



**Universidad de Chile**

Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias  
Escuela de Ciencias Veterinarias



**AISLAMIENTO DE ISLOTES PANCREÁTICOS DE  
COBAYO (*Cavia porcellus*) UTILIZANDO DOS  
PROTOCOLOS ESTÁNDAR**

**MARÍA BERNARDITA SILVA LEAL**

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

**PROFESORA GUÍA: Ph. D. ILLANI JEANNE ATWATER.**

**SANTIAGO, CHILE**

**2007**



Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias  
Escuela de Ciencias Veterinarias



**AISLAMIENTO DE ISLOTES PANCREÁTICOS DE  
COBAYO (*Cavia porcellus*) UTILIZANDO DOS  
PROTOCOLOS ESTÁNDAR**

**MARÍA BERNARDITA SILVA LEAL**

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

NOTA FINAL.....

NOTA

FIRMA

PROFESORA GUÍA	: ILLANI JEANNE ATWATER	.....	.....
Profesor Consejero	: BESSIE URQUIETA	.....	.....
Profesor Consejero	: EDUARDO KESSI	.....	.....

**SANTIAGO, CHILE**

2007

Dedicado a la memoria del Doctor Nelson Barria por sus consejos, apoyo, amistad y su permanente estímulo a pensar más allá de lo evidente.

*Quisiera agradecer a mi familia, amigas y amigos por su preocupación y permanente aliento para seguir adelante. A Franco por estar siempre cuando lo necesité y ser mi gran apoyo. A Illani por sus vastos conocimientos generosamente compartidos, su confianza y grata acogida. Agradezco también a David y todas las personas que integran el Laboratorio que colaboraron con su tiempo y conocimiento para desarrollar este proyecto y sin quienes se habría hecho más difícil el camino. Gracias a Dios por darme la opción de vivir y aprender.*

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
Índice de figuras y tablas	<i>vi</i>
Resumen	<i>vii</i>
Summary	<i>viii</i>
I. Introducción	1
II. Revisión Bibliográfica	2
III. Objetivos	4
3.1 Objetivo General	4
3.2 Objetivos Específicos	4
IV. Materiales y Métodos	5
4.1 Animales	5
4.2 Aislamiento de Islotes	5
4.2.1 Aislamiento de islotes por digestión enzimática	5
4.2.2 Aislamiento de islotes por microdisección	6
4.3 Estimación funcionalidad celular	7
4.3.1 Prueba de secreción de insulina	7
4.3.2 Contenido total de insulina	9
V. Resultados	9
5.1 Aislamiento de Islotes	9
5.1.1 Aislamiento de islotes por digestión enzimática	9
5.1.2 Aislamiento de islotes por microdisección	10
5.2 Estimación funcionalidad celular	10
5.2.1 Prueba de secreción de insulina	10
5.2.2 Contenido Total de Insulina	12
VI. Discusión	13
VII. Conclusión	17
VIII. Bibliografía	18

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
Figura 1. Sistema de Flujo Peristáltico	7
Figura 2. Placas de ELISA del <i>kit Mercodia Rat Insulin</i> (Alpco Diagnostics) Utilizadas para la determinación de la concentración de insulina.	8
Figura 3. Concentración de Insulina en Respuesta a Estimulo de Glucosa	11
Figura 4. Promedio Concentración de Insulina por Etapa Experimental	12
Tabla Nº1. Resultados Prueba de Extracción de Insulina en Islotes Microdisecados de <i>Cavia porcellus</i>	12
Figura 5. Canulación Conducto Biliar en Rata	13
Figura 6. Vista Caudal con Superficie Dorsal Arriba de Cavidad Abdominal en Cobayo y Rata	14

## RESUMEN

La Diabetes Mellitus (DM) es una de las enfermedades crónicas no transmisibles más frecuentes del ser humano a todas las edades y se considera un problema de salud pública por su elevada morbilidad y mortalidad. El principal objetivo del tratamiento de pacientes con Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) es la normalización de los niveles de glucosa sanguínea. El trasplante de islotes de Langerhans, como tratamiento experimental, es una técnica mínimamente invasiva con escasa morbilidad y nula mortalidad. Actualmente es posible afirmar que los islotes pancreáticos transplantados pueden por sí mismos tanto restablecer el control metabólico perdido como prevenir las complicaciones derivadas de la hiperglicemia mantenida. La mayor dificultad en este tratamiento es la incapacidad de obtener suficientes islotes viables desde un páncreas donado para revertir la DM1 en el receptor. El aislamiento de islotes es un proceso largo, complejo y costoso y depende fuertemente de la experiencia del grupo de trabajo. Durante este proceso muchos islotes se ven afectados por estrés oxidativo y posterior apoptosis. Más investigación en esta área es requerida. En este trabajo se aplicaron dos métodos estandar para el aislamiento de islotes pancreáticos de rata, microdissección y aislamiento enzimático, en un nuevo modelo animal: el cobayo (*Cavia porcellus*), que comparte con el ser humano la inhabilidad de sintetizar la vitamina C, molécula conocida por sus importantes propiedades antioxidantes. Además, se evaluó la funcionalidad de los islotes recién aislados, utilizando la prueba de secreción y contenido total de insulina. Se concluyó que el aislamiento de islotes de Langerhans por microdissección es un método posible de aplicar en el modelo animal de cobayo con propósitos de investigación, debido al limitado número de islotes que se pueden obtener manualmente. Entrega islotes de buena calidad y con un funcionamiento adecuado. La digestión enzimática, por su parte, es una metodología que requiere más estudio para lograr una aplicación sistemática y exitosa en el cobayo, dada la dificultad técnica para la obtención de islotes viables, aunque potencialmente esta última metodología entregaría una mayor cantidad de islotes.

## SUMMARY

Diabetes Mellitus is one of the most common non-infectious chronic diseases in people of all ages, and it is considered a public health problem because of its high morbidity and mortality. The principal objective of diabetes treatments is to normalize blood sugar levels. In type 1 Diabetes Mellitus (DM1), transplantation of islets of Langerhans is an effective treatment, minimally invasive, with low morbidity and nil mortality. It is now known that islet transplants not only restore metabolic control, but also prevent the complications arising from chronic hyperglycemia. The most important difficulty in this treatment is our inability to isolate sufficient viable islets from a donor pancreas to revert diabetes in the recipient. Islet isolation is a long, complex and costly process and depends heavily on the experience of the working team. During the process, many islets suffer from oxidative stress and later apoptosis. More research in this area is greatly needed. This study developed two methods of islet isolation, enzymatic digestion and micro dissection, from the pancreas of guinea pig (*Cavia porcellus*) a new animal model that shares with the human being the incapacity to synthesize vitamin C, a well-known molecule because of its strong anti-oxidant properties. Moreover the function of the isolated islets was studied by measuring insulin secretion in response to glucose and insulin content. It was concluded that micro dissection is a feasible method for isolating islets of Langerhans from the guinea pig pancreas for research purposes, yielding islets of good quality with normal function, although only a limited number of islets can be obtained. On the other hand, enzymatic digestion is a methodology that requires more study in order to be systematically successful in the guinea pig to obtain viable islets, although this last methodology would yield a greater amount of islets.

## I. INTRODUCCIÓN

El principal objetivo del tratamiento de pacientes con Diabetes Mellitus (DM) tipo 1 es la normalización de los niveles de glucosa sanguínea. Dentro de los posibles tratamientos, el trasplante de islotes de Langerhans frente al trasplante de páncreas tiene como ventajas ser una técnica mínimamente invasiva, con escasísima morbilidad, nula mortalidad y un costo económico previsiblemente menor. Actualmente es posible afirmar que los islotes pancreáticos transplantados pueden por sí mismos tanto restablecer el control metabólico perdido como prevenir las complicaciones derivadas de la hiperglicemia mantenida, considerada una de las principales causas de daño en diversos tejidos de los pacientes afectados por DM. Para llevar a cabo el aislamiento de islotes pancreáticos es necesario aislar únicamente el componente endocrino del páncreas donado, minimizando la cantidad de tejido exocrino y de soporte en la solución final que será introducida al receptor. Este proceso a nivel clínico es realizado mediante un método semi-automático en tanto que a nivel de investigación se desarrolla con más frecuencia una metodología manual, conservando básicamente las mismas etapas en ambos procedimientos. El aislamiento supone la pérdida entre el 30% y 100% de los islotes y los expone a un ambiente químico muy desfavorable, además de un continuo traumatismo ya que incluye una parte puramente mecánica. Este ambiente químico al que son expuestos los islotes en condiciones isquémicas calientes<sup>a</sup> genera una grave consecuencia como es la producción de radicales libres, los que se asocian a la inducción de apoptosis y muerte celular, lo cual ocasiona una disminución del número de islotes viables para ser usados en el trasplante. En el presente trabajo se aplicaron dos protocolos estándares de rata utilizados para el aislamiento de islotes de Langerhans en un nuevo modelo animal, el cobayo (*Cavia porcellus*) atendiendo la incapacidad de este animal para sintetizar ácido ascórbico, cualidad que es compartida con el ser humano y que permite proyectarlo como un modelo animal que en futuras investigaciones entregará resultados altamente extrapolables que aporten a optimizar el

---

<sup>a</sup> Condición deficiente de irrigación sanguínea a 37°C.

aislamiento de islotes en el ser humano. También se aplicaron pruebas de secreción y contenido total de insulina para evaluar la funcionalidad celular de los islotes aislados.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La Diabetes Mellitus es una de las enfermedades crónicas no transmisibles más frecuentes del ser humano a todas las edades y se considera un problema de salud pública por su elevada morbilidad y mortalidad (García de los Ríos y Durruty, 2003). Se estima que afecta a 135 millones de personas en el mundo entero (Kendall *et al*, 2001) y al menos a 9 millones de individuos en América del Sur (Barceló *et al*, 2003), equivalente a más del 5% de la población adulta (Kendall *et al*, 2001). La situación en Chile los últimos 15 años, según estudios realizados por García de los Ríos y Durruty, muestra un incremento sostenido en la incidencia desde un valor promedio de 2,5/100.000 habitantes/año en el período 1987-1992 a cifras cercanas al 4,5/100.000 en los años 1994-2000. Así también los costos directos e indirectos relacionados con la enfermedad en nuestro país alcanzan los US\$294 millones incluyendo desde medicamentos hasta ingresos no percibidos como consecuencia de la mortalidad prematura y a la discapacidad atribuidas a la DM (Barceló *et al*, 2003).

La Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) afecta principalmente gente joven menor de 20 años de edad (Gartner y Hiatt, 2002) y se caracteriza por la destrucción autoinmune del 80-90% 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 los niveles de glucosa sanguínea, una disminución en su producción desencadena estados crónicos de hiperglicemia lo que genera estrés oxidativo sobre las células y daño en diversos tejidos (Kaneto *et al*, 1999). Aunque el trasplante de páncreas completo puede restablecer la homeostasis de la glucosa, los pacientes que reciben el órgano mantienen una alta morbilidad, requieren permanente inmunosupresión y una vigilancia estricta que permita un

diagnóstico temprano de rechazo, lo que hace que este procedimiento no constituya la mejor alternativa de tratamiento (Adamec, 2003). Sin embargo, el trasplante de islotes de Langerhans es una alternativa menos invasiva que el trasplante de órgano completo (Kendall *et al*, 2001) y con un menor índice de morbilidad (Sutherland *et al*, 2004) constituyendo un promisorio y razonable método alternativo para restaurar la normoglicemia (Kendall *et al*, 2001; Papas *et al*, 2001; Ryan *et al*, 2002), aliviar las complicaciones a largo plazo de la DM (Kendall *et al*, 2001; Papas *et al*, 2001), y otorgar una independencia de los tratamientos suplementarios de insulina. Actualmente se están poniendo en marcha estudios comparativos entre el trasplante de islotes pancreáticos y la insulino terapia intensiva con vista a establecer la verdadera valía de este procedimiento para establecerlo como primera alternativa terapéutica en la DM1 (Balibrea *et al*, 2007). La reciente introducción de terapias inmunosupresoras libres de glucocorticoides y el mejoramiento de los métodos de aislamiento de islotes han aumentado sustancialmente el éxito de este procedimiento (Shapiro *et al*, 2001). No obstante, la generalización del trasplante de islotes todavía debe superar varios problemas entre ellos los que mejorarían la desproporción entre el número de posibles donantes y el número de receptores que hoy alcanza 10:1, el número de islotes viables obtenidos de cada páncreas donado y la superación de los problemas inmunitarios (Balibrea *et al*, 2007).

A partir de los primeros protocolos publicados para aislamiento de islotes pancreáticos de rata establecidos en 1976 por Shibata y colaboradores se han desarrollado una serie de modificaciones dependiendo del laboratorio en que se aplique y según los requerimientos de la investigación. Habitualmente en el desarrollo de los distintos estudios se ha utilizado la rata Sprague-Dawley como modelo animal dada su fácil adquisición y manejo, sin embargo, el cobayo pelo corto americano (*Cavia porcellus*) representa un interesante nuevo modelo ya que, además de poseer las anteriormente mencionadas características de la rata, comparte con el ser humano la incapacidad de sintetizar ácido ascórbico y por ende, una dependencia total de la ingesta dietaria (Biopsicología, 2007). El ácido ascórbico es una molécula ampliamente reconocida por su acción antioxidante y

considerando que durante el aislamiento de islotes de Langerhans las células  $\beta$  se encuentran bajo profundos cambios de estructura y función que resultan en la producción de radicales libres y apoptosis (Rosenberger *et al*, 1999) más los diversos reportes que señalan la particular sensibilidad de estas células frente al estrés oxidativo (Lapidot *et al*, 2002), es posible proyectar el uso del cobayo como modelo animal en nuevas líneas de investigación enfocadas en esta área y con importantes extrapolaciones hacia el ser humano, permitiendo avanzar en el desarrollo de procesos que optimicen el número y la viabilidad de los islotes de Langerhans aislados.

### **III. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GENERAL**

Aislar islotes de Langerhans desde páncreas de cobayo utilizando dos protocolos estándar y posterior estimación de su funcionalidad celular.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Aplicar dos metodologías estándar de aislamiento de islotes de Langerhans: aislamiento por digestión enzimática y aislamiento por microdissección.
2. Aplicar pruebas de secreción y contenido total de insulina como estimador de funcionalidad celular de los islotes de Langerhans aislados.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

**4.1 Animales:** Se utilizaron 8 cobayos americano pelo corto (*Cavia porcellus*) machos entre 350-600 g de peso (Bioterio Central U. de Chile, Instituto Salud Pública). Fueron distribuidos en 2 grupos iguales destinados a cada método de aislamiento de islotes.

### 4.2 Aislamiento de islotes

**4.2.1 Aislamiento de islotes por digestión enzimática:** Los cobayos fueron anestesiados vía intramuscular con una solución de ketamina 150 mg/kg, xilacina 30mg/kg y acepromacina 5 mg/kg. Se rasuró y desinfectó con alcohol yodado toda la zona ventral de cavidad torácica y abdominal. Se realizó un abordaje ventral con exposición completa de la cavidad abdominal. No fue posible identificar macroscópicamente el conducto biliar común, el que según el protocolo para aislamiento de islotes en rata, debe ser canulado utilizando mini sondas especialmente diseñadas y que permite inyectar la solución de Colagenasa V (SIGMA) 0,2% para iniciar la digestión enzimática. Considerando esta particularidad se extrajo el páncreas completo y luego los animales fueron sacrificados con una sobredosis intracardiaca de solución de tiopental sódico al 2,5%. El páncreas fue inoculado con múltiples dosis de solución de Colagenasa V al 0,2%, luego fue colocado en un vaso precipitado de vidrio y fue cortado finamente con tijeras. Posteriormente se trasladó todo el contenido hacia un tubo Falcon® de 15 ml que se llenó con la misma solución de Colagensa V 0,2% hasta completar los 10 ml. Seguidamente fue colocado el tubo en baño de agua a 37°C por 10-20 minutos, con agitación manual moderada cada 5 minutos. Se detuvo la actividad enzimática con *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) a 4°C adicionado con 2% de albúmina bovina. Se centrifugó por 1 minuto a 245g. Se recolectó el material sólido obtenido (*pellet*) y fue colocado en una gradiente de densidad discontinua con Histopak 1077

(SIGMA) y HBSS. Se centrifugó por 15 minutos a 627g y se recolectaron los islotes desde la interfase. Se distribuyó la masa de islotes obtenidos por gradiente en placas Petri de 10 ml con medio RPMI 1640 suplementado con 7% de Suero Fetal Bovino y 7% de Suero Equino (GibcoBRL), solución estándar antibiótico-antimicótico (GibcoBRL) y fueron observados bajo lupa óptica (Wild Heerbwgg) con aumento 25x y con iluminación externa para contabilizar el número de islotes obtenidos, evaluar su densidad y forma, además de la limpieza del preparado. Luego se cultivaron por 24 horas bajo una atmósfera con 5% CO<sub>2</sub> , 95% O<sub>2</sub> y a 37°C, previo a las pruebas de funcionalidad celular. Este período de cultivo se estima necesario para entregar un “reposo” a los islotes con el fin de que puedan normalizar su metabolismo luego del proceso de aislamiento.

**4.2.2 Aislamiento de islotes por microdissección:** Se utilizó el mismo protocolo quirúrgico descrito anteriormente. Una vez extraído el páncreas fue colocado inmediatamente dentro de una placa Petri de 10 ml con HBSS a 4°C. Luego el órgano se trasladó a una placa Petri de 5 ml con cera de abeja teñida negra y endurecida, de manera tal que funcionó como sostenedor del órgano y permitió su extensión y fijación con alfileres, a fin de lograr la máxima exposición de superficie que permitió visualizar los islotes. Se observó el páncreas bajo lupa (Wild Heerbwgg) con aumento 25x e iluminación externa para identificar visualmente los islotes. Estos fueron extraídos mediante el corte y remoción de la mayor parte del tejido exocrino y ductal circundante, se dejó un remanente que permitió tomar los islotes con las pinzas. Se utilizó material quirúrgico oftalmológico (de pequeño calibre). Los islotes obtenidos fueron colocados en una solución Krebs Modificado (sin aminoácidos) con bajo contenido de glucosa (0,5 g/l) y suplementado con 1% de albúmina bovina ultrapurificada (KMBGA) previo a las pruebas de funcionalidad celular.

### 4.3 Estimación funcionalidad celular

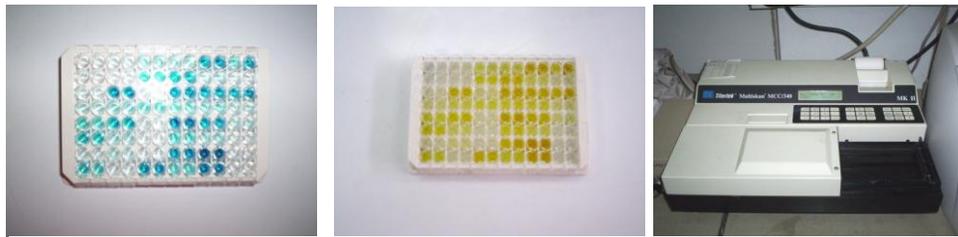
**4.3.1 Prueba de secreción de insulina:** Transcurridas las 24 horas de cultivo de los islotes aislados enzimáticamente no se encontraron islotes para desarrollar la prueba. Por otra parte, los islotes obtenidos por microdissección desde el páncreas recién extirpado se distribuyeron en un sistema de flujo peristáltico (fig.1) compuesto por 2 baños de agua, una bomba peristáltica conectada a un sistema de mangueras con 4 cámaras que contenían papel filtro como sujetador para los islotes y una cubeta con una gradilla en su interior que sostenía 40 tubos Falcon®.



**Figura 1, Sistema de Flujo Peristáltico.** Utilizado para la prueba de secreción de insulina frente a estímulo por alta glucosa 3g/l. El sistema está compuesto por 2 baños, una bomba peristáltica conectada a un sistema de mangueras con 4 cámaras que contenían papel filtro como sujetador para los islotes y una cubeta con una gradilla en su interior que sostiene 40 tubos Falcon® de 15 ml. El primer baño está a 40°C y tiene en su interior la botella con la solución que se utilizó para perfundir los islotes. Esta solución fue sacada por la bomba peristáltica y expulsada hacia las cámaras que sostienen en su interior a los islotes, ubicadas en el segundo baño a 37°C. Finalmente la solución viaja hasta los tubos Falcon® ubicados en la cubeta rodeados por hielo y bloques de refrigeración donde se colectaron las muestras a 7°C.

El primer baño estaba a 40°C y tenía en su interior una botella de vidrio con solución Krebs Modificado (sin aminoácidos) con bajo contenido de glucosa (0,5 g/l) suplementado con 1% de albúmina bovina ultrapurificada

(KMBGA). La solución fue sacada por la bomba peristáltica, con una velocidad de flujo regulable, y posteriormente expulsada hacia las cámaras que sostienen en promedio 7 islotes. Estos se encontraban en el segundo baño a 37°C. Esta etapa tuvo una duración de 60 minutos y se denomina “Período de Incubación”. Luego los islotes recibieron durante 15 minutos la misma solución a la misma temperatura, iniciando la colección de las muestras en los tubos con un intervalo de 5 minutos. Seguidamente se utilizó una solución Krebs Modificado con alta concentración de glucosa (3 g/l) suplementado con 1% de albúmina ultrapurificada (KMAGA) por 20 minutos a 37°C y, finalmente, con KMBGA por 15 minutos. Para efectos de estudio y análisis cada cámara fue considerada como un experimento aislado. La cuantificación de insulina se realizó a través del *ELISA* (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) utilizando el *kit Mercodia Rat Insulin* de ALPCO Diagnostics, por duplicado cada muestra. El ensayo se desarrolló según el protocolo recomendado por el fabricante. Se puede observar en la figura 2, de izquierda a derecha, la placa del *kit* al iniciar la etapa de incubación, con las muestras y la solución de trabajo en cada pocillo. Luego la misma placa finalizada la incubación y con la solución de frenado de la reacción ya incorporada. Por último el equipo lector de *ELISA*, modelo *Multiskan MCC/340 P* versión 2.33, donde fueron medidas las absorbancias de las muestras.



**Figura 2, Placas de ELISA del *kit Mercodia Rat Insulin* (ALPCO Diagnostics) Utilizadas para la determinación de la concentración de insulina.** De izquierda a derecha se observa la placa con las muestras y la solución de reacción al iniciar la etapa de incubación. Luego la misma placa finalizada la incubación y con la mezcla de frenado de reacción. Finalmentel se ve el equipo de lectura modelo *Multiskan MCC/340 P* versión 2.33 donde fueron analizadas las muestras.

**4.3.2 Contenido total de insulina:** Para los islotes obtenidos enzimáticamente no fue posible la aplicación de esta prueba, ya que no se encontraron dichas estructuras transcurridas las 24 horas de cultivo. En cambio, en los islotes obtenidos por microdissección, fue posible aplicar la mencionada técnica. Una vez finalizada la prueba de secreción de insulina, se extrajo el filtro de sujeción con los islotes desde el interior de las cámaras, los que fueron colocados en tubos Falcon® con 1 ml de solución de extracción de insulina (0,15 M HCl en alcohol etílico al 70%). Cada tubo permaneció refrigerado por 7 días a 4°C. Posteriormente, se obtuvo una alícuota de 120 µl y se diluyó a razón de 1:23,5 en KMBGA. La cuantificación de insulina se realizó a través de *ELISA* (ALPCO Diagnostics) *kit* utilizando los mismos reactivos y método que en las pruebas de secreción de insulina.

## V. RESULTADOS

### 5.1 Aislamiento de islotes

#### 5.1.1 Aislamiento de islotes por digestión enzimática.

La aplicación de esta etapa del protocolo de aislamiento de islotes presentó una importante diferencia en el cobayo respecto al de rata, dado que en el primero no fue posible identificar el conducto biliar común para la canulación e inyección de la solución enzimática. Esta etapa es considerada de gran importancia en el resultado final del método, en cuanto a su rendimiento: número de islotes que se obtiene desde un páncreas. Se aplicó un procedimiento alternativo consistente en múltiples inyecciones de solución enzimática directamente en el tejido pancreático. De esta manera, se obtuvo en promedio 1000 islotes a partir del procesamiento de un páncreas, de diversos tamaños y con forma conservada tipo esfera. Los islotes fueron

observados inmediatamente a través de lupa óptica (25x) aparentemente íntegros en su estructura, de aspecto blanquecino, levemente translúcidos y con una aparente granulación en su interior.

### **5.1.2 Aislamiento de islotes por microdissección.**

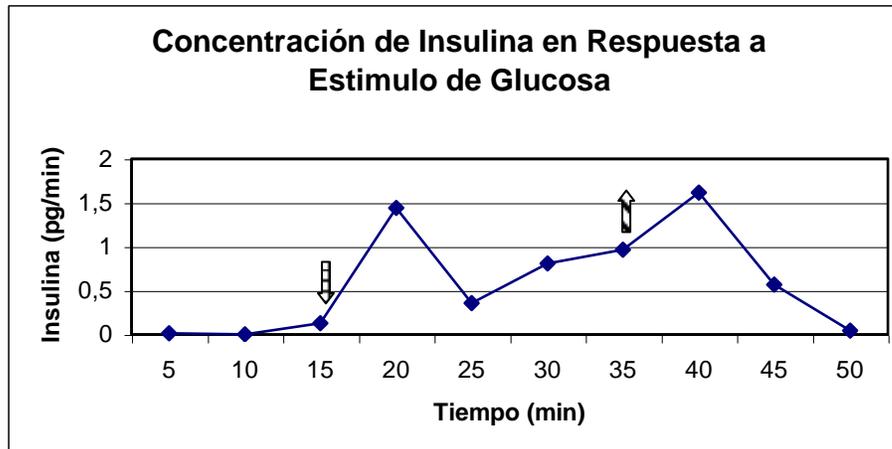
Se obtuvieron en promedio 30 islotes de tamaño mediano a grande y forma conservada tipo esfera por cada páncreas extraído. Los islotes se evaluaron como aparentemente íntegros en su estructura con pequeños restos de material exocrino adheridos a ellos y una coloración blanquecina opaca.

## **5.2 Estimación funcionalidad celular**

### **5.2.1 Prueba de secreción de insulina.**

Para los islotes obtenidos por digestión enzimática, en todos los ensayos, no fue posible realizar la prueba por las razones antes expuestas en Material y Método.

Para los islotes obtenidos por microdissección se logró determinar la existencia de respuesta celular frente a la aplicación de un estímulo de glucosa (3 g/l), en alta concentración, ejemplificada en la figura 3. Se pudo observar una secreción de insulina basal mientras los islotes eran mantenidos en concentraciones bajas de glucosa (0,5 g/l) y luego la secreción dinámica esperada con un alza en las concentraciones de insulina como respuesta al estímulo. Se observó la primera fase de secreción, caracterizada por un alza brusca en la concentración de insulina y luego una disminución de ésta. A continuación se observó la segunda fase, donde nuevamente aumentó la concentración de insulina. Una vez retirado el estímulo ocurrió una alza final para luego empezar una gradual disminución en la secreción.



**Figura 3. Concentración de insulina mostrando la respuesta dinámica frente a estímulo por alta glucosa.** Se observa una respuesta de secreción en 2 etapas. La primera inicia al minuto 15 con la aplicación del estímulo alta glucosa (3 g/l), logra un *peak* al minuto 20 y disminuye en el minuto 25, sin llegar a niveles basales. Luego se inicia la segunda etapa que alcanza su máximo en el minuto 40 y luego decae hasta alcanzar niveles similares al basal. (↓ = inicio estímulo con alta concentración de glucosa, ↑ = fin estímulo con alta concentración de glucosa)

Se obtuvieron los siguientes valores promedio de secreción de insulina:

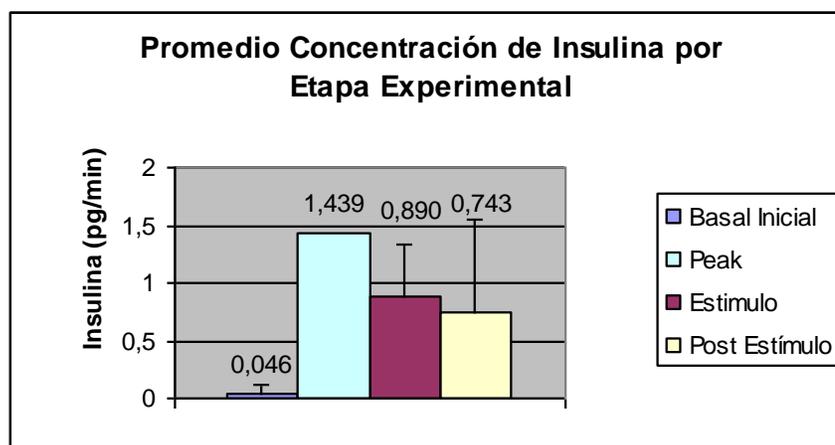
Etapa basal inicial (0-15 min) : 0,046 ± 0,07 pg/min.

Etapa estimulación (20-35 min) : 0,891 ± 0,44 pg/min.

*Peak* : 1,438 pg/min.

Etapa post estímulo (40-50 min) : 0,742 ± 0.81 pg/min.

La concentración promedio en etapa de estimulación (fig.4) alcanzó 20 veces el valor encontrado en la etapa basal inicial, con un *peak* 31 veces mayor que el nivel de secreción basal. Mientras, la etapa post estímulo logró una concentración promedio 16 veces superior a la medida en la etapa basal inicial. Hacia el final del experimento la concentración de insulina vuelve a valores similares a la etapa basal inicial. Normalmente el estímulo secretorio permanece por varios minutos en las células luego de retirada la solución con alta concentración de glucosa, liberando insulina de una manera fluctuante. Esta secreción se torna estable entre 20 a 60 minutos desde el retiro del estímulo y luego comienza a decaer hasta niveles similares a los encontrados en la etapa basal inicial.



**Figura 4, Concentración promedio de insulina por etapa experimental.** Se observa una diferencia de 20 veces entre la concentración promedio basal inicial y estimulado, con un *peak* superior en 31 veces a los niveles de secreción basal inicial. En la etapa post estimulo baja la concentración promedio de insulina a niveles 16 veces mayor que el valor en etapa basal. (T= desviación estandar).

### 5.2.2 Contenido total de insulina

Al no obtener islotes desde la preparación pancreática tratada con enzima no se pudo desarrollar esta prueba. Para los islotes obtenidos por microdissección se obtuvieron resultados variables en cada experimento, todos con valores totales de insulina por sobre el total secretado. En la tabla N°1 se detallan los resultados por experimento.

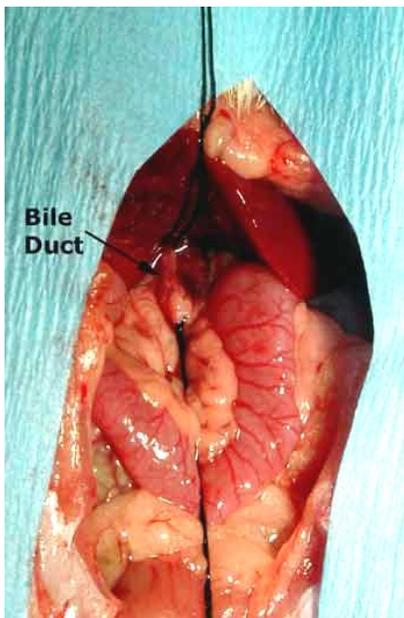
<b>TABLA N° 1. Resultados Prueba de Extracción de Insulina en Islotes Microdisecados de <i>Cavia porcellus</i>.</b>					
Ensayo	Insulina tota por experimento (pg)	Insulina total por islote (pg)	Promedio secreción insulina/minuto por experimento (pg/min)	Promedio secreción insulina/ minuto por islote(pg/min)	% secreción/ minuto por islote respecto al contenido total
1	17,46	2,49	0,50	0,06	0,024
2	18,99	2,37	0,19	0,02	0,008
3	2,71	0,38	0,06	0,01	0,025
4	5,21	0,74	0,42	0,06	0,081

En promedio el contenido total de insulina por experimento fue de 10,47pg. Cada islote secretó en promedio 0,034 % de su insulina total por minuto. Estos resultado permiten observar la correcta funcionalidad de los islotes obtenidos por microdissección.

## VI. DISCUSIÓN

El aislamiento de islotes de Langerhans a partir de la obtención de un páncreas es un proceso complejo, que puede durar al menos 6 horas y requiere una infraestructura importante y una alta especialización de los profesionales encargados (Balibrea *et al*, 2007). Los métodos manuales utilizados en este trabajo resultan de utilidad en el área de la investigación, donde no se requiere un alto número de islotes. La metodología de aislamiento enzimático permite obtener un mayor número de islotes por páncreas y logra aumentar el aprovechamiento del órgano en comparación con el método de microdissección. Sin embargo, existe la inquietud de la integridad estructural y funcional que resulta del primer proceso, ya que es conocido que la sobrexposición a la enzima genera daño a nivel estructural, lo que finalmente repercute en la calidad del preparado.

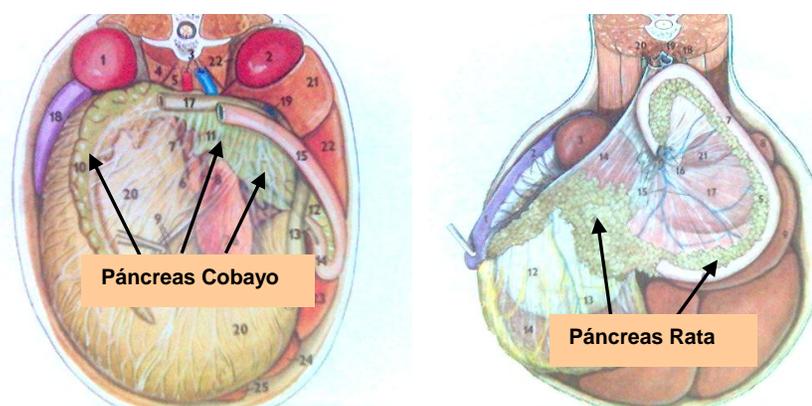
Existen diferencias anatómicas entre la rata y el cobayo, importantes desde el punto de vista de la aplicación del protocolo de aislamiento por digestión enzimática, que pueden ser parte de las causas que determinaron la incapacidad



**Figura 5. Canulación conducto biliar en rata.** Se realiza próximo al hilio hepático, con ligaduras colocadas previo a la canulación (Foley, 2005).

de aplicar exitosamente este protocolo en el cobayo. La digestión enzimática en páncreas de rata comienza por la canulación del conducto biliar (fig. 5), que va desde el hilio del hígado, a través del tejido pancreático hasta el duodeno, donde es rodeado por el esfínter muscular de Oddi. El conducto tiene un diámetro aproximado de 1 milímetro, es moderadamente translúcido (Foley, 2005) y a través de él se inocula la solución enzimática. En el cobayo no fue posible detectar macroscópicamente, ni a simple vista ni con lupa, el conducto biliar común. Al no poder ser detectado este conducto en el cobayo, el proceso de canulación no pudo ser realizado, por lo que la aplicación de la solución enzimática se debió hacer

mediante múltiples inyecciones directamente al tejido pancreático junto con su posterior reducción mediante cortes, para ayudar en la disociación de los tejidos. Estos hechos implican un alto grado de traumatismo para las distintas células pancreáticas de cobayo, lo que probablemente genera un mayor grado de necrosis e inicio de fenómenos apoptóticos, que finalmente van a diezmar el número de islotes obtenidos. Por otra parte, como se aprecia en la figura 6, existen también diferencias morfológicas entre páncreas de cobayo y rata, siendo en el cobayo un órgano más estructurado y con una disposición espacial más ramificada de las distintas estructuras en comparación con el de rata, lo que podría implicar una distribución más segmentada de la solución enzimática al ser inoculada directamente en el tejido y no a través del conducto biliar, por lo que algunos grupos de islotes probablemente no habrían recibido suficiente enzima para liberarse del tejido exocrino y habrían quedado retenidos en el *pellet* que no se incluye en la preparación final.



**Figura 6: Vista caudal con superficie dorsal arriba de cavidad abdominal en cobayo y rata (Popesko *et al*, 1992).** Se puede observar la diferencia morfológica entre ambos páncreas. El de cobayo posee una mayor estructuración y una disposición espacial aparentemente más organizada que el páncreas de rata, con características más difusas.

Se plantean múltiples interrogantes por el bajo rendimiento alcanzado en el cobayo en la aplicación del protocolo de aislamiento enzimático estandarizado para rata. Los islotes que se obtuvieron no alcanzaron a permanecer viables las 24 horas de cultivo, que habitualmente se aplican para entregar un “reposo” y una

”recuperación” metabólica de estas estructuras luego del procedimiento de aislamiento. No fue posible encontrar la causa exacta de esta “desintegración” de los islotes pero se sugieren fenómenos apoptóticos y necróticos asociados al proceso de disección del páncreas o a la interacción con algún componente del medio de cultivo. Para poder aplicar este protocolo, que tiene como ventajas el entregar un gran número de islotes, es necesario desarrollar más investigación a fin de determinar qué factores y con qué grado de importancia son los que están limitando su aplicación en el cobayo.

Por otra parte, a través de la microdisección es posible seleccionar los islotes de mayor tamaño sin generar un daño importante en su estructura, pero en un número limitado, ya que es un proceso lento y requiere alta especialización de quien lo realice (al igual que en la técnica anterior). Se debe dejar un remanente de tejido exocrino para su manipulación y es muy difícil el trabajo bajo condiciones de esterilidad ya que se requiere el uso de lupa o microscopio y placas destapadas por largos períodos de tiempo. Los islotes obtenidos presentan una estructura muy bien conservada y mantienen una buena funcionalidad.

La utilización del cobayo como modelo animal es de carácter novedoso, ya que por mucho tiempo fue descartado su uso en esta área de investigación porque la mayoría de los anticuerpos utilizados para la detección de insulina eran desarrollados en esta especie, debido a la alta sensibilidad que alcanzan. Sin embargo, el cobayo posee una característica muy interesante para ser utilizado como modelo experimental, ya que al igual que el ser humano carece de la capacidad de sintetizar vitamina C, la cual posee un conocido rol antioxidante.

Por otro lado, las técnicas aplicadas para determinar funcionalidad celular son de uso corriente en laboratorios especializados en el área de investigación con islotes pancreáticos, siendo considerada la medición del curso temporal de la secreción de insulina como una de las técnicas más difíciles de realizar, ya que se ve influenciada en sus resultados por múltiples factores de manipulación y ambientales, por lo que se requiere realizar numerosos ensayos para obtener claras conclusiones. El objetivo de estas pruebas es mostrar si las células aisladas mantienen su capacidad de secretar insulina en respuesta a condiciones de baja y

alta concentración de glucosa extracelular. Así, se puede observar si las células conservan su capacidad sensitiva de glucosa y reguladora de la secreción de insulina, lo que constituye una prueba de su correcta funcionalidad. Al entregar diferencias en los niveles de secreción de insulina mayores a cuatro veces entre la concentración basal inicial y estimulada, junto con que una vez retirado el estímulo las concentraciones de insulina vuelvan a niveles basales, la prueba está indicando un correcto funcionamiento de las células y que la liberación de insulina corresponde efectivamente a la secreción como respuesta frente al estímulo de alta concentración de glucosa extracelular y no a una liberación por daño celular. Las concentraciones de insulina obtenidas en la prueba de determinación de contenido total entregan concentraciones muy por sobre las detectadas en la prueba de secreción, por lo cual la insulina detectada en éste último método corresponde efectivamente a la liberada desde células beta y no al “vaciamiento” del contenido insulínico intracelular como consecuencia de destrucción de células beta. La correcta funcionalidad de los islotes se refleja cuando el porcentaje /minuto de secreción de insulina se encuentra entre 0.01 y 0.05. Es importante que continúen las líneas investigativas que persiguen la optimización del proceso de aislamiento de islotes, buscando nuevos factores que influyan de manera positiva y que permitan lograr importantes avances clínicos en la aplicación de este tratamiento que, por ahora, permanece en modo experimental.

## VII. CONCLUSIONES

1. El aislamiento manual de islotes de Langerhans por digestión enzimática y por microdissección son procesos largos, complejos y costosos, que en gran medida dependen del equipo y de la experiencia del personal de trabajo. En la actualidad, aún están orientados a ser utilizados en áreas de investigación, ya que es ahí donde se requiere un menor número de islotes.
2. El aislamiento enzimático en cobayo debe ser más estudiado ya que existen factores que por el momento no se han podido determinar y están limitando su utilización en esta especie.
3. El aislamiento por microdissección entrega islotes de buena calidad pero en número limitado y es posible demostrar la funcionalidad y viabilidad celular de los islotes pancreáticos aplicando pruebas de secreción y contenido de insulina.
4. El cobayo se presenta como buen modelo animal para estudiar ciertos aspectos de la fisiología de islotes en humanos, en el cual puede aplicarse el aislamiento por microdissección y las técnicas habitualmente utilizadas para probar viabilidad y funcionalidad celular.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

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

Balibrea JM, Vara E, Aria-Diaz J, García M, García-Perez J, Balibrea JL. Estado actual del trasplante de islotes pancreáticos. Cir. Esp. 81(4): 177-191. 2007.

Barceló A, Aedo CC, Rajpathak S, Robles S. The cost of Diabetes in Latin America and the Caribbean. Bull. World Health Organ. 81 (1): 19-28. 2003.

Biopsicología [en línea] <[http://www.biopsicologia.net/fichas/page\\_1080.html](http://www.biopsicologia.net/fichas/page_1080.html)> [consulta: 05 septiembre 2007].

Cretin N, Caulfield A, Fournier B, Buhler L, Becker C, Philippe J, Morel P. Insuline independence and normalization of oral glucose tolerance test after islet cell allotransplantation. Transpl. Int. 14(5):343-345. 2001.

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

Foley PL. Common Surgical Procedures in Rodents [en línea]. Editor Reuter J.D. y Suckow M.A., Laboratory Animal Medicine and Management. Ithaca: International Veterinary Information Service ([www.ivis.org](http://www.ivis.org)), 2005; Documento No.B2515.0605<<http://www.ivis.org/advances/Reuter/Foley/chapter.asp?LA=1>> [consulta: 11 Sep 2007].

García de los Ríos A Manuel, Durruty A Pilar. Diabetes Mellitus. Fundación de Investigación y Perfeccionamiento Médico. Santiago 2003. 2º edición. Capitulo 1-2, 23-41p.

Gartner Leslie P, Hiatt James L. Texto atlas de histología. Edit. McGraw-Hill Internamerica. México 2002. 2º edición. 397-402p.

Kaneto H, Kajimoto Y, Miyagawa J, Matsuoka T, Fujitani Y, Umayahara Y, Hanafusa T, Matsuzawa Y, Yamasaki Y, Hori M. Beneficial effect of antioxidants in Diabetes: possible protection of pancreatic  $\beta$  cells against glucose toxicity. *Diabetes*. 48(12):2398-2406. 1999.

Kendall WF Jr., Collins BH, Opara EC. Islet cell transplantation for the treatment of Diabetes Mellitus. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 1 (1):109-119. 2001.

Lapidot T, Walker M, Kanner J. Antioxidant and prooxidant effects of phenolics on pancreatic  $\beta$ -cell in vitro. *J. Agric. Food Chem.* 50 (25): 7220-7225. 2002.

Papas KK, Colton CK, Gounarides JS, Roos ES, Jarema MA, Shapiro MJ, Cheng LL, Cline GW, Shulman GI, Wu H, Bonner-weir S, Weir GC. NMR spectroscopy in beta cell engineering and islet transplantation. *Ann N Y. Acad. Sci.* 944:96-119. 2001.

. A colour atlas of the anatomy of small laboratory animals. Londres, Wolfe Publishing, c1992. 61,199p.

Rosenberger L, Wang R, Paraskevas S, Maysinger D. Structural and functional changes resulting from islet isolation lead to islet death. *Surgery*. 126 (2):393-398. 1999.

Ryan EA, Lakey JR, Paty BW, Imes S, Korbutt GS, Kneteman NM, Bigam D, Rajotte RV, Shapiro AM. Successful islet transplantation: continued insulin reserve provides long-term glycemic control. *Diabetes*. Jul;51 (7): 2148-2157. 2002.

Shapiro Am, Ryan EA, Lakey JR. Pancreatic islet transplantation in the treatment of Diabetes Mellitus. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 15 (2): 241-264. 2001.

Shibata A, Ludvigsen CW Jr, Naber SP, McDaniel ML, Lacy PE. Standardization of a digestion-filtration method for isolation of pancreatic islet. *Diabetes*. Aug;25(8):667-672. 1976

Sutherland D E R, Gruessner R, Kandswamy R, Humar A, Hering B, Gruessner A. Beta-Cell replacement therapy (pancreas and islets transplantation) for treatment of Diabetes Mellitus: An integrate approach. Transplantation Proceedings. 36: 1697-1699. 2004.