de solución de detención 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.