

CULTIVO DE ISLOTES DE LANGERHANS, DIFERENCIADOS DE CELULAS BETA Y SU RELACION CON ISO Y ALO TRANSPLANTES*

Dr. MARIO SANCHEZ MEDINA**
Lic. BLANCA M. RODRIGUEZ N.**
Lic. ROSALBA DE GARCIA**

RESUMEN

Se cultivaron islotes betacelulares pancreáticos de ratones, curies, ratas, hamsters y conejos, para estudiar los factores que influyen en el crecimiento y desarrollo del cultivo "in-vitro". No se usaron hormonas. El medio de cultivo fue líquido ascítico, suero de gallo y solución de Tyrode. Los islotes desarrollados se diferenciaron e identificaron en el momento del explante. Al vigésimo día se observaron notoriamente betacélulas granuladas. Se demostró un continuo mantenimiento de las células alfa, beta y delta a partir del décimosexto día, el cual era paralelo con la regresión del conglomerado acinar. La masa total del explante disminuyó mientras que la masa del islote permaneció relativamente sin modificación. Las betacélulas mostraron una continua estabilización, de acuerdo con el modelo animal experimental. Las vacuolas presentes de diferentes tamaños sugieren una posible actividad betacelular. Nucléolos muy claros se observaron en las células y numerosos gránulos en el citoplasma. Las betacélulas granuladas mostraron gránulos citoplasmáticos muy claros por medio de diferentes coloraciones. Una posible relación embriogénica entre el conglomerado de las betacélulas en el cultivo y los elementos morfológicos posiblemente vasculares, se plantea como una factible hipótesis en consideración.

La evidencia demostrada por Lazarow (1) (2), Carpenter (3) (4), Hegre (5) (6) (7), Wells (8), Lillehei (9), Summerlin (10), y los otros autores de que es posible el transplante de islotes de Langerhans cultivados, siguiendo una metodología especial, nos ha estimulado a llevar a cabo este estudio. La diferenciación de los islotes, la respuesta de las células beta a altas concentraciones de glucosa, el aumento de la masa insular y la desaparición del tejido acinar en los cultivos, han puesto en claro un modelo experimental que permite evaluar "in vitro" tales factores

aislados y sometidos a la influencia de otras hormonas como la corticoesterona en co-cultivo con glándula adrenal.

Además, el desarrollo del páncreas fetal de la rata a través de la gestación ha permitido comparar el modelo "in vitro" con lo hallado "in vivo" (11). Por otra parte el hecho de que no se sabe si es o no la microangiopatía diabética una consecuencia directa de la deficiencia insulínica, o si las complicaciones de la diabetes representan un defecto génico, plantean el interrogante de si el transplan-

* Primera investigación colombiana sobre el tema, auspiciada por el Fondo de Investigaciones Colombianas "Francisco José de Caldas" COLCIENCIAS con el grant 208-3-04-76.

** De la Asociación Colombiana de Diabetes (ACD), Bogotá, Colombia.

te celular específico, de alfa, beta y delta o de todo el islote pudiera o no corregir el daño vascular. Si esto no fuera posible, las células transplantadas no modificarían el desarrollo de las complicaciones de la diabetes. Pero experimentalmente se han demostrado los factores anti-obesidad y anti-insulina resistencia (12), en ratones afectados del respectivo cuadro opuesto, quienes con el transplante de células de ratones normales, corrigen tales defectos: Entonces, extrapolando el hecho a la diabetes, sería de esperar que las células beta del diabético no llevan los "factores anticomplejaciones" y que el transplantarse células normales con el factor protector de las complicaciones, éste se transfiere al huésped diabético que lo recibe con el posible beneficio correspondiente.

OBJETIVOS

1. Observar la diferenciación "in vitro" de las células insulares de páncreas de ratas, hamster, curí, conejo y humanos.
2. Aislamiento y cultivo de las células beta, alfa y delta de los islotes de Langerhans.
3. Observar el posible aumento y/o mantenimiento del tejido insular y la regresión del tejido acinar, como uno de los pasos en el estudio acinar, como uno de los pasos en el estudio y análisis de las células en los diferentes períodos secuenciales del cultivo.
4. Comportamiento del cultivo de células ante diferentes concentraciones de glucosa y su cuantificación "in vitro".

Una vez logrados estos objetivos, se buscará en investigación posterior el iso y el alotransplante de células cultivadas en los distintos modelos experimentales mencionados en los objetivos 1 y 2, para que en la etapa final del estudio pueda plantearse el alotransplante humano.

HIPOTESIS

Las células beta de los islotes pancreáticos conservan su función secretora cuando son cultivadas "in vitro" y, por consiguiente, sometidas al iso y alotransplante serían potencialmente capaces de reemplazar en su función a las betas células del huésped.

MATERIAL Y METODOS

MATERIALES

En el laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Asociación Colombiana de Diabetes (A C D), dotado de los elementos necesarios para cultivar cualquier tipo de tejidos o células se llevaron a cabo los objetivos 1, 2, 3 y 4 del diseño.

El cultivo de tejidos consiste fundamentalmente en obtener pequeños fragmentos insulares, explantarlos del animal que le dió origen y colocarlos en condiciones experimentales "in vitro" semejantes a las del organismo de donde proceden: esto exige condiciones que se complican en la práctica por detalles y preparativos técnicos que aseguren la conservación celular como en el animal originario sometido al explante.

Son estos requisitos la esterilidad, las características especiales del laboratorio para el cultivo de tejidos, el instrumental de cristal o desechable y el metálico necesario para los experimentos.

Animales de Laboratorio:

En el cumplimiento del objetivo No. 1 se emplearon en la experiencia en orden secuencial ratas, curies, hamster y conejos. A quienes se extrajo el páncreas y aisló el tejido insular.

METODOS

Técnica de la disección del páncreas:

Los animales fueron sacrificados por golpe en la cabeza; la piel del abdomen

una vez rasurada, se esterilizó lavando con abundante agua y jabón, luego con alcohol y finalmente barnizándola con una solución yodurada al 2% en alcohol. Luego se practicó una incisión de 5 a 10 cm en la línea media del abdomen separando músculos oblicuo abdominal externo y oblicuo abdominal interno hasta llegar a la cavidad abdominal. En este momento se extrajo todo el órgano pancreático y se colocó en una solución salina balanceada en solución Tyrode, a fin de mantener todo el órgano en condiciones de humedad y evitar la muerte a las células. Es obvio que todas las maniobras anteriores se llevaron a cabo en medio estéril.

Manejo del órgano extraído:

Una vez que el órgano fue extraído, se procedió a cortarlo en fragmentos pequeños de 2 a 4 cm³ con cuchillas especiales usadas para el fin específico del cultivo de tejidos. Los fragmentos se trataron en seguida con abundante solución salina balanceada para lavar el exceso de sangre que contenían y luego permitir que fueran tratados con enzimas proteolíticas, a fin de separar el tejido insular de la parte acinosa del páncreas.

Técnicas del cultivo que se utilizó para el crecimiento de las células insulares del páncreas

Se seleccionó el de la laminilla flotante en tambor vibratorio y el de botellas de cepa sin coágulo, usando como nutritivo, el fabricado por los laboratorios Strangeway, compuesto de una medida de suero de gallo, 1/6 parte de embrión de pollo y 1/3 parte de solución Tyrode. Además fue utilizado el medio nutritivo preparado con líquido ascítico de humano.

Técnica del porta-objeto excavado

En este procedimiento se siembran pequeños fragmentos de tejidos en cubreobjetos, habitualmente cuadrado y como se dijo empleando coágulo de plasma de

pollo y extracto embrionario. Una vez formado el coágulo se coloca el cultivo en la excavación del portaobjeto de Maximow.

El cultivo se sella con parafina o vaselina y la cámara se coloca de tal manera que los fragmentos queden hacia abajo, suspendidos en el coágulo de plasma, sólo se añadirá medio nutritivo para lograr cultivo a largo plazo. Esto será una observación fundamental para determinar el valor porcentual y comparar las velocidades de crecimiento, aunque la imagen óptica "in vitro" no ofrezca las condiciones ideales para la microfotografía.

Técnica de la laminilla con coágulo de plasma

Se utilizaron cubreobjetos de 11 mm por 44 mm y la siembra se hizo por materiales adherentes como el plasma para fijar los explantes y al mismo tiempo aportar nutrientes.

El mismo medio de plasma de gallo fue usado colocando dos o tres gotas en las suspensiones celulares y esperando hasta su coagulación.

Las laminillas así preparadas se introdujeron en tubos de ensayo y se les nutrió con 2.5 ml de medio nutritivo. La incubación se hizo a temperatura deseada con o sin movimiento en el horno de tambor rotatorio del cual dispone el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la ACD.

Técnicas de la cámara de Rose:

Este dispositivo permite cultivar células de tejidos, cambiando el medio o perfundiendo sustancias para tomar luego registros foto-cinematográficos durante incubaciones prolongadas. La técnica de la siembra constante en colocar las células en suspensión en cubreobjetos siguiendo el mismo método anteriormente descrito. Una lámina de latex con perforación central unida al cristal, permite la formación de una cámara cerrada, con paredes

de cristal ópticamente compatibles con los sistemas microscópicos ópticos actuales. El acceso a la cámara se logra mediante agujas finas y largas. La cámara de cristal y latex se hace sólida mediante la perforación de las dos placas de acero inoxidable, que se colocan en ambas caras de la cámara.

La cámara de Rose permite toda clase de observación fotográfica y se puede mantener en condiciones estériles siendo posible aún armarla con laminillas de cultivo que se están desarrollando en los tubos. Figs. 1 - 8.

Cultivo en botellas

Este sencillo procedimiento coloca una cantidad de medio nutritivo en delgada película localizada en la superficie plana de la botella de cristal. Las células se colocaron mediante inoculación. Las botellas permanecieron en reposo para asegurar que las células emigradas de la suspensión, se adapten por estereotropismo a la superficie. El medio cambia según las variaciones de pH y el tiempo varía generalmente entre los diez primeros días, durante los cuales la superficie cubierta de células es visible a simple vista o al microscopio con pequeño aumento. Una vez cubierta la superficie por las células, comienza la licuefacción en focos múltiples; entonces fue cuando se precisó reseminar los cultivos. Para ello se desprendieron las células con agitador de vidrio y se añadió soluciones débiles de tripsina, para facilitar la separación y homogeneización de las suspensiones celulares. Posteriormente se lavó y centrifugó a 1000 r.p.m. por 10 minutos y el sedimento se diluyó para proceder nuevamente a la resiembra, que puede realizarse igualmente en laminilla o en cámaras de Rose, para estudios de bioquímica, o histoquímica. Este método lo consideramos importante en nuestro diseño por la posibilidad de desarrollar cepas celulares de una línea con predominio de otras variedades.

Identificación de los tejidos:

Los tejidos se prepararon para el estudio histopatológico fijándolo en solución de Bouin y se colorearon con hematoxilina eosina y aldehído fuscina; alternativamente se usaron la solución de formol de Zenker para las mismas coloraciones.

Comportamiento del cultivo ante diferentes concentraciones de glucosa.

Los cultivos se colocaron a diferentes concentraciones de glucosa: medio con 165 mg. de glucosa por 100 ml., con 340 mg. de glucosa %, con 560 mg. de glucosa % y con 993 mg. de glucosa %. En cada medio con concentraciones de glucosa diferente se estudiaron las características de los islotes, la granulación de las beta células y la cantidad de insulina en el medio (13).

RESULTADOS

Habidas consideraciones de los métodos mencionados los pasos coordinados del sistema mostrado en ratas, curies, conejos y hamster y los resultados fueron los siguientes:

Tratamiento de los explantes con colagenasa en concentraciones de 50 mg % en agua destilada por 15 minutos a 37°C. mediante una agitación muy leve.

Enjuagamiento de los fragmentos extraídos con solución salina Hanks durante 4 veces sucesivas y traspaso de los explantes por agujas de calibre 18, 19 y 21 hasta obtener una separación aceptable y claramente apreciable de tejidos conectivo con islotes de Langerhans.

Inclusión del tejido separado en el paso anterior en el sistema denominado de coágulo, el cual se obtiene colocando en un cubre objeto especialmente acondicionado en su tamaño para ser introducido dentro de un tubo de 16 x 100, añadiéndole una gota de plasma de ex-



FIG. 1 – Páncreas de rata colocado en solución salina Buffer.

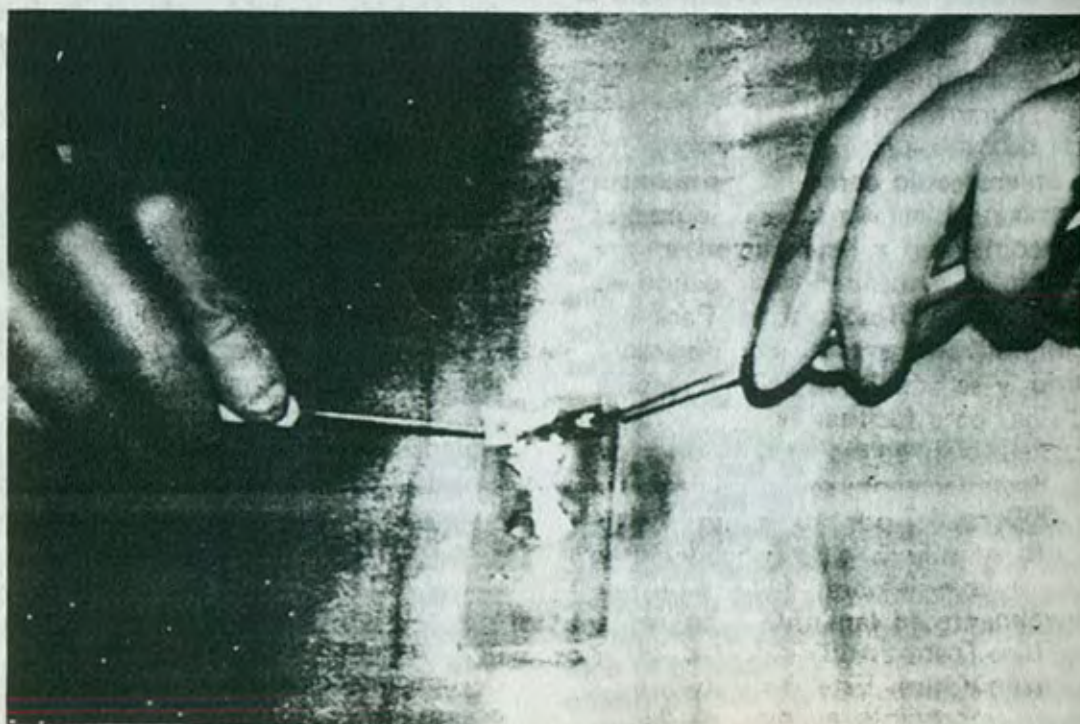


FIG. 2 – Fragmentación de la pieza de páncreas o islote betacelular.

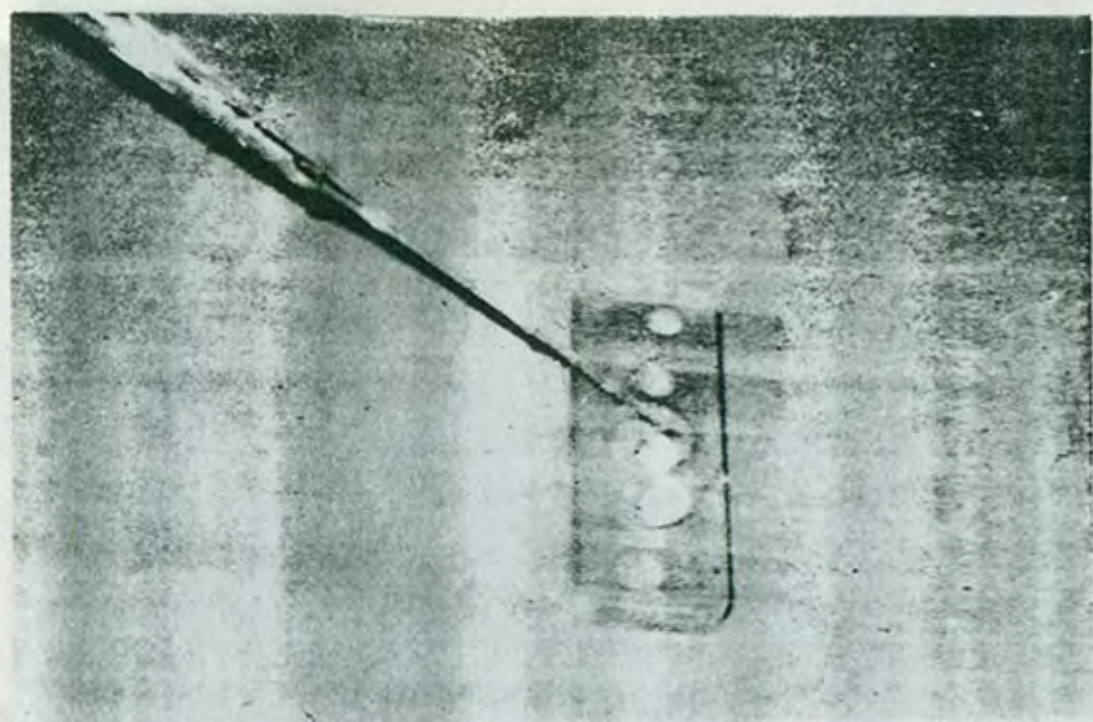


FIG. 3 - Disposición de las laminillas en las que van colocados los islotes una vez formado el coágulo.

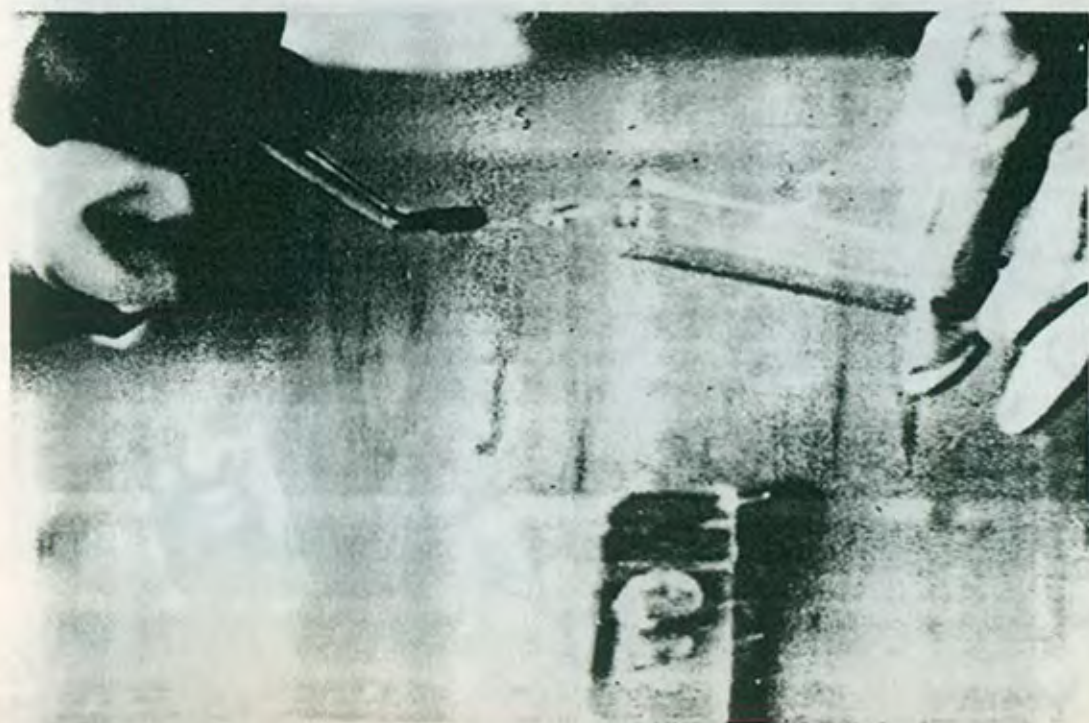


FIG. 4 - Introducción de la laminilla que contiene el coágulo con los islotes en el tubo de ensayo.

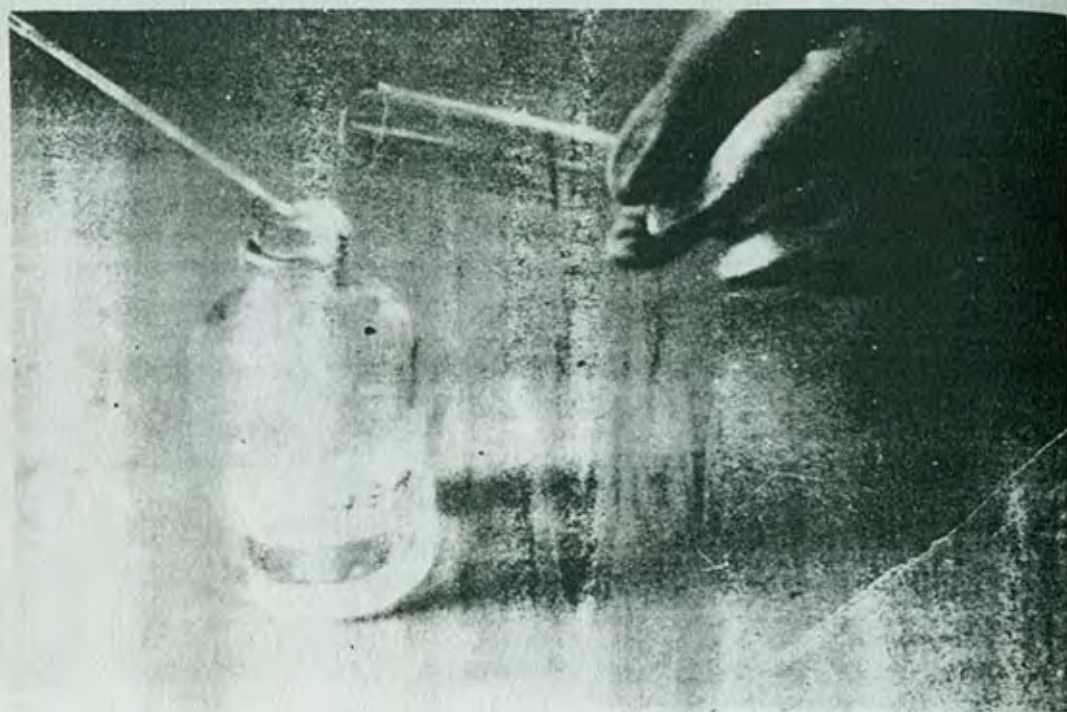


FIG. 5 - Colocación de los fragmentos en colagenasa.



FIG. 6 - Explante listo para ser trasladado del portaobjeto excavado de Maximov a uno de los sistemas de cultivo.



FIG. 7 – Tubo de ensayo listo para ser colocado en el tambor rotatorio.



FIG. 8 – Tambor rotatorio.

tracto embrionario, como se muestra en la figura.

Una vez obtenido el coágulo sobre la laminilla se colocó dentro del tubo mencionado y se agregaron los medios de cultivo: medio de Eaglea con aminoácidos esenciales (M E N), líquido ascítico y Tc 199.

Posteriormente este tubo se incubó a 37°C. en un tambor de rotación continua a una velocidad de 100 r.p.m. e incubación hasta 24 días en promedio.

Es preciso anotar que en esta técnica no se cuantificaron los islotes separados en forma exacta en cada tubo de ensayo.

Dentro de las modificaciones a la técnica se procedió a separar los islotes, observándolos en un estéreo microscopio SPENCER® con el que no es posible visualizar la cantidad de islotes, pero en cambio si facilita la anipulación de los mismos evitando así la contaminación.

Un segundo cambio logrado en el curso de los 6 meses fue el uso de una botella o recipiente de vidrio de cultivo, de 10 ml en donde la contaminación fue nula y no hubo variaciones en el pH.

Vale la pena anotar que los cambios en el pH ocurren entre 7.0 y 7.4 intervalo ideal requerido para este tipo de cultivo de tejido. De acuerdo con esto el pH es un indicador local puesto cuando el cambio es pequeño ello indica que los cultivos se mantienen en condiciones óptimas y si las variaciones son grandes, la contaminación se manifiesta por la gran acidificación: la muerte las células, por la alcalinización del medio.

A los 3 meses de iniciada la experiencia se tuvo en laboratorio la visita del doctor Karl Sussman, Profesor de Endocrinología de la Universidad de Colorado, quien trabajando con el personal en forma activa propuso las siguientes modificaciones a la técnica una vez lograda la extracción del páncreas.

- a. Tratamiento con colagenasa de los fragmentos del páncreas es concentraciones de 300 mg % en solución salina de Hanks durante 7 minutos a temperatura de 37°C y con fuerte agitación.
- b. Lavado del explante con solución salina normal.
- c. Tratamiento del tejido que se aísla en forma muy satisfactoria con diversas gradientes de densidad de Ficoll® en concentraciones del 25, 23, 20 y 11% en sobrecarga por orden descendente.

Los islotes aislados quedan incluidos en la interfase superior, es decir, en las concentraciones entre el 20 y 11% en tanto que el resto del tejido en el fondo del frasco en donde las concentraciones llegan hasta del 25%. Con modificaciones anteriores se continuó la técnica así:

Traspaso del material aislado en el cultivo a botella y adición del medio M.E.N.

Incubación dentro de un lapso de 3 a 4 días del tejido aislado.

Cuantificación de la glucosa por el micrométodo (44) el cual se llevó a cabo en distintos períodos es decir, cada 6, 12, 24, 72 y 96 horas todas ellas en los distintos cultivos para tal determinación.

Se procedió ulteriormente a llevar a cabo la adición del medio a todas las muestras de los cultivos y sus controles respectivos, de una solución de glucosa de 30 mg % en solución salina por 15 minutos y luego repitiendo la operación en concentraciones de 300 mg % durante 120 minutos más.

El crecimiento de los fibroblastos depende de la técnica empleada; así se trata del procedimiento del coágulo en laminillas, los islotes solamente se apreciarán una vez que se ha logrado la proliferación máxima fibroblástica, momento en el cual

se fija la preparación y se tiñe con aldehído fuscina, a partir del décimo día del cultivo, ya ha llegado el límite para fijar e identificar el islote impidiendo que el fibroblasto inunde la lámina.

Si se usa la técnica de separación del islote con Ficoll, el islote queda aislado inmediatamente y no hay proliferación fibroblástica.

Se hicieron un total de 1500 cultivos de diferentes explantes de 250 animales: ratas, curies, cobayos y conejos, los cuales fueron valorados en su cuantificación de aumento, tanto acinar como beta-celular y fibroblástico, los cuales se detallan en las figuras 9 a 36.

A continuación se detallan los resultados de las muestras histológicas y de los cultivos logrados en distintas fases de la experiencia y la identificación, separación y morfología de las células beta consideradas activas funcionalmente en el cultivo. Así mismo se muestran detalles de las granulaciones y vacuolas que permiten pensar en la secuencia del comportamiento biológico de la célula insular "in vitro".

DISCUSION

Hace tiempo se comprobó el funcionamiento de las beta-células pancreáticas y el mantenimiento de los islotes in vitro en sistemas de monocapa y en cultivo de órganos (14-15).

Diversos tipos de células se han cultivado inclusive utilizando capilares sintéticos (16) el crecimiento de la célula está indicado por su supervivencia, la división celular y la producción de sus productos específicos, llegando a cuantificarse niveles realmente sorprendentes de estos (17-18) usando los métodos de cultivos convencionales. Si se lograran establecer conexiones capilares frente al prototipo de células cultivadas no habría duda de que el desarrollo endocrino del páncreas artificial permitirá la supervivencia fun-

cional ideal, requisito fundamental en esta experiencia.

El examen del tejido pancreático aislado establece un distingo exacto entre islotes y tejido acinar con la coloración de hematoxilina y eosina; las células acinares que contienen gránulos de zimógeno, se observan fácilmente, y las células granuladas B son identificadas mediante la coloración de aldehído fuscina, y se presentan como agregados esféricos en su interior.

Tales características histológicas parecen que son las propias de animales no diabéticos que fueron los usados en esta experiencia. En cambio el aspecto histológico de animales diabéticos no tratados muestran en sus cultivos islotes celulares aldehído-fuschina negativos, aunque se puedan identificar reducido número de granos positivos a la coloración mencionada.

Es importante anotar que las células diferenciales del páncreas fetal solamente son identificables hacia el 17o día de la gestación de una rata, por la presencia citoplasmática del zimógeno, a su vez los niveles de tejido acinar se detectaron cuando se utilizaron páncreas fetales desde el 12o día, hasta el 16o. día del embarazo y el nacimiento (19-20). Para establecer el efecto de los órganos en cultivo sobre el componente celular acinar del páncreas, en diferentes estadios de diferenciación, es preciso hacer los explantes fetales de páncreas en un estadio relativamente no diferenciado esto es, del 18o. al 20o. día. Diferenciación ulterior acinar pancreática del explante, permite hacer la cuantificación histológica del desarrollo de este tejido en cultivo, presente a partir del 4o. día en el que se identifica las células acinares. Al hacer explantes a los 18 días de gestación el crecimiento comparativo de los islotes frente a los anteriores de 4 días es aproximadamente 7 veces mayor y en tal momento se puede comprobar que aproximadamen-

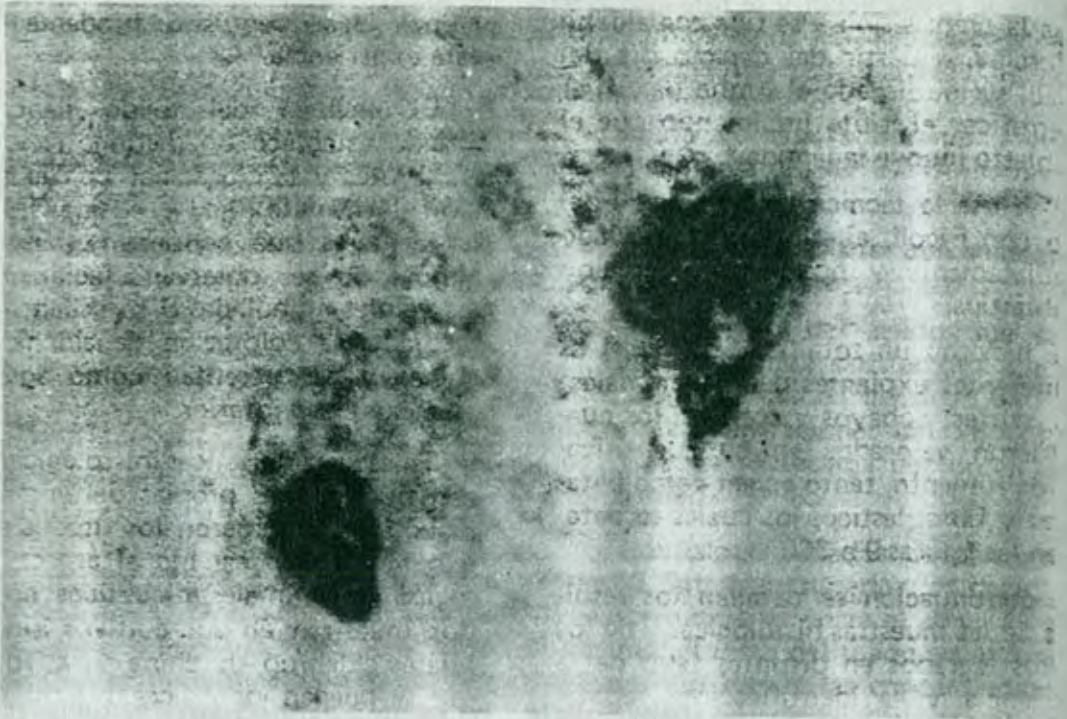
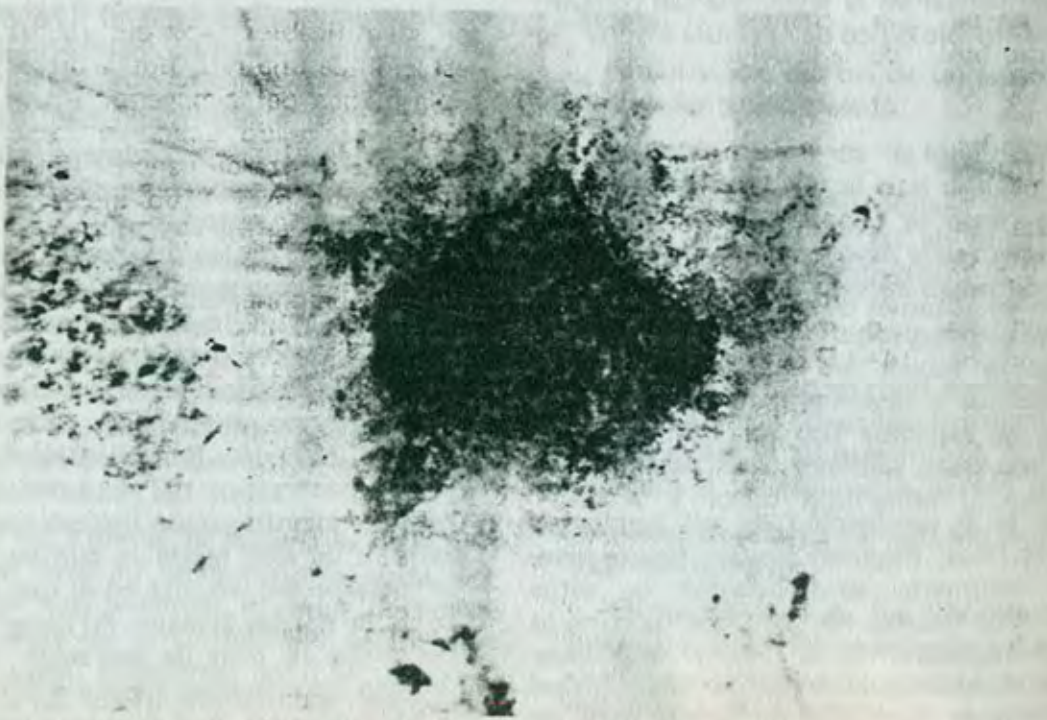


FIG. 9 – Islotes de Langerhans cultivados a los 12 días de la incubación.



*FIG. 10 – Islote de Langerhans explantado de rata e incluido en fragmentos.
X 600.*



FIG. 11 - Aspecto panorámico del cultivo a los 5 días de sembrado del explante

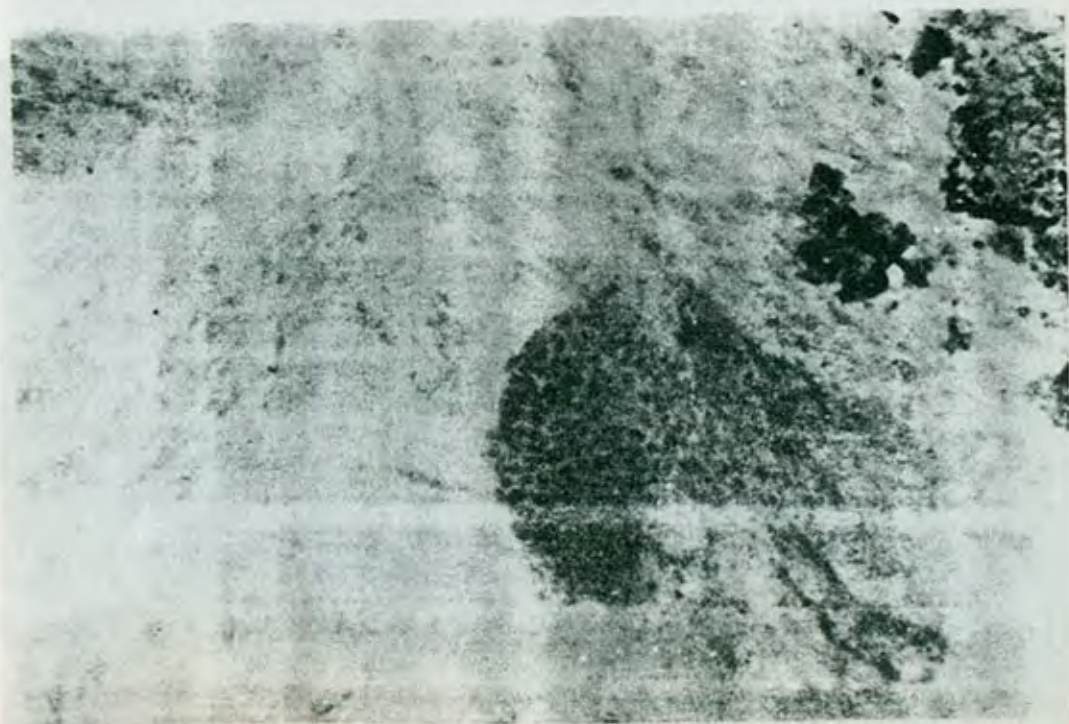


FIG. 12 - Explante y cultivo a los 20 días de incubación del islote X 600.

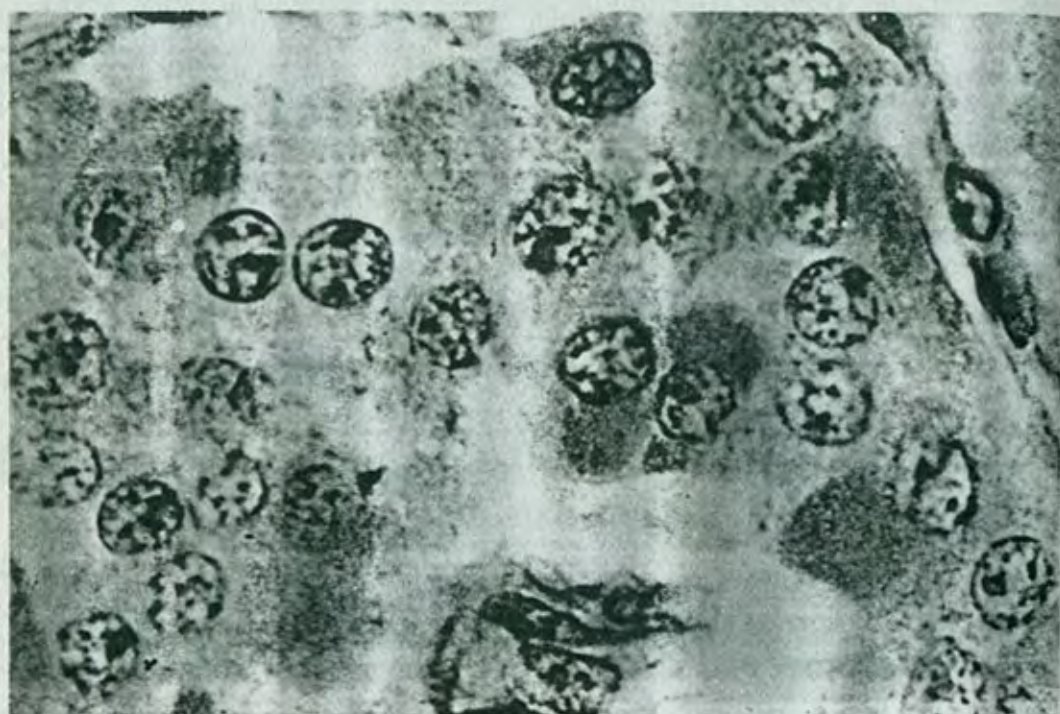


FIG. 13 — Páncreas de curíe con células beta plenamente granulados y alfa coloración tricrómica X 840.

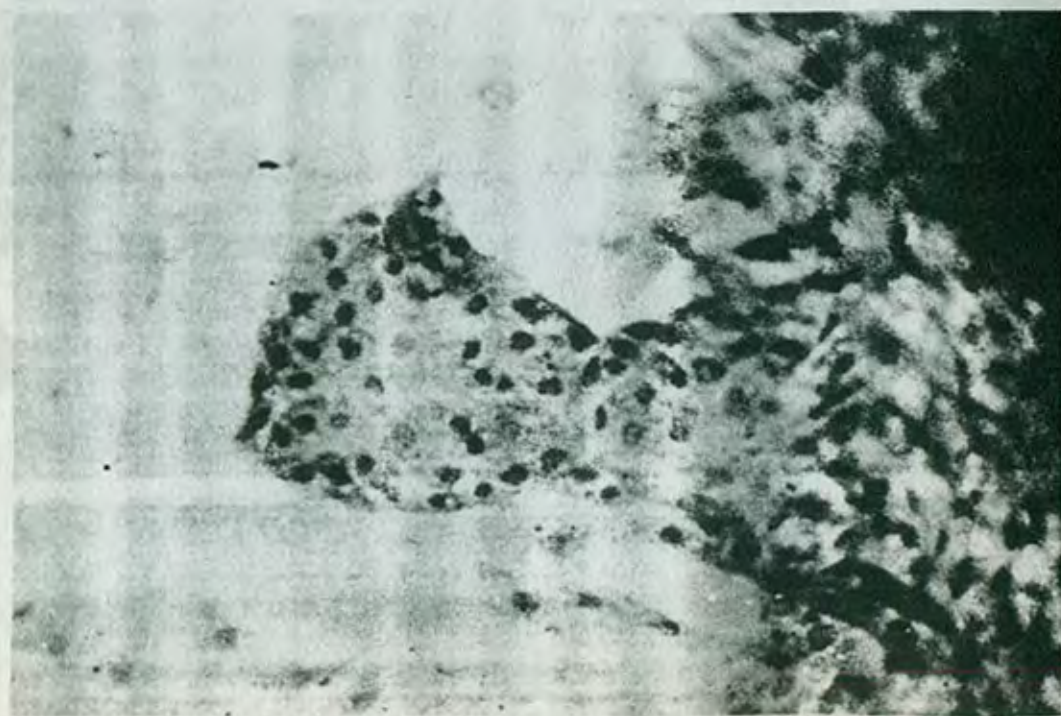


FIG. 14 — Explante sembrado de curíe a los 10 días que muestra un islote separado del fragmento aldehído fucsina X 600.



FIG. 15 - Cultivo del Explante de la Fig. 9 a los 10 días, inundando de fibroblastos, sistema de coágulo colagenasa en laminilla. Coloración aldehído fucsina X 400.

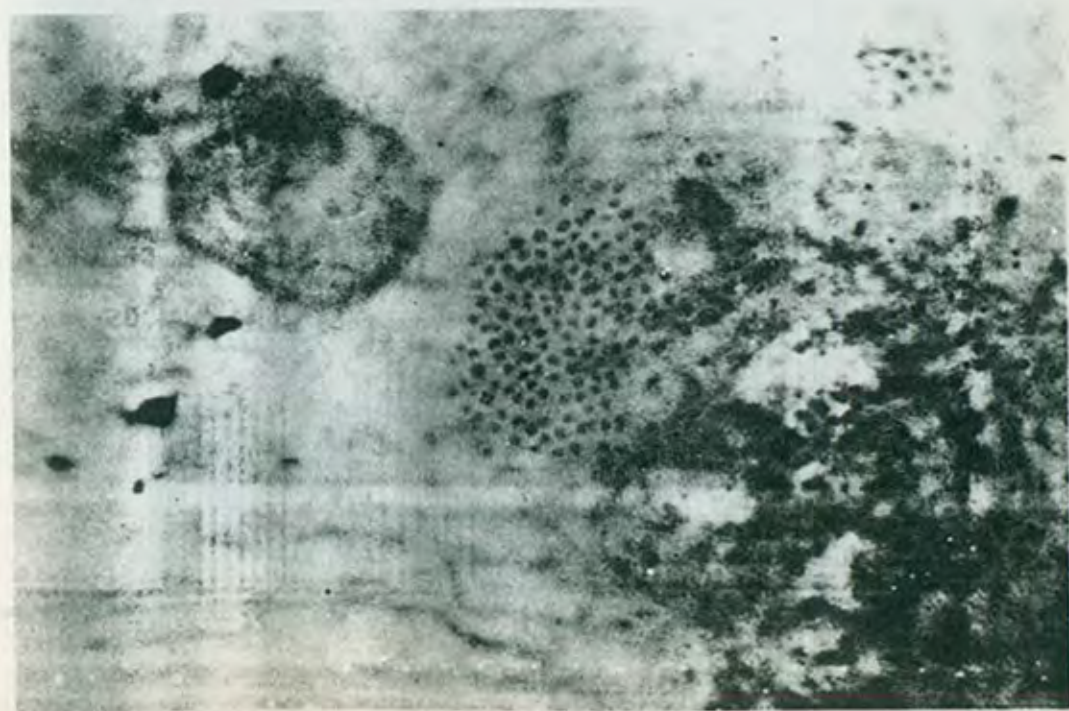


FIG. 16 - Cultivo que muestra células beta claramente diferenciados a los 20 días de cultivo, coloración aldehído fucsina X 400.

DEGRANULACION β CELULA VS.
CONCENTRACION GLUCOSA

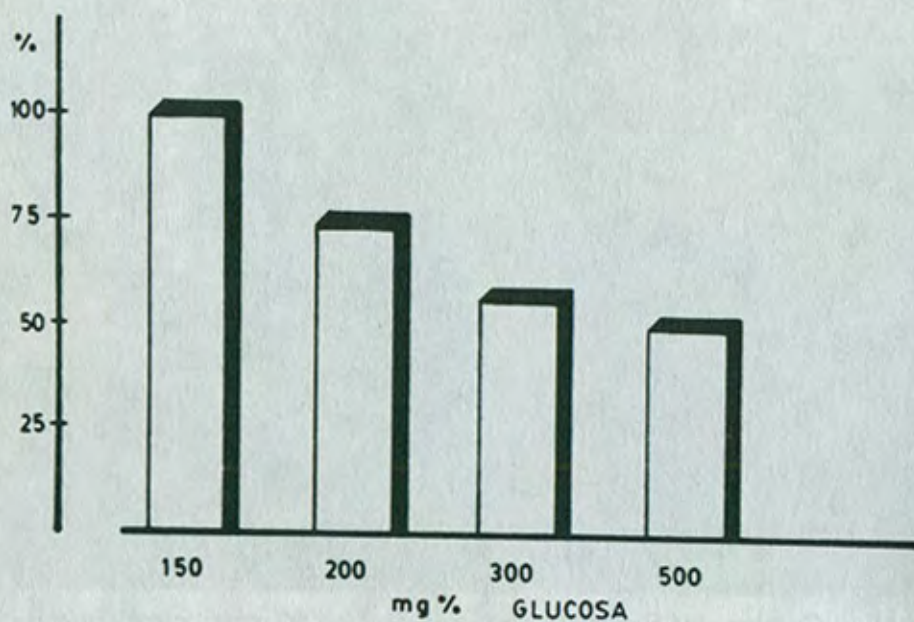


FIG. 17 - Degranulación beta-célula vs. Concentración glucosa.

CRECIMIENTO β CELULAS VS TEJIDOS VARIOS

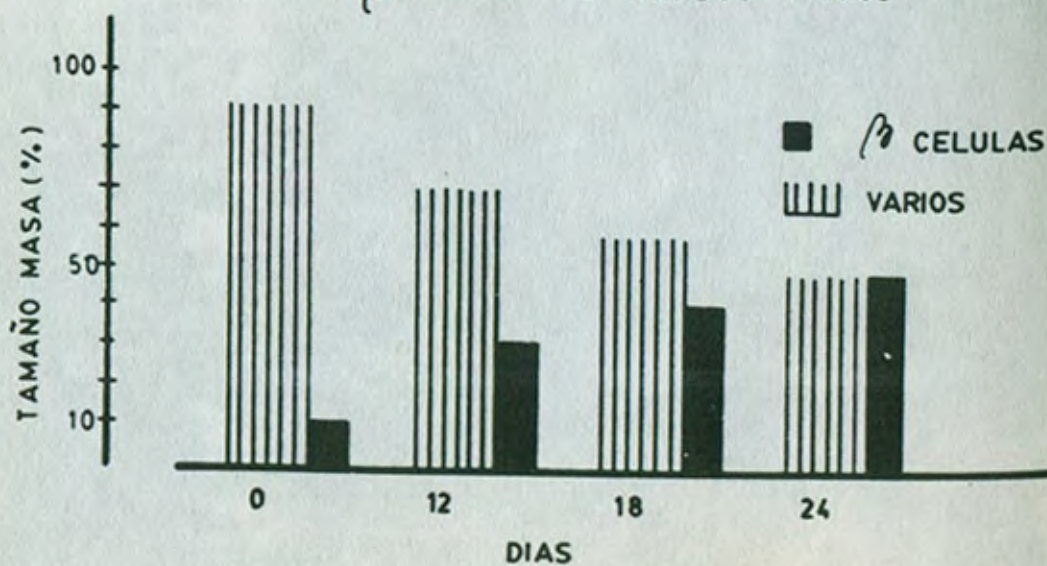


FIG. 18 - Crecimiento beta-célula vs. tejidos varios.

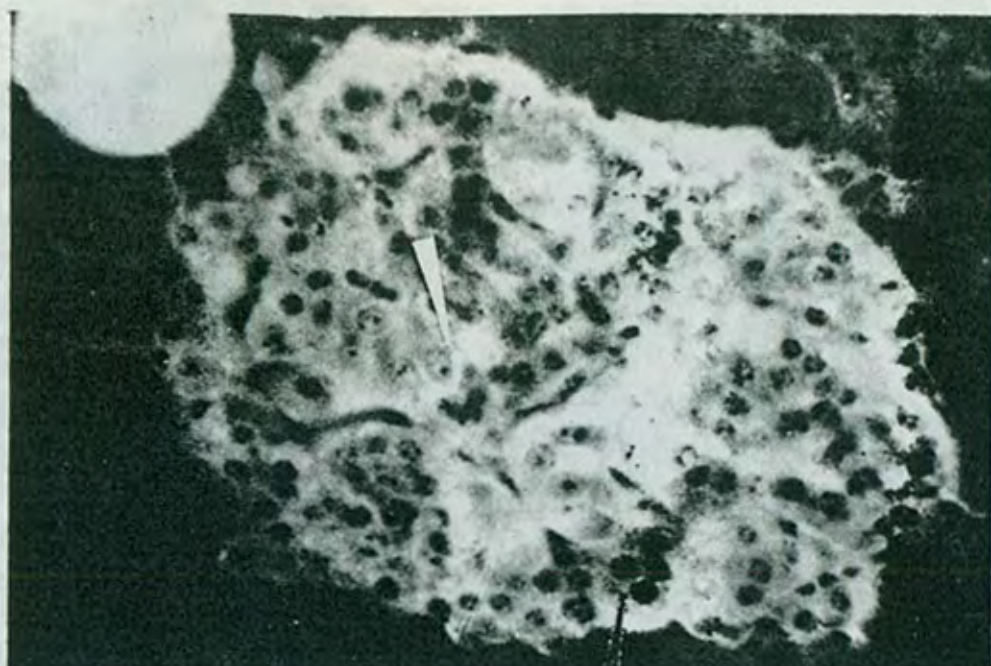


FIG. 19 — Corte histológico de páncreas adulto, en el centro de esta imagen se observa un islote de Langerhans, con la flecha (arriba) se señala a las células alfa y con la flecha (abajo) a las células beta. Teñido con el método de aldehído fucsina de Gomori X 250.

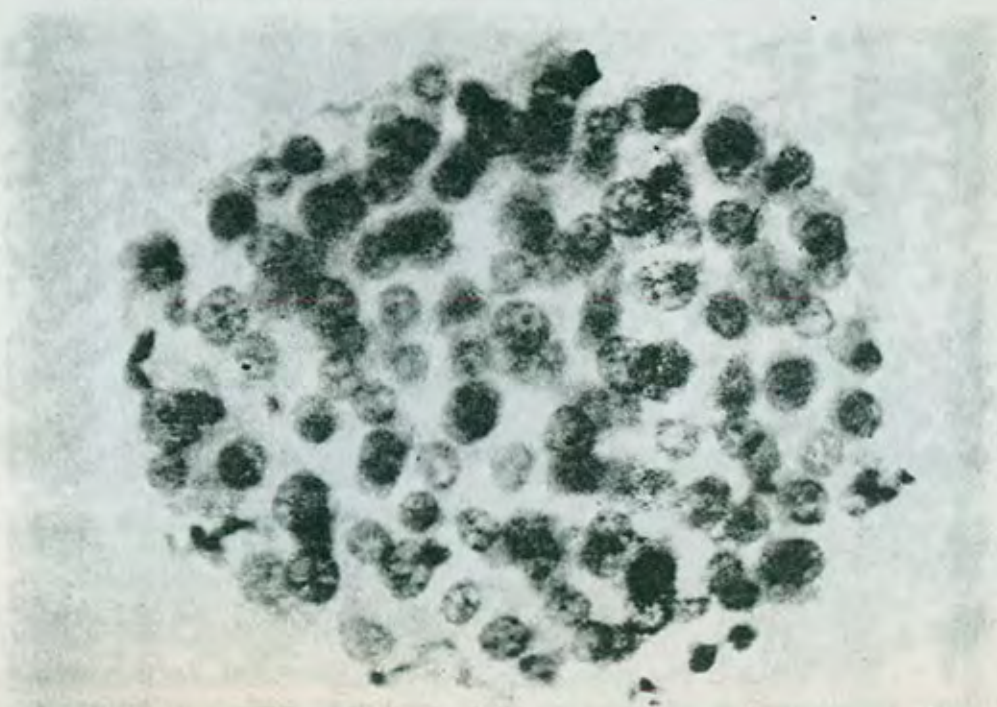


FIG. 20 — Islote del explante de páncreas de cobayo, de la Fig. 19 a los 8 días de cultivo de aldehído fucsina X 840.

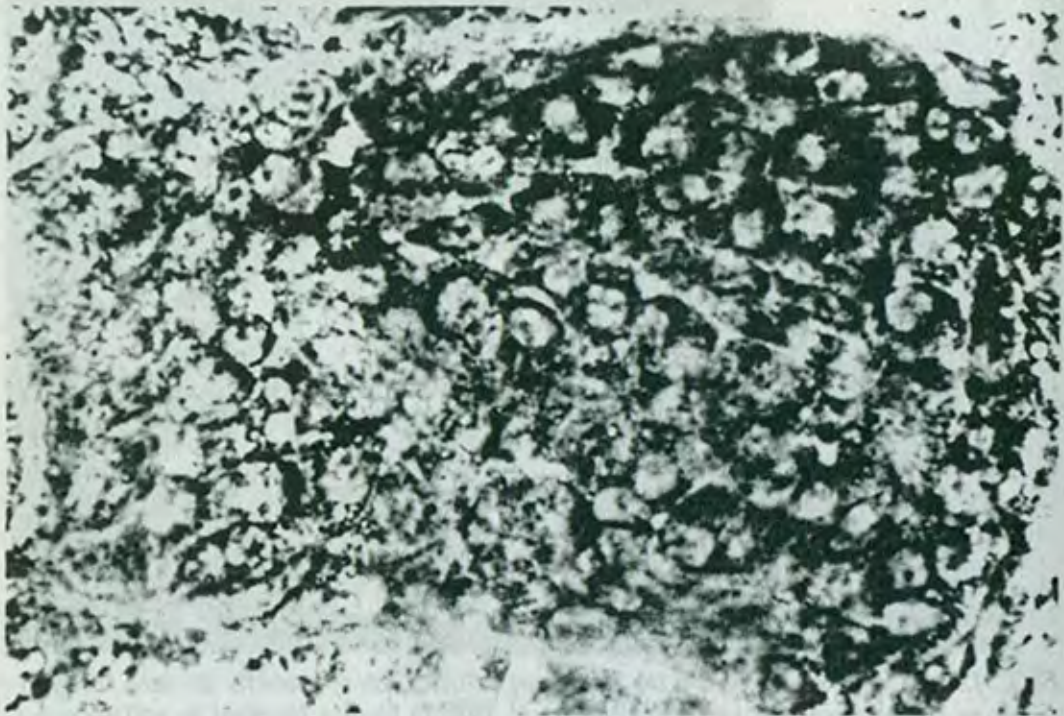


FIG. 21 – Fragmento de páncreas de cobayo adulto, cultivado in vitro durante 20 días en centro de esta imagen se observa un islote de Lanherhans, señalando con flechas amarillas. Contraste de fases X 400.

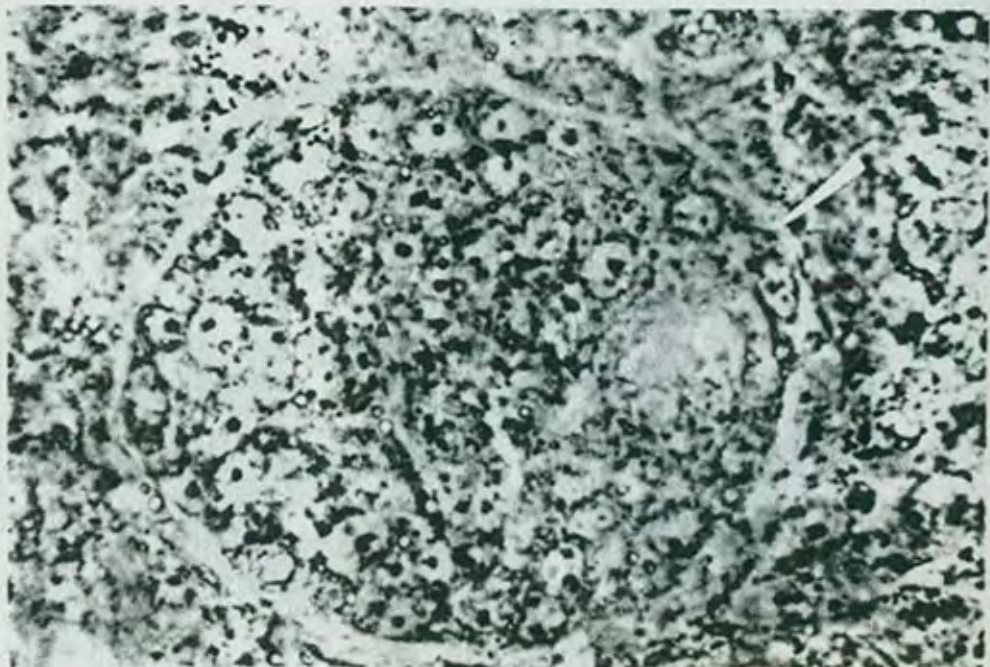


FIG. 22– Fragmento de páncreas de cobayo adulto, después de 10 días de cultivo in vitro con la flecha amarilla se señala un islote de Langerhans, la mayoría de las células tienen magnífico aspecto vital. Contraste de fases X 250.

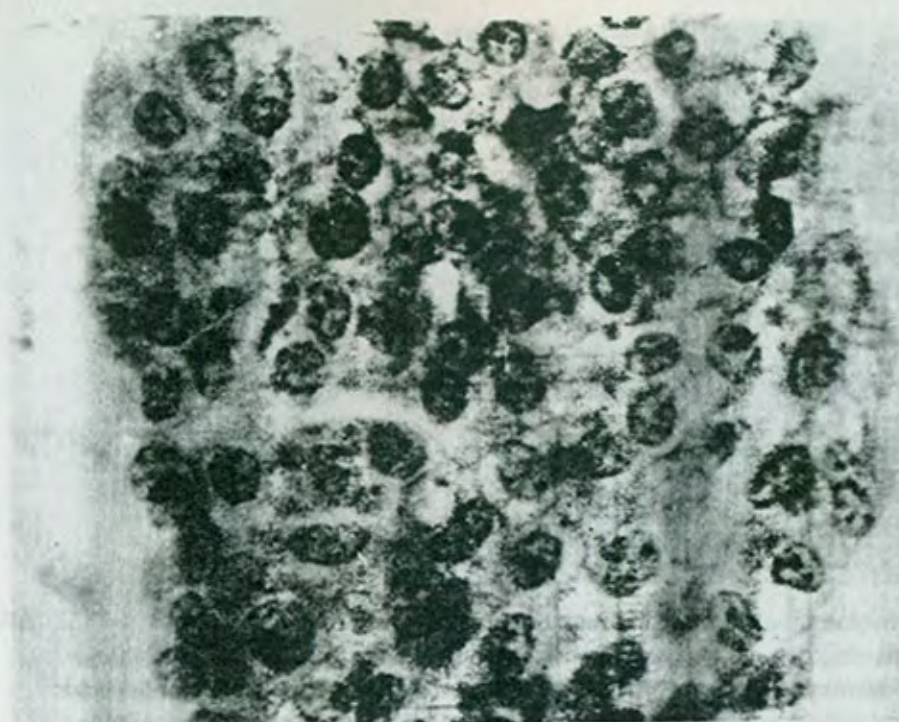


FIG. 23 - Islote separado de páncreas de rata a los 15 días de incubación, coloración de aldehído fucsina X 400.

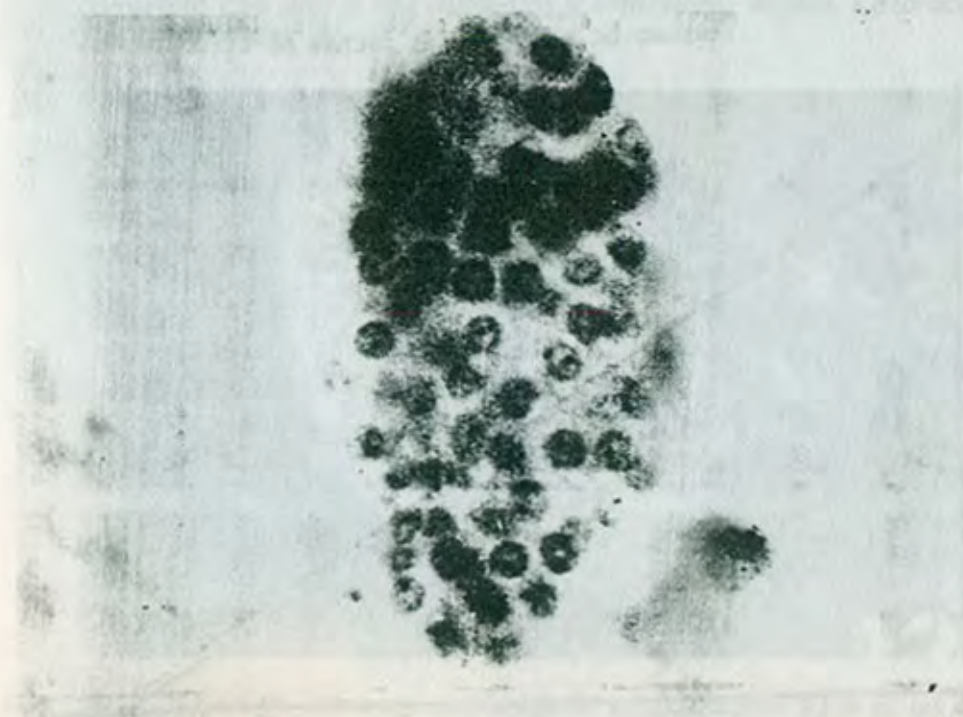


FIG. 24 - Mismo islote de la fig. 23 X 800.

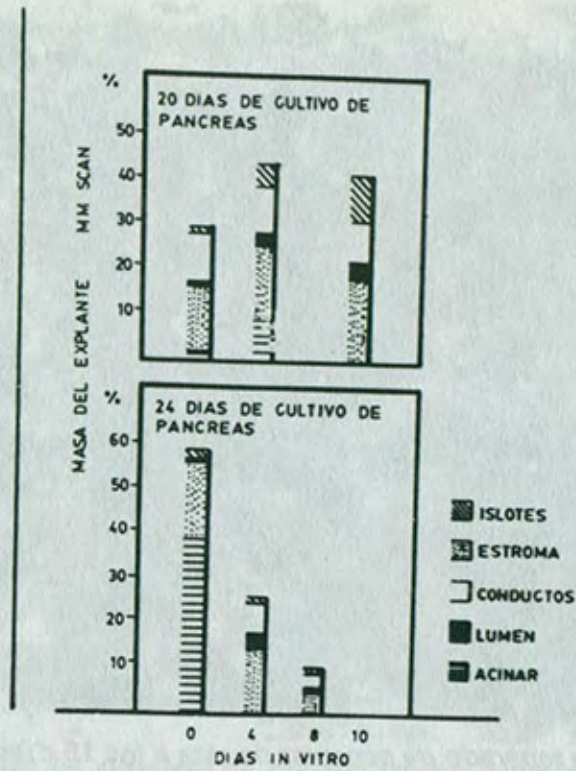


FIG. 25 - Diferentes tiempos de cultivo de páncreas.

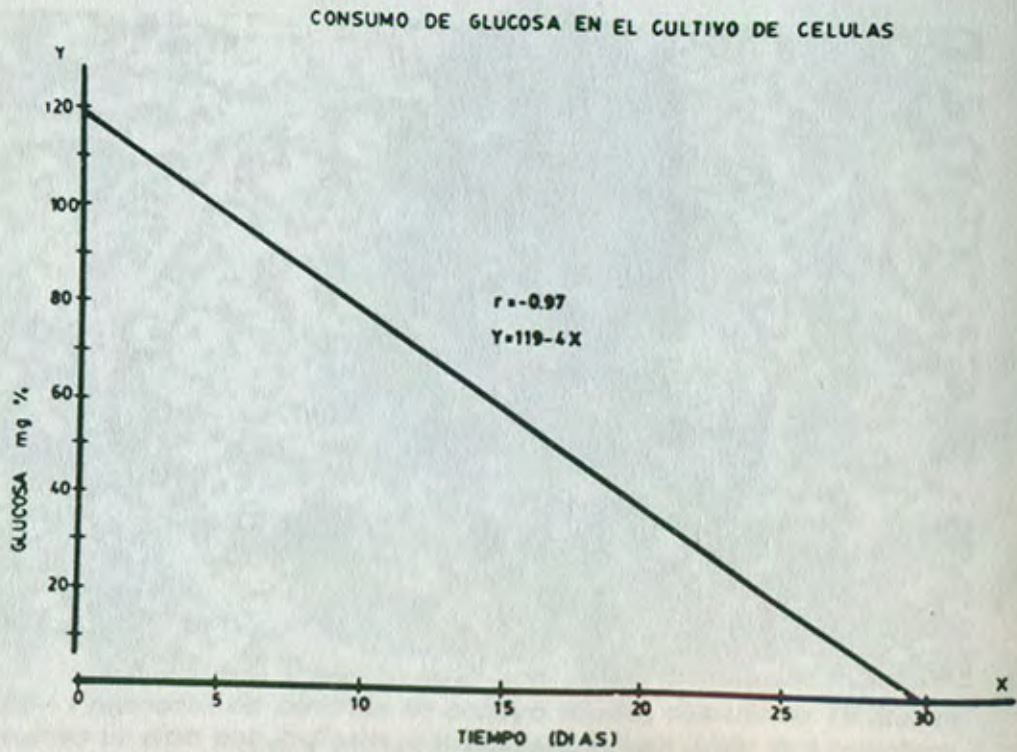


FIG. 26 - Consumo de glucosa en el cultivo de células.

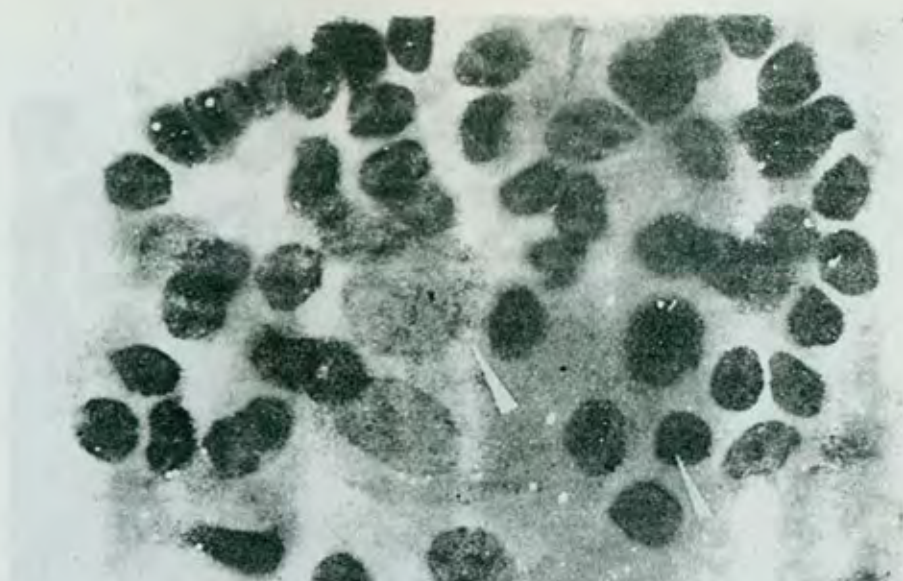


FIG. 27 - Fragmento de páncreas de cobayo adulto, cultivado *in vitro* durante 15 días, a mayor aumento se observa el aspecto de un islote de Langerhans; en esta imagen se pueden distinguir con facilidad tres variedades comparada con el resto de las células, con la flecha oscura (arriba) se señala unas células de un núcleo poco denso con uno a tres nucléolos y citoplasma muy extendido, por último hay otra variedad celular señaladas con la flecha inferior derecha, tienen un núcleo muy compacto con uno o dos nucléolos y citoplasma escaso. Coloración de Jacobson X 400.

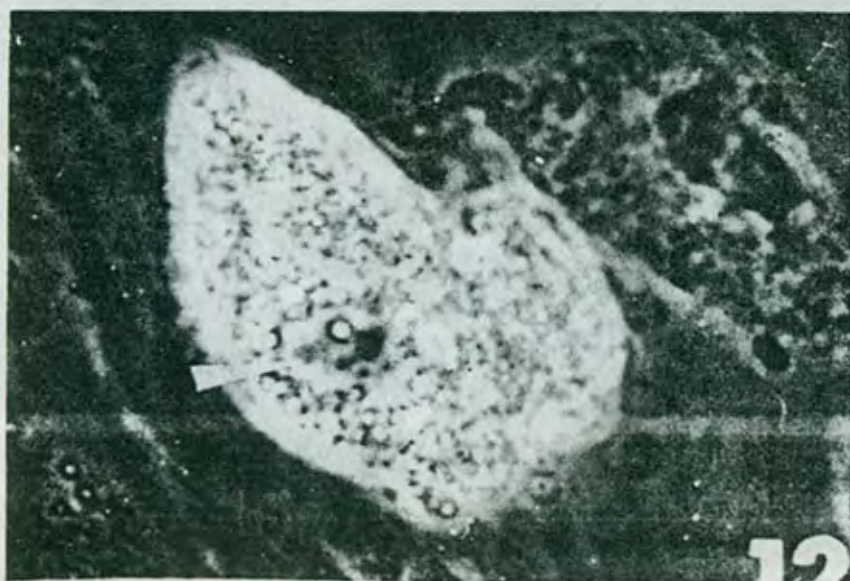


FIG. 28 - Células de páncreas cultivadas *in vitro* durante 20 días, las dos células tienen el citoplasma heterogéneo con granulaciones gruesas y finas; la localización del núcleo se señala con una flecha. Contraste de Fases X 600.

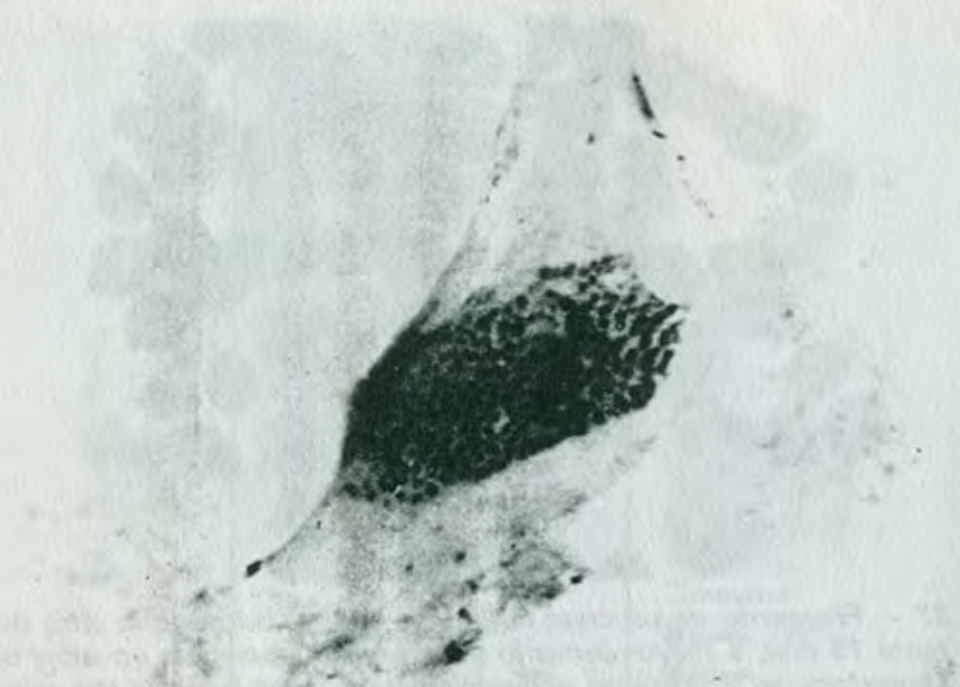


FIG. 29 — Islote separado de páncreas de cobayo al día 18 de cultivo, coloración aldehído fucsina X 400.

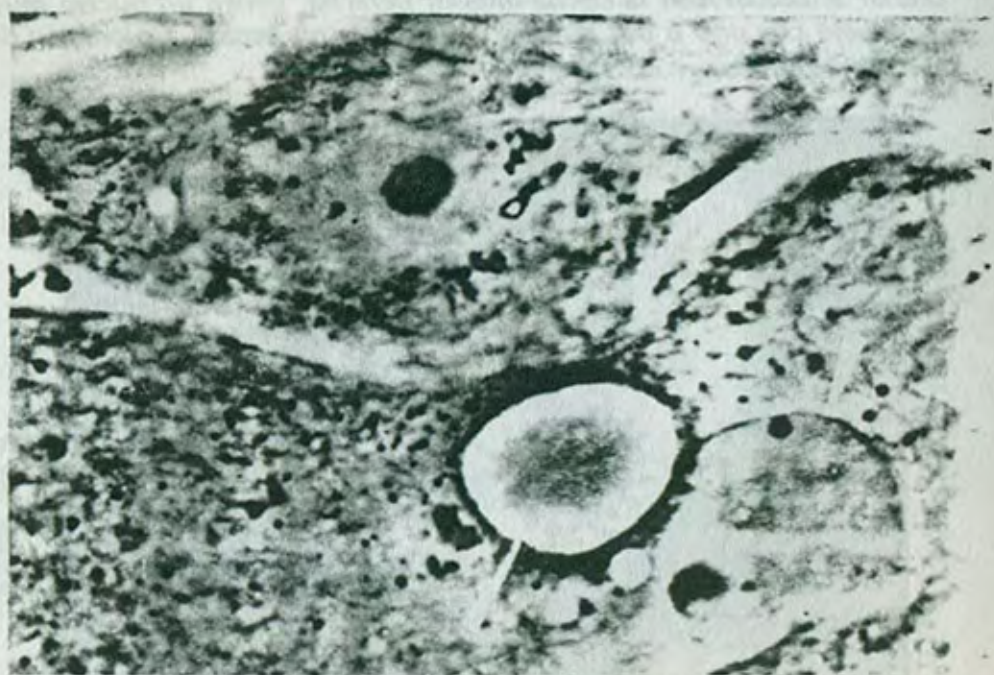


FIG. 30 — Detalle de células cultivadas de páncreas de cobayo durante varios días; el citoplasma de estas células es heterogéneo y abundante, retículo endoplásmico con granulaciones finas y vacuolas de diferentes tamaños, señalado con una flecha también un nucléolo prominente. Contraste de fases X 1600.

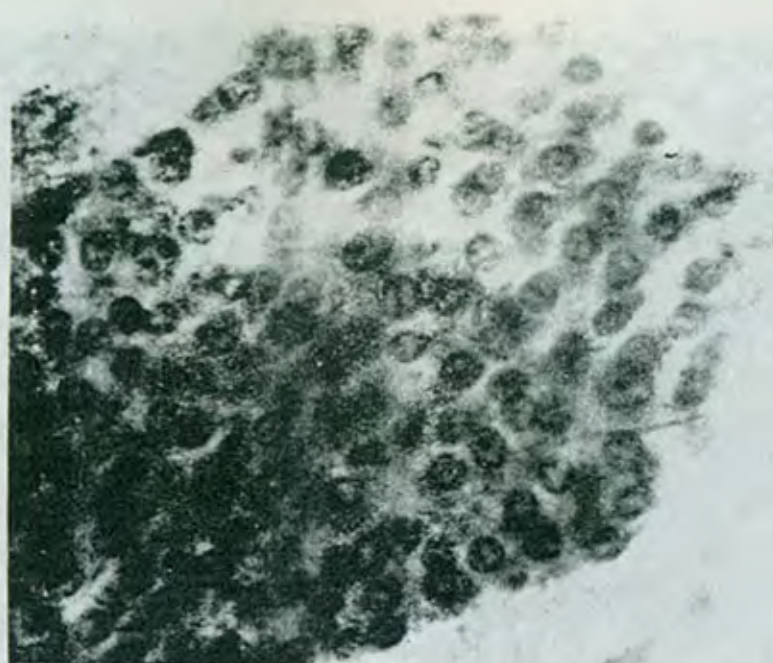


FIG. 31 - Islote de páncreas de cobayo adulto a los 20 días, X 600 Coloración aldehído fucsina.

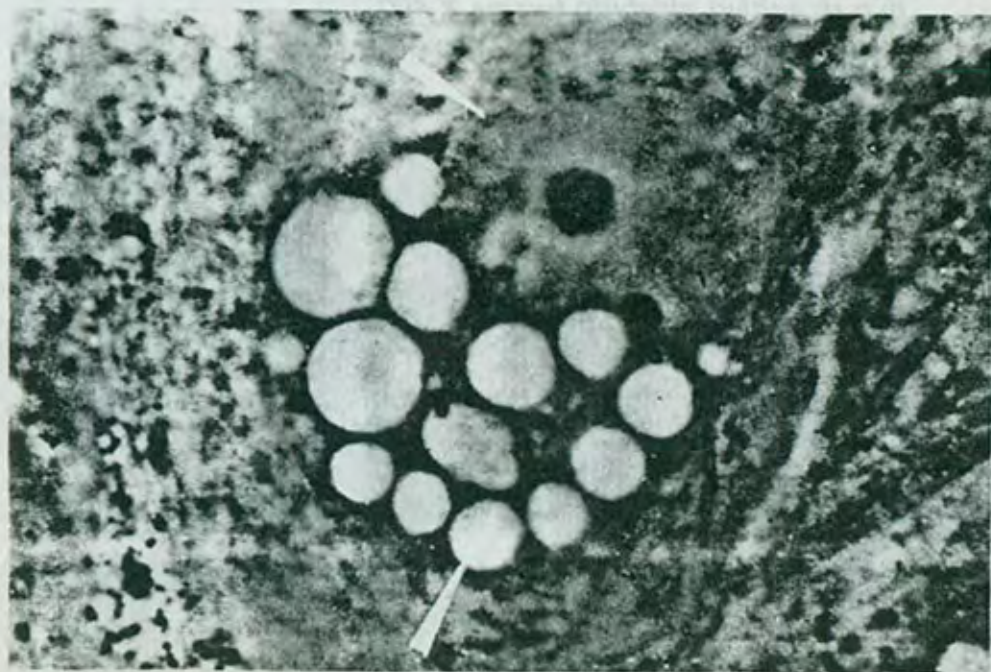


FIG. 32 - Detalle de un grupo de células de un cultivo de páncreas de cobayo adulto, en donde se observa en el citoplasma la distribución de abundantes vacuolas de diferentes tamaños señaladas con una flecha (abajo) el núcleo se señala con la flecha superior, el núcleo que tiene es muy prominente. Contraste de fases X 1600.



FIG. 33 — Células beta del explante cultivado de páncreas de cobayo, a los 8 días de cultivo, aldehído fucsina X 400.

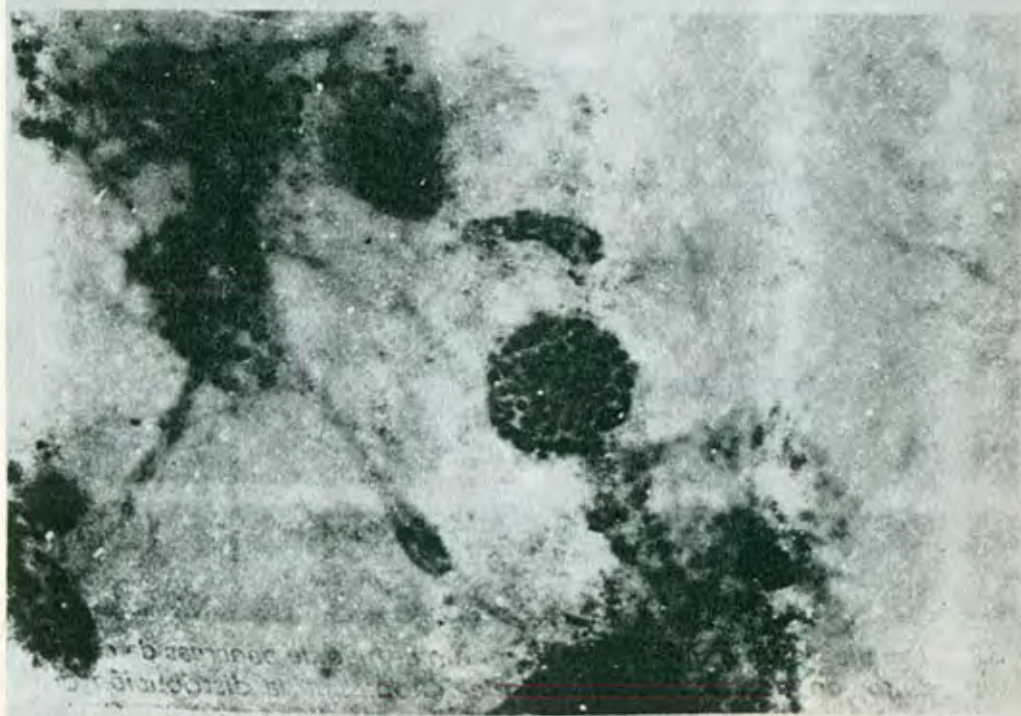


FIG. 34 — Islote aislado de ratón a los 8 días de cultivo. Coloración Hematoxilina y eoxina X 400.

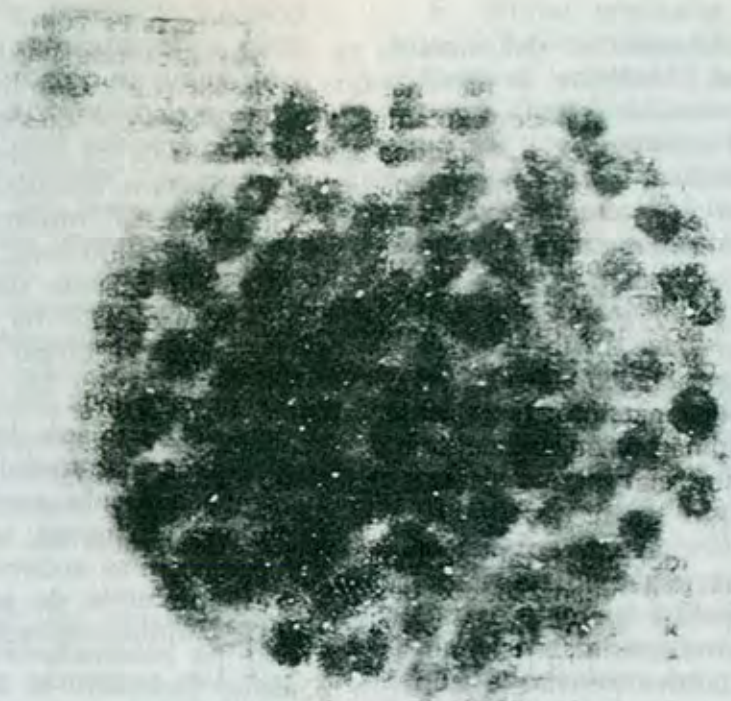


FIG. 35 - El mismo cultivo de la fig. 34. X 800.

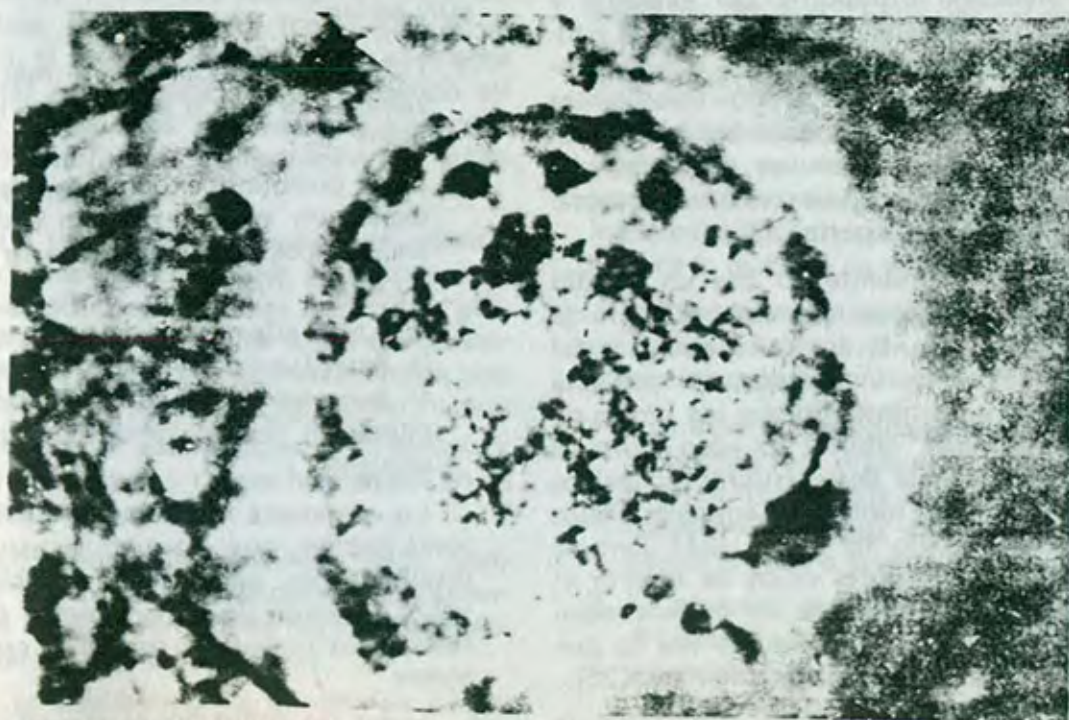


FIG. 36 - Células cultivadas in vitro durante 20 días. las dos células tienen el citoplasma heterogéneo con granulaciones gruesas y finas localizaciones del núcleo; se señala con una flecha en el núcleo que se observan tres nucléolos. Contraste de feses. X 600.

te el 25% del volumen del explante es tejido acinar. Mediante la incubación prolongada se puede llegar a reducir hasta el 1% el volumen total del explante en tejido acinar y al 22o día prácticamente todo el explante acinar ha desaparecido en el medio de cultivo.

Si se piensa en la posibilidad de un trasplante endocrino fetal o neonatal es posible establecer tres hechos frente al tejido insular de adultos:

1. El páncreas neonatal contiene 10 veces más insulina por unidad del tejido sembrado que el páncreas de origen adulto (21).
2. El páncreas endocrino fetal continua diferenciándose y organizándose después del trasplante in-vivo y en el medio de cultivo in-vitro (5-22).
3. El aislamiento de islotes de páncreas neonatal es un pre-requisito para la inyección intraportal del explante y en consecuencia el páncreas total neonatal puede ser inyectado directamente con propósito de iso-trasplantes (21). Por el contrario los islotes del adulto tienen que ser separados del páncreas exocrino antes de ser inyectados en la vena porta (23).

Hasta el presente no hay un estudio concreto que haya reportado el efecto de la edad sobre la transplantabilidad del páncreas endocrino adulto, aunque está claramente demostrado que los islotes de ratas jóvenes adultos pueden corregir la hiperglicemia de receptores isogénicos mientras que islotes de animales viejos no han logrado tal efecto (24). Pero la capacidad de islotes viejos de revertir el estado diabético puede ser logrado manteniéndolo al cultivo de tejido por lo menos 4 horas antes de ser implantado (25).

Muchas investigaciones reportaron la mejoría de la diabetes en roedores en alo-trasplantes (25, 26) de tejido insular pancreático, hay solamente reportes esporádicos de trasplantes es en animales

mayores tales como el cerdo (27) y el mono (28) que han sido mucho menos exitosos por cuanto las técnicas de separación de los islotes en ratas (29) no son fácilmente aplicables a especies mayores. De ahí la importancia de la recuperación de suficiente tejido insular sea factible utilizando páncreas total en el implante lo cual ha sido logrado sin aislamiento específico de los islotes en ratas diabéticas (25, 30).

Por otro lado los fragmentos pancreáticos del perro adulto desprovisto de enzimas exocrinas mediante un cultivo por tiempo reducido, una vez transplantados prolonga su supervivencia y reducen la hiperglicemia de perros pancreatoprivos o estreptozotocínicos (31, 32).

Las preguntas que se hacen quienes trabajan en este campo frente al trasplante de elementos pancreáticos son sin mencionar la parte de la inmunogénica pura serían:

1. ¿Cómo podría dispersarse más efectivamente el tejido pancreático implantado?
2. ¿Será posible que los islotes transplantados con tejido exocrino y sistemas enzimáticos puedan funcionar como un simple injerto?
3. ¿Es el tejido exocrino y sus enzimas la base fundamental del rechazo en el huésped y de la destrucción y/o alteración de los tejidos próximos al implante?

La respuesta sólo puede darla una investigación que contemple estos tres problemas en animales de especies mayores teniendo en consideración que las ratas y los curies no presentan este problema.

Todas las fallas en el trasplante de fragmentos pancreáticos en el adulto (38) conducen a aceptar el concepto de que la preparación ideal para el trasplante es el islote puro (33, 34, 35, 36, 37). Los

métodos hasta hoy usados incluyendo la separación con gradientes de ficoll bajo estereo microscopio, y que fueron usados por nosotros, resultan una pérdida de islotes (39, 40) requieren múltiples dadores para obtener cantidad suficiente de islotes para trasplantes (26, 40) y no se pueden implantar en especies altas (28, 29). Experiencias con trasplantes de fragmentos pancreáticos en el bazo (41) demuestran que la diabetes en el perro definitivamente se mejora por trasplante de fragmentos pancreáticos sin aparición de componentes endocrinos y exocrinos y que el bazo puede aceptar volúmenes grandes de tejido sin detrimento del tejido trasplantado.

La embolización del sistema portal por los islotes trasplantados en ratas (23, 32) aumenta su eficiencia funcional, pero la infusión de grandes fragmentos induce la hipertensión portal en el perro (21). Por eso sería probable el beneficio fisiológico del trasplante en el bazo, si su secreción es drenada al sistema portal por la vena esplénica, siendo así que el bazo es relativamente resistente al deterioro por implantación de tejido exocrino.

Tal resistencia podría estar en relación con la rápida dilución de la enzimas exocrinas por los sinusoides esplénicos, además de que provee una suplencia de sangre ideal y en las experiencias hasta hoy logradas en animales (38) no ha habido compromiso directo arterial ni venoso y siempre se logró buena hemostasis en la mayoría de los casos.

Los experimentos ponen muy claro que animales pancreatóprivos trasplantado el bazo con islotes normalizan completamente su glicemia (42).

Las mediciones de insulina en sangre periférica en vena porta, en vena esplénica serían únicas pruebas para demostrar el efecto de la hipótesis "de vena esplénica".

El último seminario de trasplante beta insulares en diabetes patrocinado por el National Institute of Arthritis, Metabolism and Digestive Diseases (43) establece pautas y recomendaciones muy concretas para futuras investigaciones al respecto. Los temas tratados fueron trasplante de células adultas en animales diabéticos y en el hombre, trasplante fetal de páncreas y neonatal en diabéticos, efecto del trasplante experimental en animales sobre las complicaciones microvasculares en el riñón de ratas diabéticas; efecto del estado diabético sobre los riñones trasplantados en hombres y animales diabéticos; trasplante de islotes como aloinjertos y xenoinjertos, uso de membranas artificiales para mantener in-vitro y trasplantar las células insulares. Como planteamiento general no hay duda, que el trasplante de células insulares es un hecho o factible, biológicamente, en animales de experimentación utilizando implantes de células provenientes de animales adultos, neonatos o fetos y utilizando diversos sitios para el implante de estas células.

El desarrollo de éstos modelos para el trasplante celular implica obviamente amplio conocimiento de los problemas inmunológicos metabólicos, biológicos, etc., de la diabetes en el hombre.

En resumen, las futuras investigaciones en materia de trasplantes insulares pancreáticos son:

1. Los islotes betacelulares pueden aislarse de páncreas difuso de roedores con órganos compactos de primates, parcialmente digeridos y listos para trasplante al bazo o la vena porta.
2. El páncreas fetal de rata o neonatal disperso de rata transplanta con éxito en ratas diabéticas y las llevan a la normoglicemia, siempre que un implante se haga primero a una rata normal y luego a la diabética. Es importante seleccionar el período de la gestación para el explante y el sitio del

- implante en el receptor así como los factores que intervienen sobre el crecimiento y maduración de las células y los factores inmunológicos, todo lo cual necesita estudios de mayor profundidad.
3. El mantenimiento y almacenamiento de los islotes puede lograrse mediante la criopreservación, pero ello implica una alteración secretagoga en post trasplante.
 4. Los efectos metabólicos que no sean la normalización de la glicemia y de la glucosuria y la hiperinsulinemia, así como el establecimiento de la homeostasis hormonal necesitan mayor avance al igual que conocer la actividad replicativa, la comparación del islote, su morfología y el contenido hormonal del islote una vez trasplantado.
 5. El efecto del trasplante sobre las complicaciones vasculares de la diabetes, especialmente las glomerulares y mesangiales, deben ser estudiados de profundidad, por cuanto las ratas diabéticas trasplantadas con riñones normales llevan a la glomeruloesclerosis de uno de los riñones trasplantados.
 6. El rechazo de las células insulares implica aparte del complejo proceso inmune, el conocimiento de si el período de cultivo in-vitro hace posible la remoción o supresión de leucocitos pasajeros que juegan un papel definitivo en el rechazo del trasplante.
 7. No se sabe si el tiempo, las condiciones, la preservación de los cultivos tal como sucede, con la glándula tiroidea, la médula ósea, la piel y el corazón, tenga un éxito inmunológico experimental para alotrasplantes, mediante sistemas de inmunosupresión uno de ellos la irradiación de receptor.
 8. Se han ideado barreras mecánicas para impedir el rechazo usando capilares artificialmente que permiten el funcionamiento y supervivencia de las células en la superficie exterior del capilar artificial.
 9. Finalmente el trasplante humano implica extensos estudios clínicos que deben ser resueltos sobre bases experimentales, clínicas y económicas de gran magnitud y necesitan de personal entrenado con jóvenes investigadores en instituciones muy bien subvencionadas para el desarrollo de un tema tan apasionado y de tan palpitante actualidad.

Agradecemos a los Drs. Agustín Chévez Zamora y Jorge Díaz Osuna (Instituto de Cardiología de México) y a la Lic. Clara López, su colaboración.

SUMMARY

CULTURES OF THE ISLETS OF LANGERHANS, BETA-CELL DIFFERENTIATES, AND THEIR RELATION TO ISO AND ALLO TRANSPLANTS.

Cultured cells from pancreatic islets from normal rats, quinea pig, hamsters and rabbits were utilized to study the factors influencing beta-cell culture in vitro. No hormones were used. The culture medium was ascitic fluid, rooster serum and Tyrode's solution. Developed differentiated islets were identified at the time of the explant. On the 20th day, remarkable granulated cells were seen. A continuous maintenance of the beta, alpha and delta cells was observed after the 16th day along with regression of the acinar cells. The total mass of the explant decreased while the islet mass was relatively unchanged. The beta cells showed a stable and permanent vital state in the culture, according with the experimental animal model. Vacuoles of different sizes showed a possible activity of the beta cells and large numbers of beta granules in the cytoplasm were seen. Distinct nucleoli were observed. The granulated beta cells showed clear cytoplasmic granules in several stains. A possible embryogenic relation between the conglomeration of beta cells in the culture and the morphologic elements of the vascular wall was prominent.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Lazarow A., Wells L., Carpenter A., Hegre O., Leonard R., McEvoy R.: Islet Differentiation, and Transplantation Diabetes 22: 877-909, 1973.
- (2) Lazarow, A., and Heggestad, C. B.: Offspring of animals with experimental diabetes. In Early Diabetes, R.A. Camerini Davalos and H.S. Cole (eds.) New York: Academic Press: 229-37, 1970.
- (3) Carpenter, A. M., and Lazarow, A.: Effects of hiper- and hypoglycemia on beta cell degranulation and glycogen infiltration in normal, subdiabetic and diabetic rats. Diabetes 16: 493-501, 1967.
- (4) Carpenter, A. —M.: Scanning methods: Volume quantitation of tissues, cells, and subcellular components. J. Histochem. Cytochem. 14: 834-41, 1966.
- (5) Hegre, O.D., McEvoy, R. C., Bachelder, W., and Lazarow, A.: The fetal rat pancreas: Differentiation of the islet cell component in vivo and in vitro. Diabetes 22: 577-83, 1973.
- (6) Hegre, O.D.: A study of cultures of pancreases from fetuses of normal and diabetic rats and of such cultures grafted into maternal hosts. Ph. D. Thesis. University of Minnesota.
- (7) Hegre, O.D., Wells, L. J., and Lazarow, A.: Response of beta cells to different levels of glucose: Fetal pancreases grown in organ culture and subsequently transplanted into maternal hosts. Diabetes 19: 906-15, 1970.
- (8) Wells, L. J., and Lazarow, A.: Organ culture of pancreases of fetuses from diabetic rats: Effects of high glucose media upon the granulation Diabetes 16: 846-51, 1967.
- (9) Lillehei, Richard C., Simmons, Richard L., Najarian, John S., Weil, Richard, Uchida, Hisanori, Raíz, José O., Kjellstrands, Carl M., and Goetz, Frederick C.: Pancreaticoduodenal allotransplantation: Experimental and clinical experience. Ann. Surg 172: 405-36, 1970.
- (10) Summerlin, W. T., Miller, G. E., and Good, R. A.: Successful tissue and organ allotransplantation without immunosuppression. J. Clin. Invest. 52: 83a (Abstract: 307), 1973.
- (11) McEvoy, R. C., Hegre, O. D., Leonard, R. J., and Lazarow, A.: The fetal rat pancreas: Differentiation of the acinar cell compone in vivo and in vitro. Diabetes 22:584-89, 1973.
- (12) Strautz, R. L.: Islet implants, reduction of glucose levels in the hereditary obese mouse. Endocrinology 83: 975-78, 1968.
- (13) Wells, L. J., Schweisthal, M. R., Nunamaker, R.: Marx, B. A., McKay, M., Saccoman, F., and Lazarow, A.: Effects of different levels of glucose upon the development of granulated beta cells in cultures of pancreatic primordia from normal rat embryos. Diabetes 16: 839-45, 1967.
- (14) Hilwig, I. S., Hertner, W., and Wasielewski, S. V.: Uber das wachstum der pankreaszellen von saugtieren als monolayer cultures. I. Zuchtungs-methode, Morphologie and Insullingehalt. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 90: 333-46, 1968.
- (15) Goman, H., and Colle, E.: Human pancreatic islets culture: Effects of supplementing the medium with homologous and heterogous serum. Science 192: 1014-16, 1976.
- (16) Hales, C. N., and Randle, P. J.: Inmonoassay of insulin with insulin antibody precipitate. Biochem. J. 88: 137-46, 1963.
- (17) Chick, W. L., Like, A. A., Lauris, V., Gilletti, P. M., Richardson, P. D., Panol, G., Mix, T. W., and Colton, C. K.: A hybrid artificial pancreas. Trans. Am Soc. Artif. Intern. Organs 11: 8-15, 1975.
- (18) Chick, W. L., Like, A. A., Lauris, V.: Beta cell culture on synthetic capillaries: An artificial endocrine pancreas. Science 187: 847-48, 1975.
- (19) Parsa, I., Masch, W. H., and Fitzgerald, P. J.: Pancreas acinar cell differentiation. I. Morphologic and enzymatic comparisons of embryonic rat pancreas and pancreatic anlage grown in organ culture. Am. J. Pathol. 57: 457-87, 1969.
- (20) Rutter, W. J., Kemp, J. D., Gradshaw, W. S., Clark, W. R., Ronzio, R. A., and Sanders T. G.: Regulation of specific protein syntehsis in cytodifferentiation. J. Cell Physiol. 72 (Suppl. 1): 1-18, 1968.

- (21) Matas, A. J., Sutherland, D. E. R., Steffes, M. W., Najarian, J. S.: Short-Term Culture of adult pancreatic fragments for purification and transplantation of islets of Langerhans. *Surgery* 80, 183-191, 1976
- (22) Hegre, O. K., Leonard, R. J., Rusin, J. D., and Lazarow, A.: Transplantation on the fetal rat pancreas: quantitative morphologic analysis of islet tissue grafts. *Anat. Rec.* 185: 209-22, 1976.
- (23) Kemp, C. G., Knight, M. J., Sharp, D. W., Ballinger, W., and Lacy, P. E.: Effect of transplantation site on results of pancreatic islet isografts in diabetic rats. *Diabetologia* 9: 486-91, 1973.
- (24) Selawry, H., Harrison, J., Patipa, M., and Mintz, D.: Pancreatic islet isografts: Effects of age and Organ Culture of Donor islets on Reversal of Diabetes in rats. *Diabetes*, Vol. 27: 625-31, 1978.
- (25) Lacy, P. E., and Kostianovsky, M.: Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes*, Vol. 16: 35-39, 1967.
- (26) Ballinger, W. F., Lacy, P. E.: Transplantation of intact pancreatic islets in rats. *Surgery* 72, 175-186, 1972.
- (27) Slijepcevic, M., Helmke, K., Federlin, K.: Islet transplantation in experimental diabetes of the rat. I. Comparative studies: pancreatectomy - streptozotocin. *Horm. Metab. Res.* 7, 20-25, 1975.
- (28) Sutherland, D. E. R., Steffes, M. N., Bayer, G. E., Mc Manus, D., Noe, B. D., Najarian, J. S.: Isolation of human and porcine islets of langerhans and islet transplantation in pigs. *J. Surg. Res.* 16, 102-111, 1974.
- (29) Sharp, D. W., Murphy, J. J., Newton, W. T., Ballinger, W. F., Lacy, P. E.: Transplantation of islets of Langerhans in diabetic rhesus monkeys, surgery 77, 100-105, 1975.
- (30) Leonard, R. J., Lazarow, A., MxEvoy, R. C., Hegre, O. D.: Islet cell transplation *Kindey Int.* 6 (Suppl 1), 169-178, 1974.
- (31) Matas, A. J., Sutherland, D. E. R., Steffes, M. W., Najarian, J. S.: Islet transplantation using neonatal rat pancreata: Quantitative studies. *J. Surg. Res.* 20, 143-147, 1976.
- (32) Matas, A. J., Sutherland, D. E. R., Steffes, M. W., Najarian, J. S.: Islet transplantation using neonatal rat pancreata: Quantitative studies, *J. Surg. Res.* 20, 143-147, 1976.
- (33) Lacy, P. E.: Pathology of the islets of Langerhans. In *Pathology Annual. Voll Sommers, S. C.*, Ed. New York, Appleton-Century-Crofts, 1966, pp. 352-70.
- (34) Warren, S., LeCompte, P. M., and Legg, M. A.: Pathology of Diabetes Mellitus. Fourth edit. Chapter 3. Philadelphia. Lea & Febiger, 1966, pp. 53-88.
- (35) Lacy, P. E.: The islets of Langerhans. In *Endocrine Pathology. Bloodworth, J. M. B., Jr.*, Ed. Baltimore, Williams and Wilkins, 1968, pp. 316-29.
- (36) Steiner, H.: Morphology of diabetes mellitus. In *Clinical Endocrinology. Third edit. Chapter 13.* Labhart, A., Ed, New York, Heidelberg, abd Berlin, Springer Verlag, 1974, pp 764-67.
- (37) Williams, R. H., and Porte, D. Jr.: The pancreas. Pathology. In *Textbook of Endocrinology-Fifth.* Williams, R. H., Ed. Philadelphia, W. B., Saunders, 1974, pp. 566-67.
- (38) Brooks, J.: *Endocrine Tissue Transplantation*, pp. 83-85. Springfield: Charles Thomas 1962.
- (39) Lacy, P. E., Kostianovsky, M.: Method for the rat pancreas. *Diabetes* 16, 35-39, 1967.
- (40) Matas, A. J., Sutherland, D. E. R., Najarian, J. S.: Current of islet and pancreas transplantation in diabetes. *Diabetes* 25, 785-795, 1976.
- (41) Mirkovich, V., Campiche, M.: Successful intransplenic autotransplantation of pancreatic tissue in totally pancreatectomized dogs. *Transplantation* 21, 265-26-9, 1976.
- (42) Kretschmer, G. J., Sutherland, D. E. R., Matas, A. J., Steffes, M. W., and Najarian, J. S.: The dispersed pancreas: transplation without islet purification in totall y pancreatectomized dogs. *Diabetologia* 13, 495-502, 1977.
- (43) National Institute of Arthritis, Metabolism, and Digestive Diseases and held at the National Institutes of Health in Bethesda, Maryland, on November 29 and 30, 1977. Summary by Paul E. Lacy, *Diabetes* Vol. 27: 427-429, 1978.
- (44) Hultman E.: Direct colorimetric for "True Glucose" determination in blood and other biological fluids. *Nature* 183: 108, 1959.