

# Uso de filtros de nylon. Nueva técnica para aislamiento de islotes pancreáticos en un modelo de experimentación canino. Estandarización de la técnica

JAIME BERNAL<sup>1</sup>  
 FERNANDO MARTÍNEZ<sup>1</sup>  
 FRANCISCO HENAO<sup>2</sup>  
 HÉCTOR PULIDO  
 GILBERTO MEJÍA  
 CARLOS BENAVIDES<sup>2</sup>  
 GABRIEL JAIME ECHEVERRI<sup>2</sup>  
 ANA MARÍA URIBE<sup>3</sup>  
 SEBASTIÁN DAÑOBEITIA<sup>1</sup>

## Resumen

El trasplante de islotes de páncreas es un campo en desarrollo para el tratamiento de la Diabetes Mellitus. En la actualidad, la técnica de aislamiento es un proceso complejo que todavía tiene algunos problemas. Dos de los problemas que encontramos son el alto costo del procedimiento y la toxicidad celular por el uso de Ficoll durante la purificación de islotes pancreáticos de Langerhans. Hemos centrado nuestros esfuerzos en reducir el costo del procedimiento y la lesión celular mediante el uso de filtros de nylon como una alternativa al gradiente de Ficoll para mejorar los resultados de aislamiento de islotes en un modelo animal.

**Palabras clave:** Diabetes Mellitus, islotes pancreáticos de Langerhans, trasplante.

## Title:

Nylon filters, a new technique for the pancreas islet isolation in a canine research model, a technical standardization

---

1 Instituto de Genética Humana, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia.

2 Departamento de Cirugía, Hospital Universitario San Ignacio, Bogotá, D.C., Colombia.

3 Departamento de Patología, Hospital Universitario San Ignacio, Bogotá, D.C., Colombia.

Recibido: 01-06-2009

Revisado: 15-07-2009

Aceptado: 01-09-2009

## Abstract

Pancreas islet transplantation is a developing field for the treatment of diabetes mellitus. Currently the isolation technique is a complex process that still has some problems to overcome. Two of the problems we addressed were the high cost of the procedure and the cellular toxicity derived from Ficoll use during purification of pancreatic islets of Langerhans during the isolation procedure. We focused our efforts in reducing both the cost of the procedure and cellular injury by using nylon filters as an alternative to Ficoll gradient purification and improving the outcome of islet isolation in a large animal model.

**Key words:** Diabetes Mellitus, transplantation.

## Introducción

Para los pacientes con diabetes tipo 1 en Colombia que sufren de hipoglucemias, labilidad de la glucemia o progresión rápida de las complicaciones de la diabetes, el tratamiento con insulina exógena recombinada no es la mejor respuesta para sus problemas[1].

Para poder ofrecerles un tratamiento más fisiológico a su trastorno metabólico, una de las respuestas es el trasplante de islotes de Langerhans. Lo que busca el trasplante es reemplazar las células beta no funcionantes por nuevas, que le den al paciente un control constante de la glucemia para no tener picos de hiperglucemia o hipoglucemia que pongan en riesgo la vida del paciente. Para poder realizar este trasplante hay que rescatar el páncreas de un donante y procesarlo

para poder aislar los islotes que después serán trasplantados.

Actualmente, en Colombia sólo la Universidad de Valle del Cauca realiza el aislamiento de los islotes pancreáticos en una fase de investigación, pero dada la gran demanda y el amplio territorio de nuestro país, un solo centro no basta para poder implementar este tratamiento en las personas que lo necesitan.

Por esta razón, iniciamos la investigación en el aislamiento de los islotes de Langerhans para brindarles esta tecnología a los pacientes que acuden a los servicios de salud del país.

## Diabetes mellitus

La diabetes es una enfermedad metabólica que se caracteriza por niveles elevados de glucosa en plasma: más de 126 g/dl, preprandial, y más de 200 g/dl, posprandial.

La diabetes se divide en tipo 1 y tipo 2. La diabetes tipo 1 se caracteriza por deficiencia en la producción de insulina y tendencia a la cetoacidosis; se divide en los tipos 1A y 1B. En la diabetes tipo 1 A se conocen marcadores de autoinmunidad y en la tipo 1B no (2).

La diabetes tipo 2 se caracteriza por resistencia periférica a la insulina, disminución de la secreción de

insulina y aumento en la producción de glucosa.

En el mundo, aproximadamente, 6% de la población es diabética, y de ellos, 90% son del tipo 2. En Colombia, se habla que hay cerca de 2'400.000 diabéticos. La diabetes tipo 1 es una enfermedad muy costosa para el sistema de salud colombiano. Tratar a un diabético tipo 1 al año cuesta, aproximadamente, \$ 3'196.000, sin contar con que la diabetes es la principal causa de falla renal crónica que requiere diálisis y que el costo de ésta podría elevarse, aproximadamente, a \$50'400.000 al año.

### **Páncreas exocrino y endocrino**

El páncreas es una glándula que se encuentra dividida en una porción que hace parte del sistema endocrino y otra, del exocrino.

Los acinos conforman la unidad del sistema exocrino, el cual produce las enzimas pancreáticas (tripsina, quimiotripsina, carboxipeptidasa, lipasa, etc.) que son llevadas por el conducto pancreático hasta el duodeno.

Los islotes de Langerhans son la estructura básica del sistema endocrino del páncreas. Hay 1'000.000 de ellos, aproximadamente, en cada páncreas humano. En sus células se producen hormonas que se distribuyen

por el torrente sanguíneo para producir una respuesta en células distantes.

Las células beta producen la insulina y constituyen el 70% del islote de Langerhans; las células alfa producen el glucagón y son el 20%; las células delta producen la somatostatina y son el 5%; las células gamma producen la gastrina y son el 1% y, por último, las células PP producen el péptido pancreático y son el 1% (3).

### **Insulina**

La insulina es una hormona que al principio es producida como preproinsulina, un péptido continuo de 86 aminoácidos que, luego de ser escindido enzimáticamente, se transforma en proinsulina, que es un péptido compuesto por tres porciones, A, B y C. En el paso final en la producción se libera el segmento C de 33 aminoácidos y quedan sólo el segmento A de 21 aminoácidos y el B de 30 aminoácidos. El péptido C es empaquetado en los gránulos con la insulina; eso quiere decir que por cada molécula de insulina liberada, se libera otra del péptido C al torrente sanguíneo.

La célula beta es capaz de identificar el nivel de glucemia sanguínea y liberar insulina para disminuir su concentración en sangre y detener la secreción cuando llega a su punto óptimo.

Esto lo logra gracias al transportador de membrana GLUTS 2 que permite la entrada de glucosa a la célula; la glucosa se transforma en la mitocondria en ATP/ADP, que activa el receptor de sulfonilurea (sitio SUR); éste permite la salida de K que produce despolarización de la membrana y hace que los canales de calcio dependientes de voltaje se abran y dejen entrar el calcio extracelular que, finalmente, produce la liberación de insulina.

La insulina sirve para que los tejidos, como el músculo esquelético, el tejido adiposo, el hígado y el riñón, puedan introducir la glucosa a su citoplasma y utilizarla para producir energía.

La insulina estimula al receptor de insulina que, mediante segundos mensajeros intracelulares, estimula la mitosis, la síntesis de proteína, la síntesis de glucógeno y el transporte de glucosa, al incrementar los factores de transcripción de otro transportador de membrana el GLUT 4, que es el encargado de transportar la glucosa al interior de la célula.

Cuando hay un déficit de insulina, la glucosa no puede entrar a las células y permanece en el torrente sanguíneo aumentando el nivel de glucemia. Esto es lo que produce todas las complicaciones que se asocian con la diabetes, como el estado cetoacidótico o

hiperosmolar, la ateromatosis, la retinopatía diabética, la nefropatía, los trastornos inmunitarios y el daño general de toda la microvasculatura.

Los pacientes que sufren diabetes tipo 1 necesitan la insulina exógena para poder vivir. Sin ella, sus células no podrían tener acceso a la glucosa, no podrían producir energía y, además, entrarían en un estado cetoacidótico.

La administración de insulina exógena es muy efectiva en la mayoría de pacientes, pero exige una gran disciplina y cuidado en los controles de glucemia, en la dieta, en la clase de insulina que se deben aplicar y en el momento del día cuando se la deben aplicar, para tratar de simular la fisiología de la glucosa en el organismo.

En algunos pacientes es muy difícil el manejo de la glucemia, ya que pueden presentar picos de hiperglucemia o episodios muy peligrosos de hipoglucemia. La meta de la imitación fisiológica con estos pacientes es casi imposible, ya que no se cuenta con sensores internos que informen exactamente el comportamiento de la glucosa todo el tiempo. En ellos, las complicaciones de la diabetes aparecen más rápidamente que en los demás pacientes, dado el mal control de la glucemia[2].

En estos casos, la esperanza de poder tener una mejor calidad de vida es el trasplante de células beta aisladas o el trasplante del páncreas completo, que les permita una mejor regulación de la glucosa en sangre, ya que las células beta nuevas serían las encargadas de liberar la insulina cuando capten que la necesite el cuerpo y de dejar de hacerlo cuando los niveles de glucosa sean óptimos[7].

### Trasplante de células beta

Los primeros estudios en trasplante de tejido pancreático se iniciaron en 1893. Veintinueve años antes del descubrimiento de la insulina por Banting y Best, el doctor Williams y su colega, el cirujano Harsant, trataron un joven de 15 años en la enfermería del *Bristol Royal Hospital* con implantes subcutáneos de fragmentos de páncreas de ovejas; no lograron el control de la glucemia y encontraron tejido fibroso en el estudio histológico *post mortem*. Pybus informó dos pacientes diabéticos a quienes se les implantaron fragmentos subcutáneos de páncreas humano; en uno de ellos se logró eliminar la glucosuria[18].

Los trasplantes de páncreas se iniciaron en 1972. Sin embargo, no eran lo suficientemente exitosos como para permitir a los diabéticos ser independientes de la insulina por periodos prolongados, pues los medicamentos inmunosupresores y las técnicas para

obtener células del páncreas no eran los más adecuados.

El primer problema era la escasa obtención de células de los páncreas. La respuesta que inició el cambio se debe a Camilo Ricordi, quien introdujo el método automatizado. Éste consiste en canalizar el conducto pancreático e infundir por él colagenasa, que digiere la porción exocrina del páncreas y deja la endocrina sin alteraciones. El páncreas se coloca luego en la cámara de Ricordi, que consiste en una máquina estéril en su interior que absorbe los islotes de Langerhans que están siendo liberados y los coloca en un recipiente aparte, para que no sean lesionados por la excesiva exposición a la colagenasa, ni sean dañados al ser separados y recogidos por medios mecánicos [4, 5 ].

Una vez obtenidos, los islotes se purifican para asegurarse de que sean del tamaño apropiado para implantarlos. Esto se hace mediante un sistema de aféresis (modelo 2991 COBE Laboratories) que hace pasar los islotes por unos gradientes continuos de Ficoll-ácido diatrizoídico. Esto permite que los islotes sean separados por densidades y los más puros, que serán usados en el trasplante, queden en la parte superior. Se considera que son aptos para trasplante cuando el número de islotes aislados sobrepasa los 4.000 por kg de peso del receptor, se encuentran empaquetados y alcanzan

un volumen menor de 10 ml. La preparación final de islotes se suspende en 120 ml de medio que contiene 500 unidades de heparina y 20% de albúmina humana[4-6].

Los islotes se implantan en los sinusoides del sistema porta del hígado. El abordaje se hace bajo visión fluoroscópica o ecográfica, mediante un catéter Kumpe 5F que se coloca en la rama derecha de la vena porta y se avanza hasta la porta común. Al llegar allí, se infunde la preparación en un tiempo de 5 minutos. La presión de la vena porta se mide al inicio y al final de la infusión[4-6]. Actualmente se cuestiona la implantación en el sistema porta, por sus bajas concentraciones de oxígeno ( $PO_2$  cercana a 10 mm Hg) y la respuesta inmune que se desata de inmediato con la instilación de los islotes en el torrente sanguíneo.

El segundo problema radicaba en la inmunosupresión. Como las células beta del donante trasplantadas poseen un complejo mayor de histocompatibilidad diferente al del receptor, hay que administrar inmunosupresores para evitar la destrucción de las células por parte del sistema inmune del receptor.

La mayoría de los inmunosupresores elevan la glucosa o aumentan la resistencia periférica a la insulina. El mundo recibió la respuesta en 2000, cuando un grupo de la Universidad de

Alberta en Edmonton, Canadá, introdujo un esquema de inmunosupresión libre de glucocorticoide. Este protocolo consiste en administrar al paciente una dosis de carga por vía oral de sirolimus, 0,2 mg/kg, seguida por una dosis diaria de 0,1 mg/kg, con control de los niveles plasmáticos para mantenerlos entre 12 y 15 ng/ml los primeros tres meses, y luego, ajustar la dosis para mantenerlos entre 7 y 10 ng/ml; una dosis inicial por vía oral de tacrolimus, 1 mg cada 12 horas, y luego ajustar la dosis para mantener el nivel plasmático del fármaco entre 3 y 6 ng/ml; y dosis de daclizumab de 1 mg/kg, cada 14 días, para un total de cinco dosis[4-6].

Con este nuevo protocolo de inmunosupresión se logró aumentar la supervivencia del injerto. Para lograr la independencia de la insulina en la diabetes tipo 1, se requieren, aproximadamente, 11.000 islotes por kg de peso del receptor. Esto quiere decir que los pacientes necesitan recibir dos trasplantes de dos órganos diferentes, para lograr esta meta.

En el grupo de Edmonton, el 80% de los que logran independizarse de la insulina continúa en esa condición al cabo del primer año[4-6].

Esta técnica todavía está catalogada por la *Food and Drug Administration* (FDA) como terapia experimental para el tratamiento de la diabetes tipo

1 y se encuentra reservada para los centros que la están desarrollando para quienes sufren de hipoglucemia, labilidad de la glucemia o progresión rápida de las complicaciones de la diabetes. Sin embargo, para este grupo de pacientes esta técnica representa la única alternativa para poder mejorar su calidad de vida y evitar las complicaciones de su enfermedad[7, 8].

Cada paso en el aislamiento de los islotes es crítico y es de vital importancia cuidar cada uno de ellos. No obstante, en el que hay mayor controversia es en la purificación de los islotes después de haberse dissociado el páncreas con la colagenasa. En el mundo entero hay varios grupos trabajando en diferentes tipos de purificación. Uno de los más usados es el sistema de aféresis COBE 2991, que utiliza gradientes de Ficoll continuo[1]; otros grupos usan gradientes de Ficoll continuo en forma manual[10]. El grupo de *Yale University* (Paolo Salvalaggio, David Rothstein, *et al.*) utiliza otra técnica con filtros de naylon, pues argumentan que el Ficoll es tóxico para los islotes. En Holanda, un grupo utiliza óxido ferroso al perfundir la solución de preservación en la aorta, para que permanezca unido a los sinusoides de los islotes; en el momento de la purificación, se utiliza un imán para separar los islotes por la carga magnética del hierro que hay en ellos[17].

En los últimos reportes de los grandes grupos que trabajan en la investigación clínica en humanos, se presentan resultados desalentadores, que muestran que la mayor parte de los pacientes tratados con trasplante de islotes requieren nuevamente del uso de insulina después del tercer año del trasplante[19-21].

### **Diabetes en perros y gatos**

Los perros y los gatos, como mamíferos que son, también sufren diabetes mellitus tipos 1 y 2, con la misma fisiopatología que en los humanos.

La diabetes tipo 1 es causada por la destrucción progresiva de los islotes de Langerhans por una causa inmunológica comprobable o no. La diabetes tipo 2 se caracteriza por resistencia periférica de la insulina, disminución en su secreción y aumento de la glucemia plasmática. En estas dos especies, gatos y perros, se desconocen su incidencia anual o prevalencia exacta, debido a la vasta población y la baja cobertura médico-veterinaria; sólo se cuenta con la estadística extrapolada de la epidemiología humana.

Debido a esto, es difícil encontrar individuos con diabetes tipo 1 en la especie canina para poder evaluar el impacto metabólico en ellos. Para simular el estado de falla de las células

beta y estudiar su impacto metabólico en los perros, se extrae quirúrgicamente el páncreas o se usa un fármaco llamado estreptozotocin, en dosis única de 200 mg/kg por vía intraperitoneal, que destruye los islotes de Langerhans y convierte al sujeto en diabético tipo 1. Algunos autores consideran que este segundo sistema de simulación es mejor, ya que permite que el perro continúe con el funcionamiento fisiológico de su páncreas exocrino, sin alterar la absorción de nutrientes[9, 14].

## Materiales y métodos

### Rescate del páncreas

Los 5 perros que hicieron parte de la fase inicial del estudio fueron donados por la perrera municipal, según el acuerdo que existe con la Facultad de Medicina, en el cual los perros que van a sacrificarse son donados para cirugía experimental. Se aplicó el principio de las tres erres de Russell y Burch: *reduction*, reducción del número de animales en el experimento al mínimo necesario; *refinement*, refinamiento de las técnicas empleadas; y *replacement*, remplazo, si es posible, del modelo animal por otro no vivo. Además, se siguieron las indicaciones de las guías para el uso y cuidado de animales en investigación del *United States Department of Agriculture (USDA)* y del *National Institute of Health (NIH)*[22-24].

Los perros fueron llevados una cada semana al laboratorio de cirugía experimental. Allí recibieron anestesia con pentotal sódico por vía intravenosa y se sometieron a laparotomía por línea media y pancreatometomía total con preservación del conducto pancreático. Previamente a su extracción, el órgano se perfundió por la aorta abdominal con solución HTK-Custodiol® a 4°C, donada por el laboratorio Amarey-Novamedical[12-16]. Después de la cirugía, cada animal se sacrificó mediante infusión de una sobredosis de pentotal intravenoso.

### Técnica quirúrgica

- Posición en decúbito supino y miembros inmovilizados
- Sedación y anestesia según el protocolo
- Vena periférica canalizada con solución salina normal
- Laparotomía mediana supraumbilical e infraumbilical con extensiones laterales y puntos de fijación con seda
- Evisceración
- Identificación de la aorta y reparo con doble seda 2-0
- Identificación de la arteria mesentérica inferior, reparo con seda 2-0
- Identificación de la vena cava, reparo con seda 2-0



- Esplenectomía, ligadura de vasos cortos y arteria esplénica distal al páncreas con seda 2-0
- Identificación y reparo de vasos renales bilaterales, identificación de la arteria gástrica izquierda y reparo con seda 2-0
- Identificación y reparo de la arteria hepática
- Reparos con hiladillo del píloro y el duodeno a la altura de la finalización del tejido pancreático
- Colocación de cánula en la aorta y fijación con sonda de nélaton; previamente se purga la línea con HTK-Custodiol®, a 4°C.
- Colocación de cánula en la vena cava y tubo de tórax pediátrico, ligadura de vasos y aorta proximal
- Formación de neumotórax, perfusión de la aorta distal
- Colocación de hielo molido en la cavidad peritoneal
- Corte a nivel del píloro y del duodeno
- Disección y corte con tijera de Mayo del páncreas con duodeno, apertura antimesentérica en la mesa e identificación del **conducto pancreático**, colocación de yelco y fijación de éste con seda 3-0. A continuación se introduce el páncreas en tres bolsas estériles con líquido de perfusión

### Aislamiento de los islotes

El páncreas se llevó al Instituto de Genética, donde se canalizó el conducto pancreático, se le infundió colagenasa (Sigma tipo V)® por el conducto pancreático para digerir el componente exocrino y dejar el endocrino sin alteraciones y, mediante disociación mecánica, se separaron estos componentes[13].

### Purificación de los islotes

*Técnica de filtros de nylon.* Se dividió el tejido pancreático en tubos con 50 ml de preparación cruda; ésta se hizo pasar por un colador de células de nylon de 100 µm. El colador se lavó con 50 ml de HBSS, se puso boca abajo y, posteriormente, se lavó con 30 ml de HBSS, para luego recibir los islotes en una caja de Petri[9].

### Estudio de los islotes

Una vez obtenidos los islotes, se valoró la cantidad de islotes que se obtuvieron y el grado de pureza con ditizone (difetil-tiocarbazono). El reactivo colorea los islotes de Langerhans de un color rojo característico; de esa manera, se pueden calcular la pureza y la cantidad de los islotes que se recuperaron. Se contaron los islotes que tuvieran 150 µm de diámetro[5].

## Resultados

Nuestro objetivo fue estandarizar la técnica quirúrgica y la técnica de extracción de islotes. La extracción del órgano se realizó en las salas de cirugía experimental y el proceso de “colagenización”, en los laboratorios del Instituto de Genética Humana. Todo el proceso se hizo de acuerdo con el protocolo, inscrito ante la Vicerrectoría Académica de la Pontificia Universidad Javeriana: [http://portal2.javeriana.edu.co/psp/eppro/OFI/PSFT\\_EP/c/UJ\\_LOCALIZACION\\_SIU.UJG\\_PAGELET\\_PROP2.GBL?Page=UJG\\_PROY\\_AWD\\_PROYOYP&Action=U&PROJECT\\_ID=000263&PROPOSAL\\_ID=00000250&Action=U](http://portal2.javeriana.edu.co/psp/eppro/OFI/PSFT_EP/c/UJ_LOCALIZACION_SIU.UJG_PAGELET_PROP2.GBL?Page=UJG_PROY_AWD_PROYOYP&Action=U&PROJECT_ID=000263&PROPOSAL_ID=00000250&Action=U). Además, contamos con el concurso del área de patología, donde se estandarizó la técnica para las coloraciones celulares (nuevas en el departamento) necesarias para poder contabilizar y observar las células.

Se llevaron a cabo cinco prácticas en perros y se logró optimizar el rescate para poder utilizar sólo 400 ml en el órgano y 100 ml en la bolsa de transporte de la solución de HTK-Custodiol®.

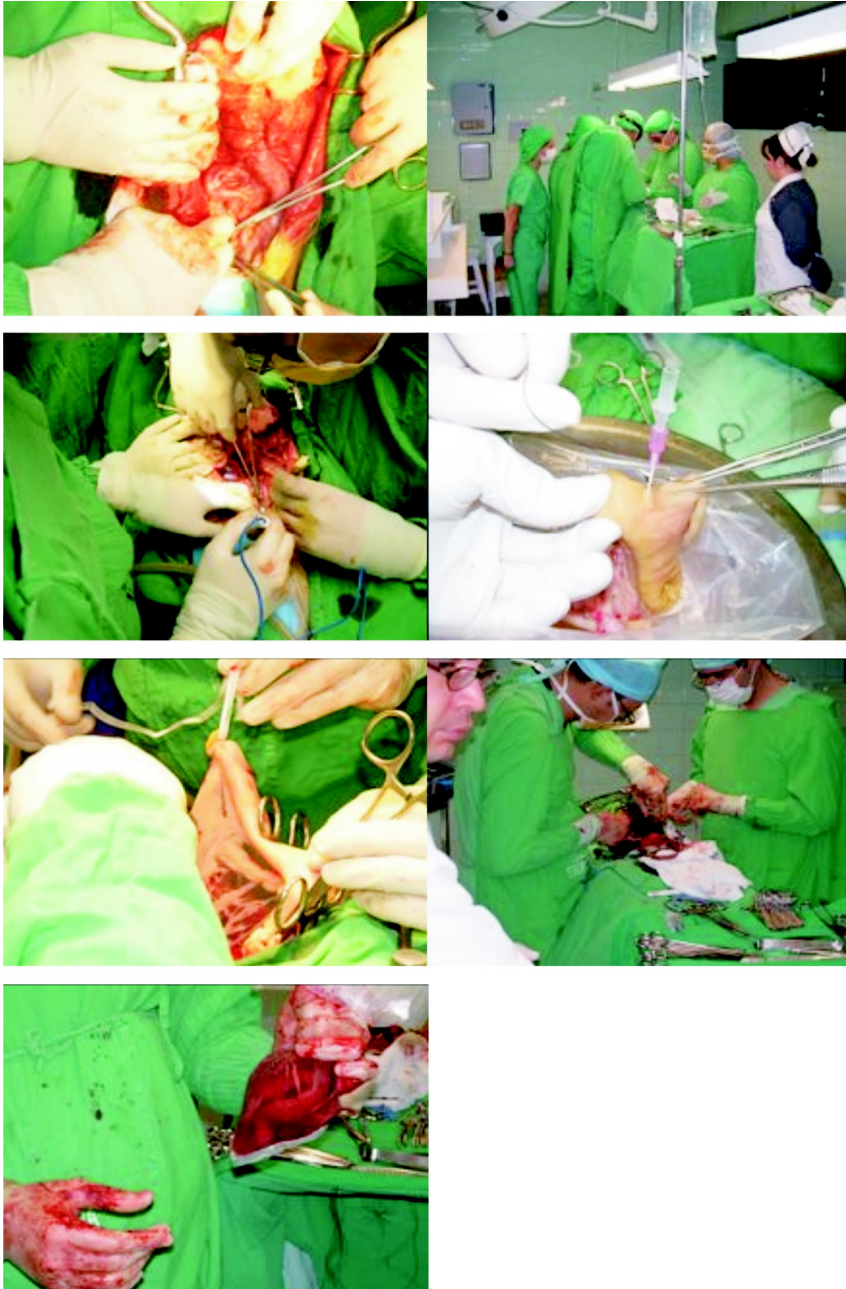
En la cirugía de banco (Instituto de Genética Humana) se retiró el tejido conectivo que permanecía adherido al órgano retirando y el bazo, y se canalizó la papila con un yelco número 16 ó 18, el cual se fijó con un punto de seda.

Se descartó un perro que falleció antes del procedimiento debido a complicaciones relacionadas con la anestesia.

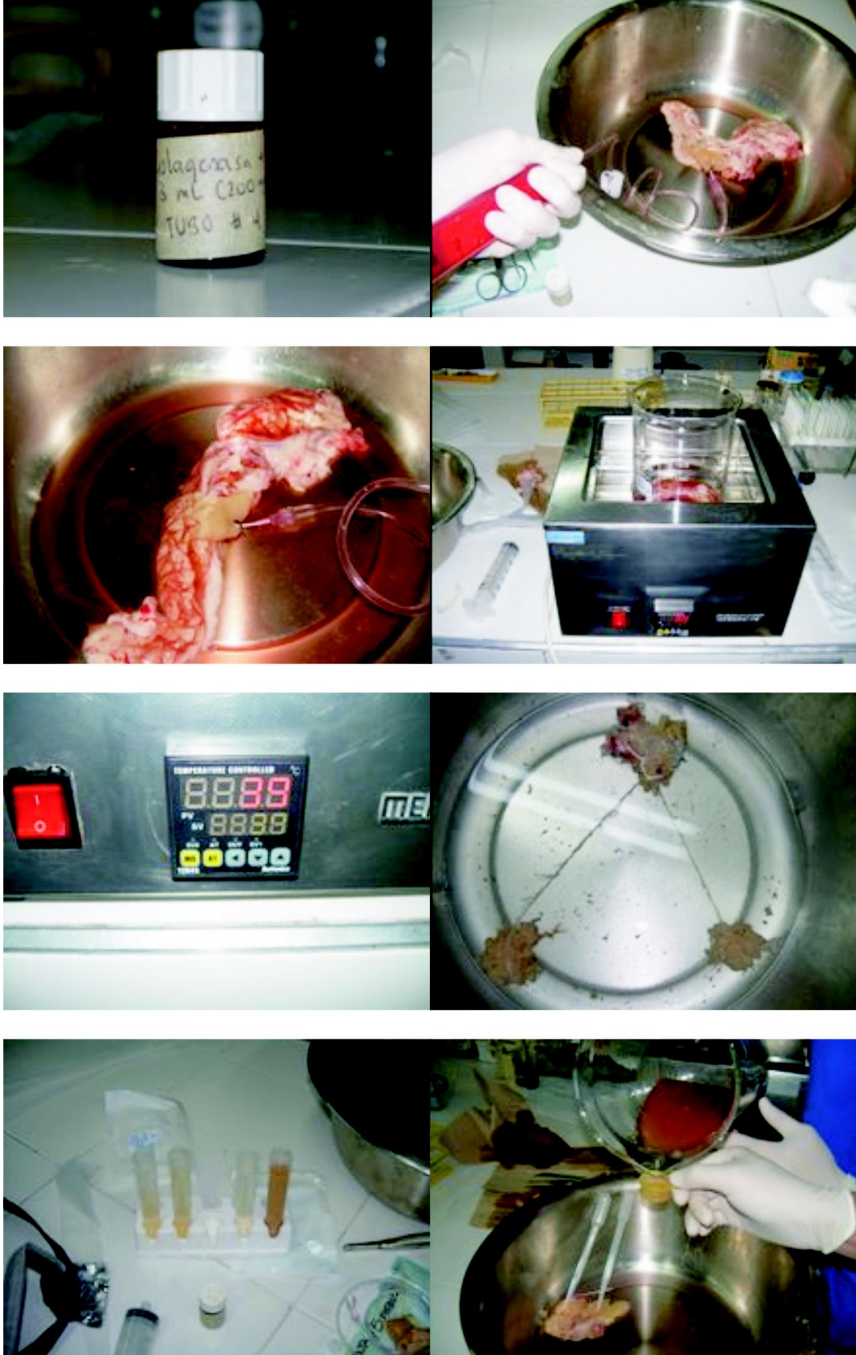
Posteriormente, se pesó el órgano y se administraron 2 mg de enzima por cada gramo de páncreas. Se suspendió la enzima en 200 ml de solución de Hank y se procedió a distender la glándula con la solución. Se inyectó

**Tabla 1**  
**Resultados**

No.	Peso del animal (kg)	Peso del páncreas (g)	Resultados
1	10	65	Identificado un conducto malo
2	13	74	Dos conductos, buena celularidad, 1.500 conglomerados
3	11	63	Canalización de la papila, buena celularidad,
		18.	500 células vivas
4	14	67	Vía biliar, un conducto, mala celularidad
5	10	73	Canalización de la papila, escasa celularidad



**Figura 1.** Estandarización de la técnica quirúrgica. a) Laparotomía y disección de grandes vasos. b) Sala de cirugía experimental, técnica de asepsia y antisepsia. c) Identificación y canalización de grandes vasos. d) Canalización del conducto pancreático. e) Perfusión del órgano con HTK-Custodiol®. f) Participación interdisciplinaria. g) Almacenamiento del órgano en bolsas estériles para ser transportado al Instituto de Genética Humana.



**Figura 2.** a) Colagenasa. b) y c) Infusión de la colagenasa en el conducto pancreático. d) y e) Digestión a 37°C. f) Órgano digerido. g) Alícuotas de tejido digerido. h) Filtración del tejido con los filtros de naylon.

retrogradamente con una jeringa por el conducto pancreático, para que la colagenasa/liberasa digiriera el tejido exocrino, dejando libre el tejido endocrino.

Se introdujo, luego, la glándula en un baño de María para mantener constante la temperatura a 37°C, pues la enzima sólo se activa a esta temperatura.

Se hizo la purificación con el método de los coladores de células de nylon, con poros de 100 µm, de acuerdo con lo propuesto en nuestro protocolo.

## Resultados adicionales

Se logró estandarizar la técnica quirúrgica, identificar las variantes anatómicas del páncreas en el perro identificado como un páncreas *divisum*, con dos conductos pancreáticos mayores que desembocaban la

mayoría de las veces a un conducto principal, y estandarizar la técnica de laboratorio hasta la “colagenización” del páncreas, la cual es prometedora en cuanto a la disminución realmente notable de los costos de la purificación de las células así como el aparente beneficio en cuanto a su función.

Los resultados son desalentadores en cuanto a la posibilidad de conseguir concentraciones adecuadas de células, lo cual podría estar relacionado con el tipo de filtro utilizado o con el tejido pancreático del perro *per se* (Tabla 1). Sin embargo, se pudo realizar una adecuada extracción del páncreas con viabilidad celular.

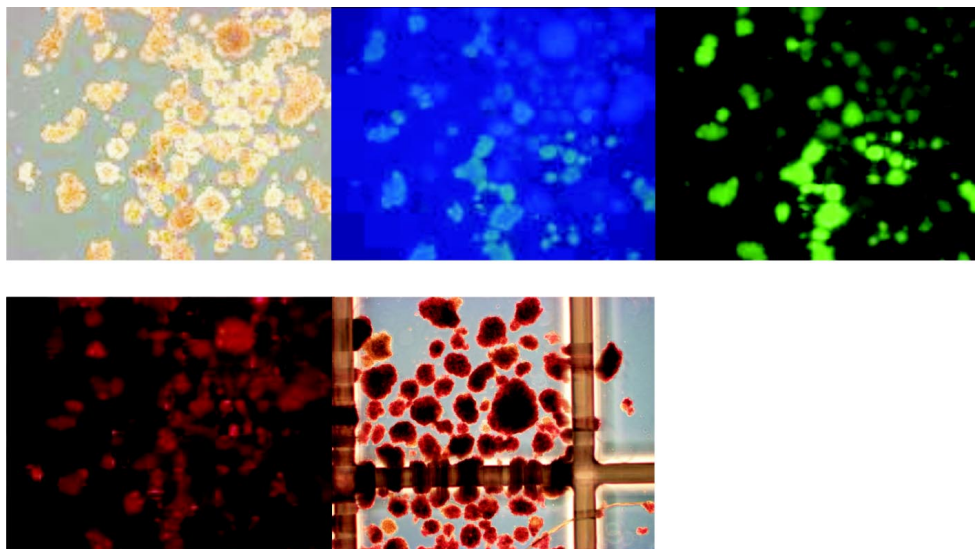
## Conclusiones

Este experimento inicial de estandarización de la técnica de extracción de islotes pancreáticos en perros, permitió la creación de un protocolo de investigación desde la idea primaria



Figura 3 a y b. Filtros de nylon.





**Figura 4.** tinciones especiales: a) vision directa, b) Autofluorescencia por NADPH (Status Metabolico). c) Verde (viabilidad), Propidium Iodide – d) Rojo Oscuro (necrosis) y e) Ditzona. Diacetato de fluoresceína.

hasta su formalización ante un comité de investigación. El acercamiento a la investigación en modelos animales y a los estándares mundiales relacionados con esta área, permitió una sana discusión académica sobre la utilidad de este tipo de experimentos en la formación global del residente de cirugía.

La pancreatometomía del perro con fines de donación y su posterior sacrificio, no estaban claramente identificados en la literatura médica, lo que permitirá en el futuro agilizar el proceso en cuanto a la técnica quirúrgica en esta materia. El trabajo en conjunto con el Instituto de Genética, permitió un adecuado ensamble multidisciplinario que aportó día a día ideas innovadoras y soluciones claras a cada uno de los

problemas presentados durante el proceso de la investigación.

La estandarización del procedimiento de laboratorio en la extracción de los islotes, así como el proceso de medición de su calidad por parte de la unidad de patología, permitieron un enriquecimiento mutuo en cuanto la utilización de nuevas técnicas de coloración, como la ditzona, y la visualización de nuevas coloraciones que evaluaban la morfología y la función de las células.

Durante la revisión de la literatura y la consulta con expertos de otros centros con más experiencia, se logró determinar que una de las razones para el fracaso con la purificación con este

método es que la citoarquitectura de los islotes de Langerhans de los mamíferos superiores, como el del perro y el humano, se encuentran en conglomerados que, al ser pasados por el colador, no se pueden separar del resto de las células.

Es por esta razón que podríamos sugerir descartar el uso viable para purificación de los islotes de Langerhans de los coladores de 100  $\mu\text{m}$  que, aunque sugerían una aproximación nueva con disminución radical en los costos del procesamiento del páncreas y daños deletéreos del Ficoll sobre las células, se encontró que no es efectivo al ponerse en práctica.

## Agradecimientos

Agradecemos la participación de la Unidad de Cirugía Experimental de la Pontificia Universidad Javeriana, al personal de laboratorio del Instituto de Genética Humana y al personal de salas de cirugía e instrumentación del Hospital Universitario San Ignacio, sin quienes hubiera sido imposible realizar este experimento.

## Bibliografía

1. Shapiro AMJ, Lakey JRT, Korb G, Coth EL, Warnock GL, Kneteman NM, *et al.* Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med.* 2000;343(4):230-8.
2. Foster DW. Diabetes Mellitus. In: Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, *et al.*, Eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine.* 14 ed. Madrid. McGraw-Hill, 1998: 2641-64.
3. Gartner L. Sistema endocrino. En: Gartner L, Hiatt J. *Histología de Gartner.* 3 ed. Madrid. McGraw-Hill, 2008;289-310.
4. Ricordi C, Lacy PE, Scharp DW. Automated islet isolation from human pancreas. *Diabetes.* 1989;38(Suppl.1): 140-2.
5. Ricordi C. Islet transplantation: a brave New World. *Diabetes.* 2003;52:1595-603.
6. Ryan EA, Lakey JRT, Paty BW, Imes S, Korb G, Kneteman NM, *et al.* Successful islet transplantation. Continue insulin reserve provides long-term glycemic control. *Diabetes.* 2002; 51:2148-57.
7. Couzin J. Islet transplants face test of time. *Science.* 2004;306:34-7.
8. Eckhard M, Brandhorst D, Brendel MD, Bretzel RG. Optimization in osmolality and range of density of a continuous Ficoll-sodium-diatrizoate gradient for isopycnic purification of isolated human islets. *Transplantation Proceedings.* 2004;36(9):2849-54.
9. Salvalaggio PR, Deng S, Ariyan CE, Millet I, Zawlich WS, Basadonna GP, *et al.* Islet filtration: A simple and rapid new purification procedure that avoids Ficoll and improves islet mass and function. *Transplantation.* 2002;74:877-900.
10. Bugliani M, Lupi R, Del Guerra S, Boggi U, Maslli L, Sbrana S, *et al.* An alternative and simple method to consistently prepare viable isolated human

- islets for clinical transplantation. *Transplantation Proceedings*. 2004; 36:605-6.
12. Lakey JRT, Rajotte RV, Warnock GL. Collagenase digestion of canine pancreas by gentle automated dissociation in combination with ductal perfusion optimizes recovery of islets. *Transplantation Proceedings*. 1992;24:2787.
  13. Ao Z, Matayoshi K, Yakimets WJ Jr, Lakey JR, Katyal D, Rajotte RV, *et al*. Comparison of dextran and Ficoll density gradients for purification of canine islets. *Transplantation Proceedings*. 1992;24(6):2788.
  14. Lakey JR, Cavanagh TJ, Zieger MA, Albertson TE, Dwulet F, Wright MJ, *et al*. Evaluation of a purified enzyme blend for the recovery and in vitro function of isolated canine islets. *Transplantation Proceedings*. 1998;3(2): 590-1.
  15. Kneteman NM, Lackey JRT, Wagner T, Finegood D. The metabolic impact of rapamycin (sirolimu) in chronic canine islet graft recipients. *Transplantation*. 1996:1206-10.
  16. Shapiro AM, Geng Hao E, Lakey JR, Finegood DT, Rajotte RV, Kneteman NM. Defining optimal immunosuppression for islet transplantation based on reduced diabetogenicity in canine islet autografts. *Transplantation* 2002; 74(11):1522-8.
  17. Inkse GM, Steenvoorde E, Hogendoorn S, Noteborn M, Terpstra OT, Bruijn JA, *et al*. Stable transplantation results of magnetically retracted islets: a novel method. *Diabetologia*. 2004;47(1):55-61.
  18. Downing R. Historical review of pancreas islet transplantation. *World Journal of Surgery* 1984;8:137-42.
  19. Poggioli Poggioli R, Faradji RN, Ponte G, Betancourt A, Messinger S, Baidal DA, *et al*. Quality of life after islet transplantation. *Am J Transplant*. 2006; 6:371-8.
  20. Froud T, Ricordi C, Baidal DA, Hafiz MM, Ponte G, Cure P, *et al*. Islet transplantation in type 1 diabetes mellitus using cultured islets and steroid-free immunosuppression: Miami experience. *Am J Transplant*. 2005;2:37-46.
  21. Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ, Auchincloss H, Lindblad R, Robertson RP, *et al*. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N Engl J Med*. 2006;318-30.
  22. U.S. department of human health and service. Office of extramural research on line: <http://grants.nih.gov/grants/olaw/olaw.htm> [Consulta: agosto 2 de 2008].
  23. United States Department of Agriculture. Animal Welfare Information Center AWIC. On line: [www.nal.usda.gov/awic/ac](http://www.nal.usda.gov/awic/ac) [Consulta: Agosto 2 de 2008].
  24. Institute of Laboratory Animal Resource. The guide for use a care of animal models 1996. On line: [www.nap.edu/readingroom/books/labrats](http://www.nap.edu/readingroom/books/labrats) [Consulta: Agosto 2 de 2008].



Copyright of Universitas Médica is the property of Pontificia Universidad Javeriana and its content may not be copied or emailed to multiple sites or posted to a listserv without the copyright holder's express written permission. However, users may print, download, or email articles for individual use.