

CARTAS AL DIRECTOR

TRASPLANTE DE ISLOTES DE PANCREAS EN HIGADO POR VIA PORTAL

Desde que MOSKALEWSKI aisló islotes de Langerhans de cobaya, previa digestión del páncreas con colagenasa, hace ya 20 años (*Gen. Comp. Endocrinology* 85, 218, 1965), se vienen desarrollando intensas investigaciones en este campo con dos finalidades: el estudio «in vitro» de las propiedades fisiológicas de las células insulares y la posible aplicación práctica del trasplante de islotes como solución definitiva de la diabetes mellitus.

Esta última finalidad es la que nos hemos propuesto como línea directriz de nuestros trabajos experimentales, en los que se trata inicialmente de conseguir la remisión de la diabetes provocada en ratas por inyección de estreptozotocina, practicando a estos animales un trasplante de tejido insular. Paralelamente, el estudio de estos animales diabéticos con trasplante insular y su comparación con el de ratas diabéticas sin trasplante, brindan un excelente modelo experimental para investigar la fisiopatogenia de las alteraciones y lesiones secundarias sistémicas de la diabetes.

En la década de los años veinte, con el descubrimiento y la extracción de la insulina y su consiguiente aplicación clínica, mejoraron notablemente la supervivencia y la calidad de vida del diabético. Con ello, perdieron interés transitoriamente los primeros experimentos de trasplante de páncreas, realizados ya entonces por algunos investigadores.

Sin embargo, a lo largo de los años posteriores, se observó que la terapia insulínica, si bien prevenía la muerte por cetoacidosis, controlaba los síntomas y alargaba la esperanza de vida del diabético, no curaba la enfermedad al no permitir un control perfecto de la homeostasis de los hidratos de

carbono. Al fallar ésta, aparecen y se desarrollan en el transcurso de los años lesiones secundarias sistémicas, responsables de la severa morbilidad y mortalidad que presenta aún actualmente la diabetes mellitus. Que el trasplante pancreático, ya sea de órgano completo, con anastomosis vasculares, ya sea de tejido insular purificado, puede servir para lograr dicha homeostasis lo prueban algunos estudios clínicos y numerosos experimentos en animales.

La mayoría de los procedimientos actuales de aislamiento de islotes de Langerhans se basan en el método descrito por LACY y KOSTIANOVSKY (*Diabetes* 16, 35, 1967). En nuestras investigaciones utilizamos este método con algunas modificaciones y además, en distintos experimentos, el de PAYNE (*Ann. Surg.* 189, 248, 1979) de obtención de tejido insular de ratas tratadas previamente con DL-Etionina, método muy útil por su sencillez y que la estancia de uno de nosotros en el Departamento de Cirugía de la Universidad de Minnesota, primer centro mundial de trasplante de páncreas, nos ha permitido reproducir.

Para que los métodos utilizados y los resultados obtenidos en estas investigaciones sean reproducibles, es necesario tener en cuenta una serie de detalles. En primer lugar, hay que definir el estado de hiperglicemia experimental de las ratas que han de recibir el trasplante de los islotes. Si como fármaco diabético se utiliza la estreptozotocina, es necesario valorar la cepa, el sexo y la edad-peso del animal, pues variaciones de estos parámetros condicionarán estados diabéticos diferentes a igualdad de dosis de fármaco administrado (habitualmente, de 30 a 65 mg por Kg de peso del animal). Dosis mayores que las indicadas

provocan estados diabéticos muy intensos, con mortalidad elevada de los animales, que no permite el control de los mismos a mediano y largo plazo. Por el contrario, dosis inferiores de estreptozotocina pueden ir seguidas de remisiones espontáneas de la diabetes provocada, imposibilitando estudios controlados (comparación de ratas trasplantadas con ratas diabéticas). Igual criterio de homogeneidad de los animales debe aplicarse a las ratas donantes de islotes.

En nuestros experimentos utilizamos siempre ratas albinas Wistar, machos de 250 a 300 g de peso y de 3 a 5 meses de edad, isogénicas, procedentes del estabulario de nuestro Laboratorio, y alimentadas con la dieta corriente. El trasplante a las ratas receptoras se practica a las dos semanas de haberles provocado diabetes intensa, con niveles de glucemia superiores a 400 mg %.

Las técnicas que utilizamos para aislar islotes de Langerhans comprenden la extracción del páncreas, la digestión del mismo y la separación y obtención de los islotes. La extracción del páncreas se realiza previa distensión del mismo con una disolución fría de Hanks inyectada en el conducto biliar. A continuación, el páncreas extraído se trocea y se digiere con colagenasa (unos 4 mg por páncreas troceado) en un aparato de agitación mecánica, a 37° y durante unos 20 minutos. La digestión se detiene lavando el páncreas digerido con líquido de Hanks frío, se decanta la suspensión y se desecha el sobrenadante. El sedimento obtenido, rico en islotes, se mezcla con una disolución de Hypaque-Ficoll (HF) de densidad 1.100, por encima de la cual se añaden unos ml de líquido de Hanks. La mezcla se centrifuga durante unos 10 minutos a 800 g, y se obtiene una interfase HF-Hanks rica en islotes de Langerhans. Si se desea eliminar las impurezas existentes en esta interfase, se somete ésta a una nueva separación en HF.

Por este método, con las técnicas descritas, se aíslan unos 200 islotes de cada páncreas de rata y se requieren de 6 a 8 animales donantes para remitir la diabetes de una rata receptora. Con páncreas humano, dada su mayor proporción de tejido conectivo, el rendimiento sería mucho menor.

Por el método de PAYNE, las ratas donan-

tes reciben previamente, con el alimento y durante unas semanas, DL-Etionina que les provoca una atrofia del componente exocrino del páncreas y un enriquecimiento relativo del páncreas endocrino. El procesado del páncreas es similar al descrito más arriba y, después de la digestión del órgano, se obtiene un tejido pancreático rico en contenido insular, que es inyectado al animal diabético directamente, sin intentar previamente el aislamiento de islotes puros. Este método ofrece las ventajas prácticas de ser muy sencillo y requerir sólo dos páncreas para conseguir la curación de una rata diabética. Por otra parte, tiene la desventaja teórica de que las impurezas del tejido a trasplantar pueden provocar en el animal receptor reacciones secundarias no deseadas.

Por esto y dada su sencillez, este método resulta muy útil para estudios de protocolos de inmunosupresión de trasplantes experimentales.

Respecto al lugar de implantación del tejido insular, KEMP (Diabetología 9, 486, 1973) demostró que la anidación de los islotes de páncreas en el hígado es la más efectiva. Inicialmente, nosotros aplicábamos la inyección directa del tejido insular en la vena porta, pero dada la elevada mortalidad de este procedimiento lo desechamos, y actualmente realizamos el implante por inyección a través de una de las venas mesentéricas del ileon terminal.

Después de 4 o 5 años de múltiples experimentos con resultados negativos o poco satisfactorios, hemos venido corrigiendo fallos y perfeccionando las distintas técnicas hasta conseguir finalmente, en los últimos meses, realizar con éxito todos los trasplantes programados. En nuestros experimentos con ratas diabéticas, el resultado y la eficacia del trasplante se manifiestan en los días subsiguientes por una progresiva normalización de la glucemia y de la diuresis, con desaparición de la glucosuria, y por la detención de la pérdida de peso y la ulterior recuperación del mismo.

La figura 1 corresponde a una microfotografía del hígado de una rata, sacrificada a los dos meses de un trasplante de islotes de páncreas que resultó eficaz para compensar la intensa diabetes provocada 15 días

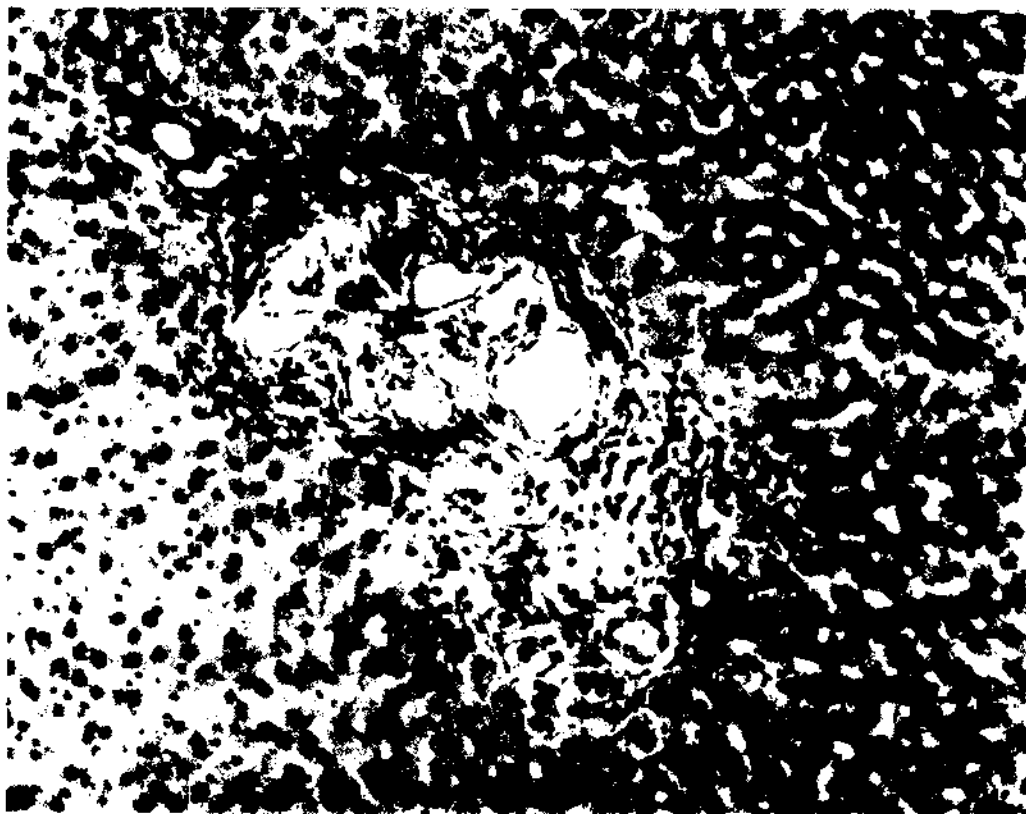


Fig. 1. Microfotografía de tejido insular de páncreas implantado a nivel de un espacio portal del hígado de una rata diabética sacrificada dos meses después del trasplante. En el espacio portal del centro de la microfotografía se observan, arriba y a la izquierda un cana-

liculo biliar, en el centro un probable trombo muy revascularizado y con discreta infiltración leucocitaria, y debajo y hacia la derecha un acúmulo de numerosas células insulares, bien distintas de los hepatocitos circundantes.

antes por inyección de estreptozotocina. En el centro, debajo y hacia la derecha de un espacio portal con un trombo infiltrado de leucocitos y muy revascularizado, se observa un acúmulo de numerosas células insulares, que ofrecen su aspecto histológico normal y característico, bien distinto del de los hepatocitos que le rodean. En este caso, el trasplante se había practicado según el método de PAYNE, de ratas donantes tratadas con DL-Etionina y por inyección portal de tejido pancreático rico en islotes no purificados.

En la actualidad se prosigue la observación y el estudio de los animales trasplantados y se están realizando más experimentos de diabetogénesis y de trasplantes para incrementar el número de animales de los

distintos grupos. Se trata no sólo de controlar a más largo plazo la eficacia del trasplante de islotes pancreáticos para compensar la diabetes y prevenir sus lesiones secundarias, sino de investigar además, en nuestro modelo experimental, algunos problemas fisiopatológicos de la diabetes mellitus.

Drs. LUIS BARNEO SERRA,
 MANUEL MARTINEZ ESTEBAN
 y CARMEN GARCIA PRAVIA
 Departamento Interfacultativo de
 Fisiología de la Universidad de Oviedo
 Dirección postal: Dr. Luis Barneo Serra,
 C/ Hermanos Pidal, 34, 8º B
 33005 OVIEDO