



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
División de Ciencias Básicas e Ingeniería

Posgrado en Ingeniería Biomédica

**Generación de un modelo biológico de cocultivo hepatocitos-células beta
para simular y determinar las interacciones que se presentan en los
trasplantes de islotes pancreáticos.**

T E S I S

Que presenta

Ing. Coms. y Electrónica J. Jesús Albíter Benítez

Matrícula: 2152800847

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias (Ingeniería Biomédica)

Asesor:

Dr. José Rafael Godínez Fernández

Jurados:

Dr. Juan Morales Corona

Dr. Juan Maldonado Cubas

Iztapalapa, Ciudad de México, Octubre de 2021

Agradecimientos.

A la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (UAM-I), por la formación que me brindó y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por favorecer y facilitar la preparación académica y el desarrollo de la ciencia en nuestro País.

Al Dr. José Rafael Godínez Fernández Jefe del Laboratorio de Biofísica e Ingeniería de Tejidos de la UAM-I, por su paciencia, comentarios, sugerencias, dirección en la realización de esta tesis y por brindarme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo.

Al Maestro en I.B. Omar Eduardo Uribe Juárez por su apoyo incondicional y por sus enseñanzas que mucho ayudaron a la realización de esta Tesis.

A la Coordinación de estudios de Postgrado en Ingeniería Biomédica quienes, con buen ánimo y mucho empeño, siempre están al pendiente de que los alumnos llevemos a buen término los estudios de Postgrado.

A todos mis profesores quienes colaboraron en mi formación y de quienes aprendí muchas cosas.

A todos los compañeros del laboratorio de Biofísica e Ingeniería de Tejidos de la UAM-I por su amistad y acompañamiento para la realización de este proyecto.

Dedicatoria

Antes que todo quiero agradecer a Dios por darme la fortaleza para concluir esta nueva meta.

A mis padres por todos los sacrificios que hicieron para que yo pudiera ser alguien en la vida, por todo el amor que siempre me han brindado y por impulsarme a seguir siempre adelante.

A mi esposa Esmeralda por su abnegación, apoyo incondicional y por soportar todos los momentos en los que tuvo que ser madre y padre a la vez, este logro también es tuyo.

A mis hijos por su comprensión y por entender que mis ausencias eran para que yo pudiera alcanzar este objetivo.

Índice

Agradecimientos.....	2
Dedicatoria	3
Índice.....	4
Índice de figuras.....	6
Lista de abreviaturas:.....	8
Resumen	9
1. Introducción.....	10
2. Antecedentes.....	11
2.1 Diabetes mellitus.....	11
2.2 Tipos de diabetes mellitus:	12
2.3 Tratamiento para la diabetes mellitus.	13
2.3.1 Tratamiento para la DT2.	14
2.3.2 Tratamiento para la DT1.	14
3. Justificación.....	19
3.1 Hipótesis.....	21
3.2 Objetivo general.....	21
3.3 Objetivos específicos.....	21
4. Materiales y métodos.	21
4.1 Líneas celulares.	21
4.1.1 RIN-m.	22
4.1.2 RIN-m5F.	23
4.2 Células de cultivo primario.....	24
4.2.1 Hepatocitos.	24
4.2.2 Islotes pancreáticos.	27
4.3 Modelo biológico de cocultivo.....	29
4.3.1 Selección del medio de cultivo para el cocultivo.	29
4.3.2 Cocultivo RIN-m/Hepatocitos.	31
4.3.3 Cocultivo Islotes pancreáticos-Hepatocitos.....	33
4.3.4 Pruebas de viabilidad celular.	34

4.3.5 Pruebas de funcionalidad celular.....	35
5. Resultados.....	36
5.1 Pruebas de viabilidad.....	37
5.1.1 Hepatocitos.....	37
5.1.2 Islotes.....	39
5.1.3 Cocultivo en campo claro.....	39
5.2 Pruebas de Funcionalidad.....	40
5.3 Registro de actividad eléctrica.....	46
5.4 Efectos de alta concentración de glucosa.....	48
6. Discusión.....	50
7. Conclusiones.....	53
8. Perspectivas.....	54
9. Referencias.....	55
10. Apéndices.....	62
10.1 Apéndice “A”: Procedimiento para el cultivo de células Rin-m y Rin-m5F.....	62
10.2 Apéndice “B”: Procedimiento para la obtención de hepatocitos de rata de cultivo primario.....	66
10.3 Apéndice “C”: Procedimiento para el aislamiento y purificación de islotes pancreáticos de rata de cultivo primario.....	68
10.4 Apéndice “D”: Prueba de viabilidad con Calceina AM/Homodímero de Etidio-1.....	71
10.5 Apéndice “E”: Prueba de funcionalidad con ELISA para insulina.....	72
10.6 Apéndice “F”: Medios de cultivo empleados para el cultivo de células Rin-m y Hepatocitos.....	73
10.7 Apéndice “G”: Comparación en la composición de los medios de cultivo RPMI-1640 Vs William’s.....	74

Índice de figuras.

		Pag.
Figura 4-1	Células RIN-m cultivadas en el laboratorio de Biofísica.	22
Figura 4-2	Células RIN-m5F cultivadas en el laboratorio de Biofísica.	23
Figura 4-3	Procedimiento de digestión enzimática del hígado para la obtención de hepatocitos de rata de cultivo primario.	25
Figura 4-4	Procedimiento de aislamiento y purificación de hepatocitos de rata de cultivo primario.	26
Figura 4-5	Obtención de Islotes pancreáticos de rata de cultivo primario.	28
Figura 4-6	Secreción de insulina de células RIN-m cultivadas en RPMI-1640 y DMEM.	29
Figura 4-7	Hepatocitos de rata de cultivo primario cultivados durante 3 días en medios de cultivo William's y RPMI-1640.	30
Figura 4-8	Células RIN-m cultivadas en medio de cultivo William's.	31
Figura 4-9	Cocultivo de células RIN-m y hepatocitos de rata de cultivo primario en medio de cultivo RPMI-1640.	32
Figura 4-10	Cocultivo de islotes pancreáticos y hepatocitos de rata de cultivo primario.	33
Figura 5-1	Protocolo desarrollado para las pruebas de viabilidad y funcionalidad del cocultivo.	36
Figura 5-2	Pruebas de viabilidad celular realizadas con calceína-AM y Homodímero de Etidio en los hepatocitos en cocultivo y hepatocitos control.	38

Figura 5-3	Pruebas de viabilidad realizadas en los islotes en cocultivo vs islotes control.	39
Figura 5-4	Análisis morfológico en campo claro de los cocultivos islotes-hepatocitos de cultivo primario.	40
Figura 5-5	Placa de ELISA para detectar insulina de rata empleada durante las pruebas de funcionalidad.	40
Figura 5-6	Curva estándar obtenida durante la prueba de ELISA para insulina de rata.	41
Figura 5-7	Gráfica de caja de los valores promedio de concentración de insulina obtenidos en el cocultivo vs islotes control.	45
Figura 5-8	Gráfica de la prueba estadística U Mann-Whitney comparando índices de estimulación del cocultivo vs control.	46
Figura 5-9	Registro de la actividad eléctrica extracelular de los islotes pancreáticos de rata.	47
Figura 5-10	Contenido en frecuencia de las señales obtenidas durante el registro de actividad eléctrica de los Islotes.	48
Figura 5-11	Efectos sobre los islotes de una concentración muy alta de glucosa en el medio de cultivo.	49

Lista de abreviaturas:

DT1: Diabetes Mellitus Tipo 1.

DT2: Diabetes Mellitus Tipo 2.

DG: Diabetes Gestacional.

CGM: Sistema de monitorización continua de glucosa.

CITR: Registro Colaborativo de Trasplante de Islotes.

IBMIR: Reacción inflamatoria instantánea mediada por sangre.

SFB: Suero fetal bovino.

A/A: Antibiótico/antimicótico.

PBS: Buffer fosfato salino.

HBSS: Solución Salina Balanceada de Hanks.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

DO: Densidad óptica.

IE: Índice de estimulación.

EthD-1: Homodimero de Etidio-1.

Resumen

El presente trabajo consistió en desarrollar un modelo biológico de cocultivo hepatocitos-islotos pancreáticos de rata con la finalidad de emular las interacciones que se presentan durante los trasplantes de islotos pancreáticos o de Langerhans e intentar dilucidar si dichas interacciones producen efectos deletéreos en estos últimos.

Para ello se realizaron pruebas de viabilidad con Calceina-AM y homodimero de etidio-1 y pruebas de funcionalidad con ELISA para insulina de rata, de los islotos y hepatocitos en cocultivo vs islotos y hepatocitos control empleando microscopía confocal y de campo claro.

Los resultados obtenidos permiten inferir que los hepatocitos se ven beneficiados por la presencia de los islotos pancreáticos situación que fue muy evidente por la diferencia en la cantidad de células adheridas a las cajas de cocultivo vs control, ya que estos generan hormonas como la insulina y el glucagón que tienen efectos mitógenos y estimulantes que favorecen la viabilidad de las células hepáticas.

Asimismo, a través del análisis morfológico y el análisis semicuantitativo de células vivas/muertas marcadas por los fluorocromos se observó que la viabilidad de los islotos pancreáticos no se vio disminuida por los hepatocitos. Mismo resultado se obtuvo en las pruebas de funcionalidad en donde se midió la insulina generada por los islotos tanto en cocultivo como control y se hizo el análisis estadístico mediante una prueba de U de Mann-Whitney la cual arrojó que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

Por lo anterior se concluyó que los hepatocitos *per se* no producen daños a los islotos pancreáticos y que por lo tanto su corto tiempo de vida en los trasplantes puede obedecer a otras

razones como los fármacos inmunosupresores, a las condiciones de hipoxia que son sometidos al inicio del trasplante, a las reacciones inflamatorias que se presentan, entre otros.

1. Introducción.

Uno de los propósitos más importantes de la ciencia es generar conocimiento que ayude a mejorar las condiciones de vida de la humanidad. La ingeniería Biomédica es una rama de la ingeniería que por su naturaleza intrínseca apoya a este propósito, pues es una pieza fundamental en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades.

La diabetes mellitus es una enfermedad que en la actualidad está adquiriendo proporciones de pandemia y que tiene una gran afectación en la calidad de vida de las personas que la padecen, así como en la economía familiar y de la sociedad. Sus complicaciones son muchas y si no son tratadas adecuadamente, con el tiempo conducen a problemas de salud graves como ceguera, amputaciones, nefropatías, neuropatías y finalmente a la muerte[1].

Por tal situación son muchos los laboratorios y equipos de investigación que buscan una alternativa de tratamiento para esta enfermedad, alternativas que van desde desarrollo de nuevos fármacos hipoglucemiantes, terapia intensiva con insulina, páncreas artificial, trasplante de páncreas, trasplante de islotes pancreáticos, páncreas bioartificial, etc.

En cada una de estas alternativas se están realizando esfuerzos para paliar los inconvenientes que hasta el momento presentan y convertirse en la opción terapéutica que permita eliminar o controlar efectivamente la enfermedad.

De las alternativas que se mencionaron anteriormente, el trasplante de islotes pancreáticos es quizás una de las opciones más prometedoras, que está siendo estudiada por muchos laboratorios y que a pesar de no ser una terapia autorizada aun en la clínica, se han realizado

hasta la fecha 2,150 trasplantes en 36 Centros de Trasplantes de Islotes, esto de conformidad a lo reportado por el Registro Colaborativo de trasplantes de islotes (CITR)[2].

Sin embargo resulta desconcertante el darse cuenta que a pesar de que los pacientes trasplantados recuperan la normoglucemia, al cabo de 2 o 3 años requieren del suministro de insulina exógena[3], cuando para otro tipo de trasplantes como el corazón y riñón el tiempo de vida media es de 7 y 10 años respectivamente[4][5]. Existen diversos reportes que tratan de justificar este fenómeno como el efecto nocivo de los fármacos inmunosupresores, la hipoxia que sufren los islotes cuando son trasplantados, el ambiente tóxico del interior del hígado[6], etc. pero poco se ha reportado si los hepatocitos por si solos presentan un efecto deletéreo sobre los trasplantes.

El presente trabajo se desarrolló con la finalidad de profundizar un poco más en este aspecto, mediante la implementación de un modelo biológico de cocultivo hepatocitos-islotes pancreáticos de cultivo primario de rata, que al ser comparado contra un cultivo control de islotes pancreáticos se pudo observar los efectos en la viabilidad y funcionalidad de los islotes cultivados con hepatocitos.

2. Antecedentes.

2.1 Diabetes mellitus.

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica que se presenta cuando el páncreas no produce la suficiente insulina o cuando el cuerpo no la puede usar de manera efectiva. La insulina es una hormona que regula la glucosa en la sangre [7].

La Hiper glucemia o incremento de la glucosa en sangre es un efecto común de la diabetes, enfermedad que si no es controlada de manera adecuada, con el tiempo genera un daño serio en muchos de los sistemas del cuerpo, especialmente en los nervios y en los pequeños vasos sanguíneos [1].

En el año 2016 la diabetes provocó de manera directa 1.5 millones de muertes [8], siendo la causa principal de la ceguera, amputación y falla renal [1]. En el año 2014 cerca de 347 millones de personas en el mundo tenían esta enfermedad y 9 % de los adultos de 18 o más años la padecían [9].

Los costos que este padecimiento representa para el sector salud de manera directa (atención médica), son de \$179,495 millones de pesos, lo que equivale al 1.11% del producto interno bruto (PIB) del año 2013, el 87% de los costos fue asignado al tratamiento de las complicaciones de la Diabetes Mellitus tipo 2 y el 13% a la Diabetes Mellitus tipo 1[10]. Los costos indirectos, que se refieren a la muerte prematura, incapacidad laboral y menor desempeño laboral[11], se estimaron en el mismo año en la cantidad de \$183,364 millones de pesos (1.14% del PIB), lo que en conjunto asciende a un costo estimado de \$362,859 millones de pesos (2.25% del PIB)[11].

En México se ha convertido en la segunda causa de muerte, por encima incluso del cáncer y solo por debajo de las enfermedades cardiovasculares [12].

2.2 Tipos de diabetes mellitus:

La diabetes se clasifica de la siguiente manera [1]:

Diabetes Tipo 1 (DT1)

Conocida antiguamente como insulino-dependiente o diabetes juvenil, es caracterizada por una producción deficiente de insulina, por lo que requiere una administración diaria de esta.

Hasta la fecha no se conocen los mecanismos que la provocan, ni cómo prevenirla; atribuyéndole como principal causa un ataque del sistema inmune a las células beta pancreáticas[1].

Diabetes Tipo 2 (DT2)

Llamada insulino-resistente, es resultado de un uso inefectivo de la insulina por el cuerpo. Este tipo de diabetes es la que presentan alrededor del 90% de los diabéticos en el mundo [7] y es generalmente consecuencia de un exceso de peso y de inactividad física.

Diabetes Gestacional (DG).

Se presenta durante el embarazo, no se sabe que la provoca, pero se atribuye a las hormonas generadas durante esta etapa, las cuales bloquean la acción de la insulina en el cuerpo de la madre, generando la resistencia a la insulina.

Los síntomas de la diabetes incluyen excreción excesiva de orina (poliuria), mucha sed (polidipsia), hambre constante (polifagia), pérdida de peso, cambios en la visión y fatiga. En la DT1 y DT2 estos síntomas son muy similares, pero a menudo son menos marcados en la DT2, por lo que la enfermedad podría ser diagnosticada varios años después, una vez que las complicaciones se han presentado [7]. Por otro lado, cada vez es más frecuente observar casos con una evolución nociva de la DT2 requiriendo terapias insulino-dependientes como en los diabéticos tipo 1 [13] [14] [15].

2.3 Tratamiento para la diabetes mellitus.

Las complicaciones de la diabetes constituyen un problema de salud pública importante y se deben sobre todo a un control inadecuado de la glucemia, por lo que se ha buscado desarrollar diferentes terapias o tratamientos para recuperar la normogluemia.

2.3.1 Tratamiento para la DT2.

En pacientes con DT2, se logra un buen control de los niveles de glucosa en sangre mediante las siguientes acciones:[16]

- A. Alimentación saludable.
- B. Realizar ejercicio de manera regular.
- C. Control de peso.
- D. Tratamiento con medicamentos, los cuales comprenden fundamentalmente dos categorías:
 - Las biguanidas como la metformina, que actúan mejorando la sensibilidad del cuerpo a la insulina y disminuyendo la producción de glucosa en el hígado[17].
 - Las sulfonilureas como la glibenclamida que estimulan la liberación de la insulina por las células beta del páncreas[18].

2.3.2 Tratamiento para la DT1.

La DT1 se está intentando tratar con las siguientes terapias:

- A. Terapia intensiva con insulina:

También llamada control estricto, consiste en mantener la glucosa en sangre lo más cercana posible de un objetivo establecido mediante frecuentes inyecciones de insulina o usando una bomba de insulina, planificación de comidas, ajustes de medicamentos y con actividad física; requiriéndose trabajar estrechamente con un equipo de atención médica [19].

- B. Páncreas artificial.

Es el término que se emplea para referirse a un dispositivo que utiliza la entrada de un sistema de monitorización continua de glucosa (CGM) para calcular la insulina apropiada (o la

infusión de glucagón apropiada, hormona contraria a la insulina que provoca un aumento en la glucosa en sangre), necesaria para alcanzar una glucemia objetivo especificada [20].

Existen tres componentes funcionales principales en un páncreas artificial moderno: el CGM, una bomba de infusión de insulina (y otra de glucagón si se trata de un páncreas artificial bihormonal) y un algoritmo de control [20].

- a. El CGM se inserta a través de la piel y se coloca a una profundidad de 8-12 mm en el tejido subcutáneo, midiendo de esta manera la glucosa en el fluido intersticial en lugar de la sangre. La glucosa se determina a partir de una reacción catalítica basada en la enzima glucosa oxidasa inmovilizada en una membrana polimérica que cubre un electrodo sensor.
- b. Las bombas de infusión de insulina (y glucagón) son dispositivos electromecánicos pequeños y confiables que se usan para proporcionar una infusión programada de insulina en el tejido subcutáneo. Las bombas consisten en un cartucho de insulina recargable, un mecanismo de bombeo y una interfaz de usuario programable, que puede ser utilizada por el paciente para establecer una tasa de infusión basal o para administrar una dosis para cobertura de una comida o para la corrección de la hiperglucemia.
- c. Los algoritmos de control se encuentran incorporados en un microprocesador y proporcionan decisiones de dosificación de insulina-infusión en tiempo real basadas en los datos introducidos desde el monitor de glucosa continua, la bomba de insulina y otra información auxiliar vital incluida en los algoritmos.

C. Trasplante de páncreas.

Implica la implantación de un páncreas sano (uno que puede producir insulina) en una persona que normalmente tiene diabetes. Debido a que el páncreas es un órgano vital, que realiza las

funciones necesarias en el proceso de digestión, el páncreas nativo del receptor se deja en su lugar y el páncreas donado se adjunta en un lugar diferente. El páncreas sano viene de un donante que acaba de morir o puede ser un páncreas parcial de un donante vivo [21].

Alrededor del 75% de los trasplantes de páncreas se realizan con trasplante renal (ambos órganos del mismo donante) en pacientes diabéticos con insuficiencia renal. Esto se conoce como un trasplante simultáneo de páncreas-riñón (SPK por sus siglas en inglés). Alrededor del 15% de los trasplantes de páncreas se realizan después de un trasplante de riñón previamente exitoso (PAK) y solo el 10% restante de los casos se realiza como trasplante de páncreas solo (PTA) [21].

D. Trasplante de islotes de Langerhans.

Es una alternativa menos invasiva que el trasplante de órgano completo [22] y con un menor índice de morbilidad [23] que consiste en trasplantar a través de la vena porta únicamente la parte endocrina del páncreas del donador constituida por los islotes pancreáticos.

Un páncreas humano de adulto contiene entre 3.6 a 14 millones de islotes, con un volumen total de 0.5 a 1.3 cm³ [24,25] y está compuesto por células β productoras de insulina en una proporción aproximada de 60%, células α productoras de glucagón en una proporción de 30% y el 10% restante dividido entre las células δ secretoras de somatostatina (< 10%), células γ que secretan los polipéptidos pancreáticos (< 5%) y células ϵ secretoras de grelina [26,27]

Después de un tiempo los islotes son capaces de producir insulina y restablecer los niveles normales de glucosa en sangre, requiriendo que el paciente tenga que usar drogas inmunosupresoras para evitar el rechazo del trasplante.

Teóricamente el trasplante de islotes tiene las siguientes ventajas sobre el trasplante del páncreas completo [22]:

- a. La posibilidad de re-trasplante simple para injertos fallidos.
- b. La eliminación de complicaciones asociadas con el páncreas exocrino.
- c. La posibilidad de que los islotes sean menos inmunogénicos.
- d. La posibilidad de modificar los islotes in vitro previo al trasplante para reducir la inmunogenicidad.
- e. Los islotes se prestan a la criopreservación y banco de tejidos, lo que podría ser combinado con un programa de control de calidad antes de la implantación.

Todas estas terapias resultan prometedoras sin embargo hasta la fecha siguen presentando inconvenientes, por lo que se sigue investigando para superar estos problemas, entre los cuales se pueden mencionar los siguientes:

La terapia intensiva con insulina no logra normalizar las cifras de hemoglobina glucosilada y presenta un riesgo considerable de crisis de hipoglucemia, requiriendo mucha disciplina por parte del paciente que tiene que estar pinchando en múltiples ocasiones tanto para estar midiendo su glucosa en sangre como para inyectarse la insulina exógena.

El trasplante de páncreas proporciona un control metabólico excelente y aunque sus resultados han mejorado durante la última década, continúa siendo un procedimiento invasivo y con una morbilidad significativa [28].

Por lo que respecta al páncreas artificial, todavía existen obstáculos importantes, como la precisión y el tiempo de retraso del sensor de glucosa, así como los métodos de administración de insulina y controladores robustos [29]. Además, algunos páncreas artificiales requieren el suministro manual de la insulina para compensar las comidas con los gramos estimados de carbohidratos o de manera más simple indicando si el desayuno fue pequeño, mediano o grande.

El trasplante de islotes de Langerhans es una alternativa menos invasiva que el trasplante de órgano completo [22] y con un menor índice de morbilidad [23] constituyendo un promisorio y razonable método alternativo para restaurar la normogluemia y aliviar las complicaciones a largo plazo de la diabetes, otorgando una independencia de los tratamientos suplementarios de insulina [23] [30].

Para trasplantarlos un radiólogo hace uso de un equipo de ultrasonido y rayos X para guiar un catéter a través de la parte superior del abdomen hacia la vena porta del hígado, para que una vez colocado en su lugar se haga a través de este la infusión de los islotes en el hígado. Todo el procedimiento se realiza con anestesia local.

El hígado se sugirió como un sitio óptimo para el trasplante de islotes por primera vez por Lacy en 1973 cuando lo usó en un modelo de rata con diabetes [31]. En la década de 1980 se publicaron los primeros casos de éxito de un autotrasplante de islotes en humanos por infusión en el hígado [32] [33].

Posteriormente, en 1990 se publicó el primer caso de independencia a la insulina suplementaria en un paciente diabético después del trasplante de islotes alogénicos en la vena porta, estableciendo al hígado como el sitio de elección para el trasplante de islotes en la práctica clínica [34].

Debido a este éxito inicial, el hígado es por ahora el sitio más comúnmente utilizado, según lo informado por el Registro Internacional de Trasplante de islotes [35]

3. Justificación.

A pesar de todas las ventajas que ofrece el trasplante de islotes pancreáticos, este método no se ha adoptado como un estándar para el tratamiento de la diabetes, debido principalmente al tiempo reducido que logra mantener la normoglucemia en las personas que fueron trasplantadas (comparado con el trasplante de órganos completos como: el de riñón con un porcentaje de supervivencia de 99% a los tres años [5] o de corazón con un porcentaje de supervivencia de 83% a los tres años [4]), situación que se aprecia en los siguientes estudios:

En 2005, los resultados de 65 receptores de trasplante de islotes tratados de acuerdo con el protocolo de Edmonton, mostraron que 44 (68%) pacientes se habían vuelto independientes de la insulina suplementaria, con una duración media de la independencia de la insulina de 15 meses. Cinco de estos sujetos recibieron una única infusión de islotes, 33 recibieron dos infusiones, y seis recibieron tres infusiones. La independencia de la insulina después de 5 años fue tan solo del 10 % [36].

Tras los resultados iniciales de Edmonton en 2000, la Red de Inmuno-Tolerancia inició un gran ensayo internacional en los Estados Unidos y Europa para examinar la viabilidad y reproducibilidad del trasplante de islotes mediante el protocolo de Edmonton. Se encontró que de los 36 sujetos del estudio: 16 (44%) mantenían la independencia a la insulina de corrección con un control glucémico adecuado el primer año después del trasplante. Sólo cinco de estos pacientes eran independientes de la insulina después de 2 años (14 %) [3].

El mayor registro de datos de trasplante de islotes es el Registro Colaborativo de Trasplante de Islotes, (CITR) con datos principalmente de Estados Unidos y de instituciones médicas canadienses, así como de centros europeos. En su actualización de 2008 analizó a 279 receptores de un trasplante de islotes efectuado entre 1999 y 2007, reportando que solo 24% mantenía la independencia de la insulina después de 3 años [37].

El CITR informó los datos de los resultados de trasplantes de islotes realizados entre 1999 y 2002. La independencia de la insulina suplementaria a los 3 años después del trasplante fue únicamente del 27 % [38].

Actualmente no está claro en qué medida la disminución de la independencia de la insulina exógena es el resultado de la pérdida de los islotes y cuáles son los mecanismos detrás del deterioro de la función del injerto. Algunas posibilidades que se manejan incluyen la destrucción auto o aloinmune, la toxicidad del inmunosupresor, la reacción inflamatoria instantánea mediada por sangre (IBMIR) o una interrupción progresiva de la secreción de la insulina [6].

Asimismo se ha detectado que en aproximadamente el 20% de los pacientes, se produce esteatosis hepática (hígado graso) focal post-trasplante, posiblemente debido a un efecto paracrino local de la insulina, pero su significación en relación con la función del injerto no está definida todavía [39].

A pesar de este tiempo de vida media reducido de los trasplantes de islotes de Langerhans y de la detección de daños en el tejido hepático, en la revisión bibliográfica efectuada no se encontró información sobre la existencia de un análisis sistemático que descarte la posibilidad de que sea consecuencia de la interacción de las células hepáticas-islotes pancreáticos.

Por lo anterior en este proyecto se propone el desarrollo de un modelo biológico in vitro empleando la técnica de cultivos celulares que simule este tipo de interacción celular y que nos permita obtener información de los efectos posiblemente nocivos entre ellas, planteándose para tal fin la siguiente hipótesis de trabajo:

3.1 Hipótesis.

Es posible obtener un modelo biológico de cocultivo hepatocitos-islotos pancreáticos que permita determinar el tipo de efectos que se presentan en los trasplantes de islotos de Lagerhans.

3.2 Objetivo general.

Generar un modelo biológico de cocultivo hepatocitos-islotos pancreáticos para simular y determinar los efectos que se presentan en los trasplantes de islotos pancreáticos.

3.3 Objetivos específicos.

1. Implementar un modelo biológico que permita el cultivo simultaneo de hepatocitos e islotos pancreáticos.
2. Determinar si la viabilidad celular de los islotos y/o hepatocitos es afectada en el cocultivo.
3. Establecer si la funcionalidad de los islotos pancreáticos es afectada por la interacción con los hepatocitos en el cocultivo.
4. Determinar si los hepatocitos tienen efectos benéficos o deletéreos sobre los islotos pancreáticos.

4. Materiales y métodos.

4.1 Líneas celulares.

Para el desarrollo de este trabajo se inició con el cultivo por separado del material biológico, primeramente, con líneas celulares, que son más fáciles de utilizar y que permitieron conocer las técnicas de cultivo celular, uso de la campana de flujo laminar y de la incubadora de CO₂.

Se denomina línea celular aquellas células de un solo tipo (humano, animal o planta) que se han adaptado para crecer continuamente en el laboratorio y que bajo ciertas condiciones, proliferan indefinidamente en el laboratorio, es decir son “inmortalizadas” (pueden dividirse en cultivo continuamente sin demostrar síntomas de senescencia) requiriendo para ello que sean sometidas a un proceso denominado “transformación” (cambio en el perfil de expresión proteico, cromosómico, exposición a radiaciones ionizantes o a carcinógenos químicos, etc). Estas líneas pueden generarse artificialmente o ser aisladas de un tejido tumoral.[40]

Los tipos de células de línea celular empleadas fueron la RIN-m y la RIN-m5F, las cuales fueron proporcionadas por el laboratorio de Biofísica e Ingeniería de Tejidos.

4.1.1 RIN-m.

La línea celular RIN-m (ATCC CRL-2057) se derivó de un tumor inducido por radiación de células de islotes de rata. La línea se estableció a partir de un xenoinjerto de tumor en un ratón desnudo. Las células producen y secretan hormonas polipeptídicas de los islotes. Estos modelos permiten el estudio de la biología de las células de los islotes pancreáticos, específicamente los mecanismos que controlan la síntesis, el almacenamiento y la secreción de insulina y somatostatina.[41]

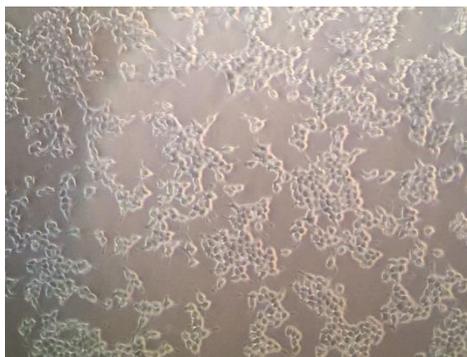


Figura 4-1: Células RIN-m cultivadas en el laboratorio de Biofísica (X50). Elaboración propia.

Las células RIN-m fueron descongeladas, cultivadas en RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y con 500 μ l de antibiótico/antimicótico (A/A) en una incubadora de CO₂ a 37 °C y con 5% de CO₂ y subcultivadas siguiendo el protocolo establecido por la empresa ATCC (Ver Apéndice “A”).

4.1.2 RIN-m5F.

La línea celular RIN-m5F (ATCC CRL-11605) es un clon derivado de la línea de islotes de rata RIN-m (ATCC CRL-2057) cuyas células producen y secretan insulina. A diferencia de la línea parental no producen somatostatina.[42]

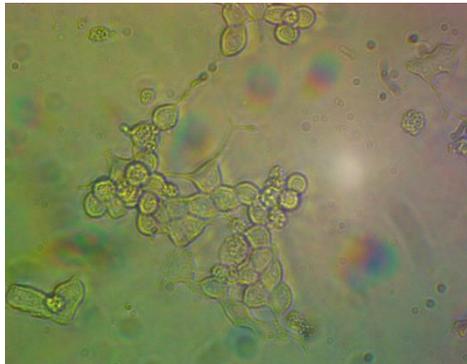


Figura 4-2: Células RIN-m5F cultivadas en el laboratorio de Biofísica (X200). Elaboración propia.

Su manejo y cultivo se realizó de la misma forma que las células RIN-m (Apéndice “A”), empleándose cajas de Petri de 100 mm y realizándose el cambio de medio cada tercer día con la finalidad de proveer de nutrientes y eliminar productos de desecho, sin retirar la totalidad del mismo para evitar un retraso en el crecimiento ya que este contiene sustancias que favorecen e inducen la proliferación.

El subcultivo de las células RIN-m5F se realizó cuando entraron en confluencia (cubrieron entre el 80 y 90% de la superficie de la caja de Petri) usando Buffer Fosfato Salino (PBS) para su lavado y 2 ml de tripsina para despegarlas (Apéndice “A”).

4.2 Células de cultivo primario.

Es el tipo de cultivo más utilizado. Se puede obtener a partir de explantes primarios o de suspensiones de células disgregadas. La disgregación celular se realiza por métodos enzimáticos o mecánicos. En estos cultivos se pierden las interacciones célula-célula y las interacciones de la célula con la matriz extracelular[40].

4.2.1 Hepatocitos.

Los hepatocitos de rata de cultivo primario se obtuvieron a partir de ratas machos de la cepa Wistar de 7 a 8 semanas de edad, con un peso de 250 a 300 gr, anestesiados con 1 ml de Isoflurano para inducción y 1 ml para mantenimiento, mediante el método de perfusión de colagenasa de dos pasos desarrollado por Berry and Friend en 1969 [43] y modificado por Seglenin en 1976 [44] tal como se describe en el artículo elaborado por Shen L. Hillebrand A. y colaboradores [45].

En este método se emplean dos tipos de buffers: uno sin calcio y con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) que es empleado en primera instancia con la finalidad de afectar la integridad de las desmosomas que son estructuras especializadas que favorecen la adhesión entre las células y que requieren calcio para funcionar y posteriormente se usa un segundo buffer conteniendo colagenasa tipo II y con calcio, el cual es necesario para que la

enzima pueda efectuar su acción. Ambos buffers son calentados a baño maría a una temperatura de 42 °C (para que cuando hagan el recorrido lleguen a 37 °C) y perfundidos mediante una bomba peristáltica a través de la vena porta de la rata (ver figura 4-3).

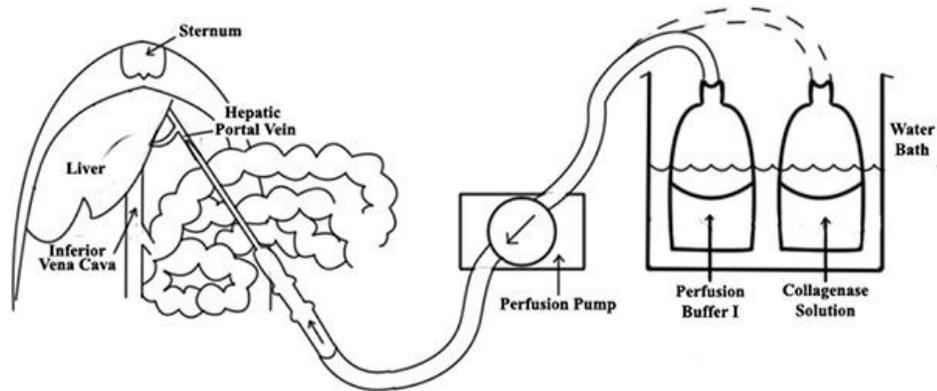


Figura 4-3: Procedimiento de digestión enzimática del hígado para la obtención de hepatocitos de ratona de cultivo primario[45].

Una vez que el hígado es perfundido, se extrae y se coloca en una caja de Petri en la campana de flujo laminar y mediante un raspador celular se dispersan las células de manera gentil, posteriormente todo el contenido de la caja se pasa por un filtro de nylon de 100 μm para remover el tejido sin digerir y el tejido conectivo, después se coloca en un tubo cónico de 50 ml y se incorpora 25 ml de un gradiente de densidad (Percoll) y se centrifuga por 10 minutos a 1200 RPM para obtener un Pellet con los hepatocitos, los cuales una vez retirado el sobrenadante y homogenizados con medio de cultivo fresco son colocados en cajas de Petri de 100 mm para su cultivo (ver figura 4-4).



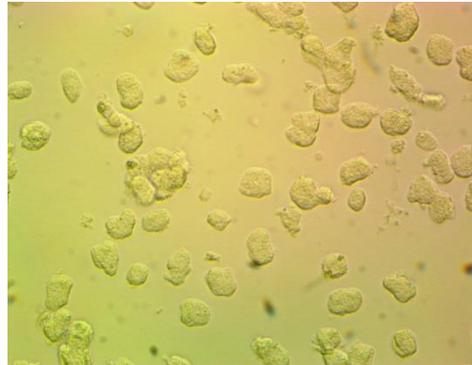
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 4-4: Procedimiento de aislamiento y purificación de hepatocitos de rata de cultivo primario. (a) Perfusión de los búferes vía vena porta, (b) Disgregación de los hepatocitos mediante el uso de un raspador celular, (c) Formación del pellet celular después del uso de un gradiente de densidad (Percoll) y de la centrifugación, (d) hepatocitos de rata aislados y purificados. Elaboración propia.

Las velocidades y el tiempo de perfusión de los buffers, así como el procedimiento detallado para la obtención de hepatocitos de rata de cultivo primario se describen en el Apéndice “B”.

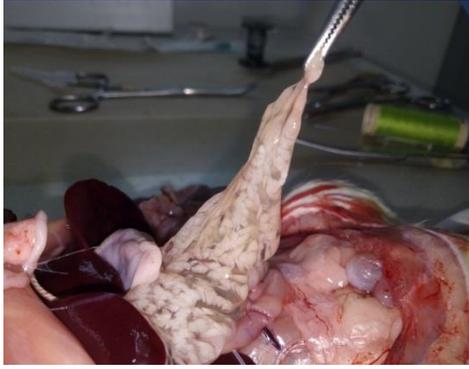
4.2.2 Islotes pancreáticos.

Con la finalidad de generar un modelo biológico lo más aproximado a la realidad y aprovechando la experiencia adquirida por el laboratorio de Biofísica, se obtuvieron también islotes pancreáticos de rata de cultivo primario.

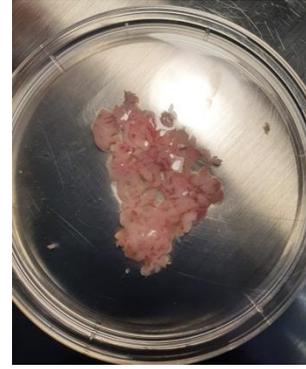
Para su obtención se emplearon ratas machos de la cepa Wistar de 7 a 8 semanas de 250 a 300 gramos las cuales fueron anestesiadas con pentobarbital sódico con una dosis de 50 mg/Kg y sacrificadas una vez extirpado el páncreas mediante dislocación cervical.

El proceso se divide en dos etapas (ver figura 4-5): el aislamiento y la purificación; la primera etapa consiste en perfundir el páncreas con Solución Salina Balanceada de Hanks (HBSS) lo más frío posible para mantener la viabilidad de los islotes y para facilitar su localización y disección, una vez extraído se corta en trozos muy pequeños y se somete a la digestión enzimática con colagenasa tipo IV, para romper los enlaces de colágeno que mantienen a los islotes pancreáticos unidos al resto de los tejidos del páncreas.

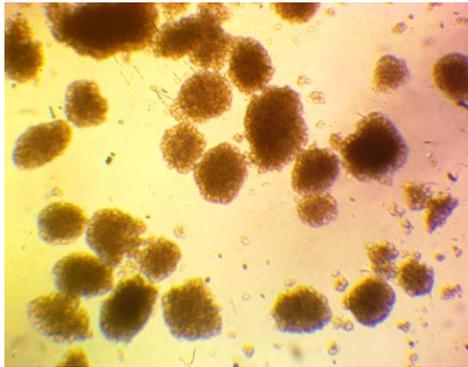
La etapa de purificación consiste en separar del tejido acinar (debrís) los islotes ya aislados, pudiéndose realizar mediante un gradiente de densidad o a través de recolección manual mediante un microscopio estereoscópico. Este último método fue el que finalmente se utilizó por la dificultad de contar con las sustancias para hacer el gradiente.



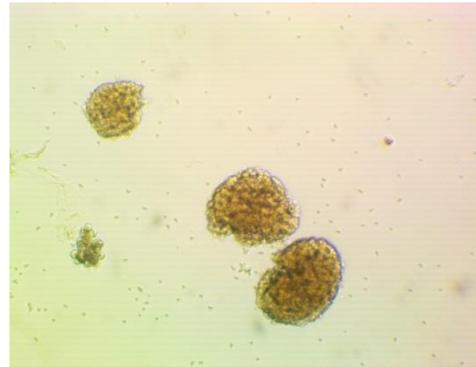
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 4-5: Obtención de Islotes pancreáticos de rata de cultivo primario. (a) Perfusión del páncreas para favorecer la viabilidad celular y facilitar su disección, (b) Páncreas de rata listo para ser digerido enzimáticamente, (c) Islotes pancreáticos de cultivo primario (X100), (d) Islotes pancreáticos aislados y purificados (X200). Elaboración propia.

En el Apéndice “C” se describe de manera detallada el protocolo empleado, las concentraciones, tiempos, velocidad de centrifugación y cantidades de las sustancias utilizadas.

4.3 Modelo biológico de cocultivo.

4.3.1 Selección del medio de cultivo para el cocultivo.

Un paso importante en la generación del modelo de cocultivo, fue determinar qué medio de cultivo era el idóneo, ya que cada tipo celular emplea uno diferente. Con ese propósito se efectuó primeramente una revisión minuciosa de la literatura, así como de las recomendaciones emitidas por las empresas que suministran las líneas celulares y por los foros de expertos (ver Apéndice “F”) concluyéndose que para las células pancreáticas endócrinas (RIN-m y RIN-m5F) el medio ampliamente utilizado es el RPMI-1640 y para las células hepáticas los medios de cultivo empleados son el RPMI-1640 y más frecuentemente el DMEM y el William’s.

De estos dos últimos medios, se encontró que durante la generación de la línea celular RIN-m, Gazdar, Chick y otros [46] compararon los medios de cultivo DMEM y RPMI-1640 respecto a la cantidad de insulina que producían las células mantenidas en estos, encontrándose que el RPMI-1640 era una mejor opción; situación que se puede apreciar en la siguiente gráfica:

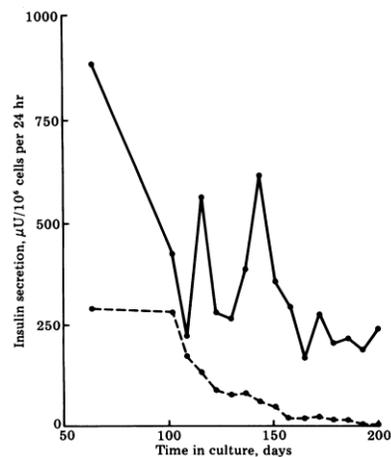


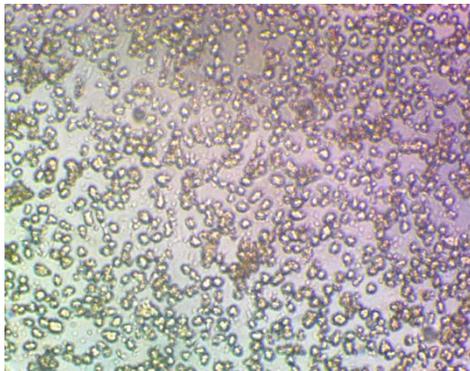
Figura 4-6: Secreción de insulina de células RIN-m cultivadas en RPMI-1640 (—) y DMEM (- - -)[46].

Con base a lo anterior y una vez descartado el DMEM, se procedieron hacer las pruebas pertinentes para encontrar la mejor opción entre los medios de cultivo William's y el RPMI-1640.

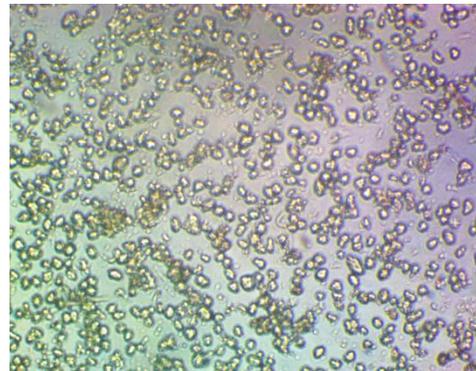
Primeramente se compararon las diferentes sales, aminoácidos y vitaminas empleados en la elaboración de los medios, para determinar qué tanta variación existía entre ellos (ver Apéndice "G"). Como la diferencia fue notoria se decidió realizar varios experimentos donde se hizo un análisis en campo claro, de los efectos que se producen en las células durante el cultivo con estos medios a nivel morfológico y de viabilidad.

Estos experimentos consistieron en comparar tres muestras para cada medio de cultivo (RPMI-1640 y William's) tanto de hepatocitos de cultivo primario como de células RIN-m observadas a través del microscopio invertido a los 1, 3 y 5 días.

Para el caso de los hepatocitos no se observaron diferencias, ya que en ambos medios de cultivo se mantuvieron adheridos a la caja de Petri, permanecieron íntegros con forma y bordes bien definidos, con adecuado brillo y contenido acuoso en su citosol (ver figura 4-7)



(a)



(b)

Figura 4-7: Hepatocitos de rata de cultivo primario cultivados durante 3 días en medio de cultivo William's (a) y en medio de cultivo RPMI-1640 (b). Elaboración propia.

Las células RIN-m en cambio sí presentaron diferencias en cuanto a su morfología y viabilidad ya que las cultivadas en medio de cultivo William's a los tres días mostraban un evidente aplanamiento o seguían en forma esférica como cuando están recién descongeladas y a los cinco días muchas células se habían despegado reflejando una disminución en la viabilidad de las mismas (ver figura 4-8).

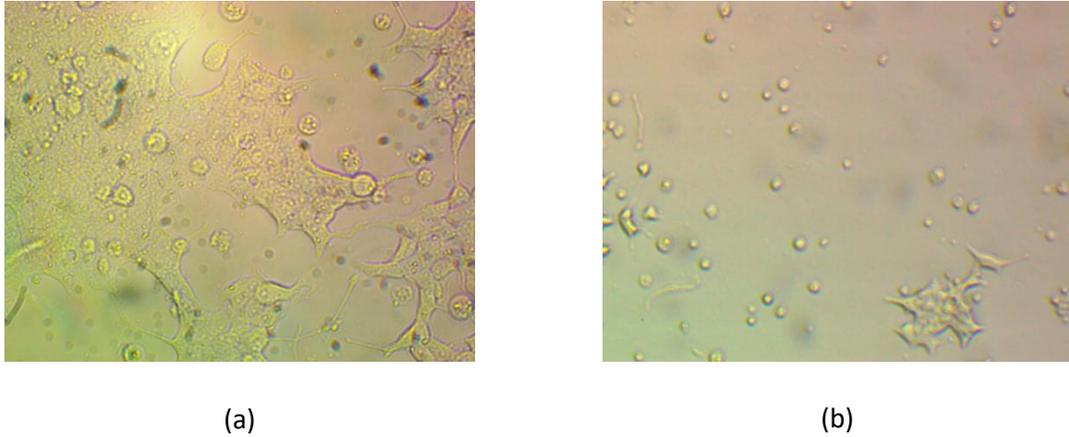


Figura 4-8: Células RIN-m cultivadas en medio de cultivo William's. (a) Se observó un aplanamiento en las células a los 3 días y (b) muchos espacios vacíos en las cajas debido al desprendimiento de las células muertas a los 5 días. Elaboración propia.

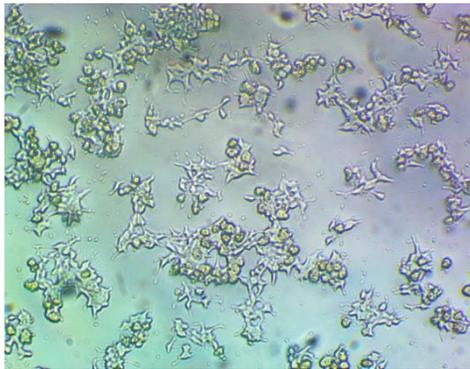
4.3.2 Cocultivo RIN-m/Hepatocitos.

Una vez elegido el medio de cultivo RPMI-1640 y con el propósito de verificar que era una buena opción para el cultivo de manera conjunta de las células RIN-m/RIN-m5F y los hepatocitos se procedieron a realizar los primeros experimentos de cocultivo con este medio.

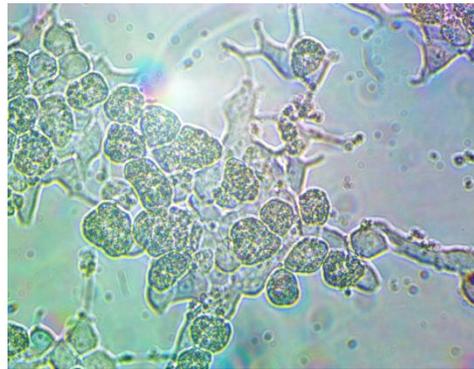
Inicialmente se presentó la incógnita de como incorporar los dos tipos de células al cocultivo, es decir si debían incorporarse los hepatocitos y las células RIN-m5F simultáneamente o primero un tipo y luego el otro y si así fuera el caso cuales células cultivar primero y cuales incorporar después.

Se hizo una revisión exhaustiva de la literatura para ver si se explicaba cómo hacerlo, sin embargo se encontraron muy pocos artículos[47,48] de cocultivos y en ninguno de ellos se especificaba el orden o la forma en que se debían colocar los dos tipos de células. Debido a lo anterior se tuvieron que realizar cultivos con las tres posibles combinaciones del orden de las células, observándose que los mejores resultados se obtuvieron cuando se colocaban primero las RIN-m5F y después los hepatocitos, ya que estos últimos se adherían mejor de esta forma, que cuando se ponían primero o simultáneamente (ver figura 4-9).

Por lo tanto de manera resumida el procedimiento para el cocultivo se realizó de la siguiente manera: primeramente se descongelaron y cultivaron células RIN-m5F en cajas de Petri de 35 mm con 2 ml de RPMI-1640 y a las 24 horas una vez que ya se habían adherido, lo cual se verificó en el microscopio invertido, se aislaron y purificaron los hepatocitos de cultivo primario de rata, los cuales fueron incorporados a estas cajas en una concentración de 1.4×10^6 cuidando que se dispersaran uniformemente por toda la caja en una monocapa. El cambio de medio se realizó de la misma manera que con las células por separado; al siguiente día después del inicio del cultivo y posteriormente cada tercer día.



(a)



(b)

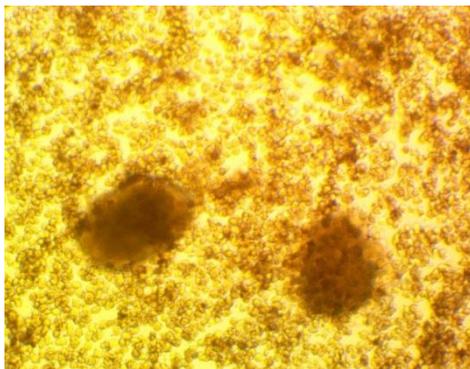
Figura 4-9: Cocultivo de células RIN-m5F y hepatocitos de rata de cultivo primario en medio de cultivo RPMI-1640 a los 5 días (a) X50, (b) X400. Elaboración propia.

4.3.3 Cocultivo de Islotes pancreáticos-Hepatocitos.

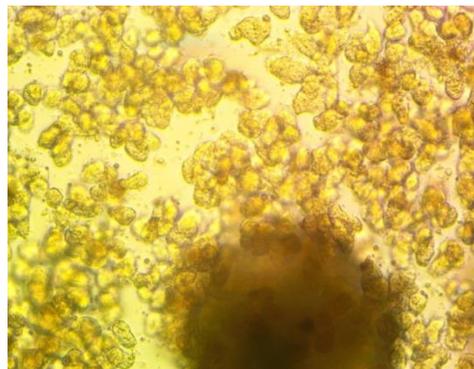
Posterior a que se iniciaron los cocultivos RIN-m5F/Hepatocitos, en el laboratorio de Biofísica se logró estandarizar la técnica para obtener islotes pancreáticos de rata de cultivo primario, por lo que se decidió usar estos para hacer el cocultivo y tener un modelo más aproximado a la realidad, ya que las líneas celulares al ser la mayoría de ellas de origen tumoral presentan comportamientos erráticos o anormales.

Con el cambio a los islotes pancreáticos se tuvo que cambiar el orden de cultivo de los tipos celulares, teniéndose que incorporar primero los hepatocitos y de 3 a 4 horas después cuando ya estaban adheridos los 30 islotes, para evitar que estos últimos se cubrieran completamente en la caja de 35 mm, lo que dificultaba mucho su localización. Adicionalmente se tuvo que recubrir previamente la caja de Petri (aun siendo tratada) con 1 ml de solución de Poly-L-Lysina (Mca. Sigma No. Cat. P8920-100 ml) para favorecer la adhesión de los hepatocitos sobre la misma (Ver figura 4-10).

Asimismo se agregó a cada caja de cultivo 250 μ l de dexametasona (equivalente a una concentración de 10 μ M) ya que esta favorece la viabilidad y funcionalidad de los hepatocitos pues principalmente los protege de la apoptosis[49,50,51,52].



(a)



(b)

Figura 4-10: Cocultivo de islotes pancreáticos y hepatocitos de rata de cultivo primario a los 3 días (a) X100, (b) X200. Elaboración propia.

4.3.4 Pruebas de viabilidad celular.

Para poder identificar las diferencias presentadas en la viabilidad de las células del cocultivo respecto a los islotes y hepatocitos control se empleó un kit de viabilidad de la marca ThermoFisher Scientific No. Cat. L3224 que contiene dos sustancias: la Calceína AM y el homodímero de Etidio-1 y cuyo funcionamiento está basado en la actividad de las esterasas y en la integridad de la membrana plasmática.

La calceína AM es una molécula neutralizada eléctricamente, que puede penetrar fácilmente en las células mediante difusión. Luego se convierte en calceína, una molécula verde fluorescente, mediante la acción de las esterasas intracelulares y que se retiene en las células que tienen su membrana intacta.[53]

Las células dañadas o muertas se tiñen en cambio con el homodímero de etidio, que es una molécula impermeable a la membrana celular que solo la atraviesa cuando se encuentra comprometida y que adquiere un color rojo fluorescente cuando el tinte se une a los ácidos nucleicos. [54]

La calceína AM y el homodímero de etidio-1 emiten huellas de fluorescencia distintas en 515 nm y 635 nm respectivamente cuando se excitan a 495 nm. La prueba es simple y se puede realizar mediante el empleo de un microscopio confocal, de epifluorescencia, un citómetro de flujo o un lector de microplacas de fluorescencia [53,54].

La técnica consiste en retirar el medio de cultivo y realizar un lavado con PBS, para posteriormente incorporar 1 ml de PBS con 0.5 μ L calceína-AM y 2 μ L de la solución de Homodímero de Etidio-1 e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos (Ver Apéndice "D").

Visualizar la muestra en el microscopio confocal o de epifluorescencia, realizar el conteo de las células teñidas de verde (vivas) y teñidas de rojo (muertas).

4.3.5 Pruebas de funcionalidad celular.

El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) es un inmunoensayo que se considera el estándar de oro, es una prueba inmunológica muy sensible y se utiliza para detectar y cuantificar sustancias, incluidos anticuerpos, antígenos, proteínas, glicoproteínas y hormonas [55].

Existen diferentes tipos de ELISA, siendo de los más populares el ELISA tipo Sándwich, que recibe este nombre porque la proteína relevante queda atrapada entre dos moléculas de anticuerpo, lo que lo hace de 2 a 5 veces más sensible que los demás [56].

La prueba se realiza sobre una placa que contiene pocillos que están recubiertos con un anticuerpo de captura sobre los cuales se agrega la muestra; luego, la placa se incuba durante algún tiempo y se lava. El lavado elimina los antígenos no unidos.

Después de la etapa de lavado, se añaden y se incuban los anticuerpos que están marcados con la enzima específica del antígeno. Para revelar la actividad enzimática, se agrega sustrato enzimático al medio y se asegura la coloración. La coloración muestra un resultado positivo, mientras que la falta de coloración indica un resultado negativo [55].

Las pruebas de funcionalidad se realizaron con un Kit de la marca ALPCO No. Cat. 80-INSRT-E01 que permitió medir la insulina generada por los islotes tanto en cocultivo como control (Ver Apéndice “E”).

5. Resultados.

Para realizar los experimentos que permitieran verificar la diferencia en la viabilidad y funcionalidad en los hepatocitos e islotes pancreáticos en cocultivo vs controles, se desarrolló un protocolo en el que se emplearon pares de ratas, para extraer de una rata el páncreas y a partir de él aislar y purificar los islotes y de la otra rata obtener los hepatocitos.

Esto con varios propósitos, ya que además de facilitar la obtención de las células de cultivo primario, disminuir el riesgo de contaminación y favorecer la viabilidad, también se realizó de esta manera para emular lo que ocurre en los trasplantes donde hay un donador y un receptor.

Diariamente durante 5 días se obtuvieron islotes y hepatocitos de cultivo primario de rata, iniciando con el procedimiento para la obtención y cultivo en cajas de 35 mm de 6 muestras de hepatocitos (1.4×10^6), tres cajas para el cocultivo y tres para los controles y posteriormente se realizó el procedimiento para el aislamiento y purificación de islotes pancreáticos, los cuales una vez obtenidos fueron incorporados de a 30 islotes/caja en 3 de las cajas que contenían los hepatocitos para formar el cocultivo y en otras 3 cajas de 30 islotes que servirían para control (Ver figura No. 5-1).

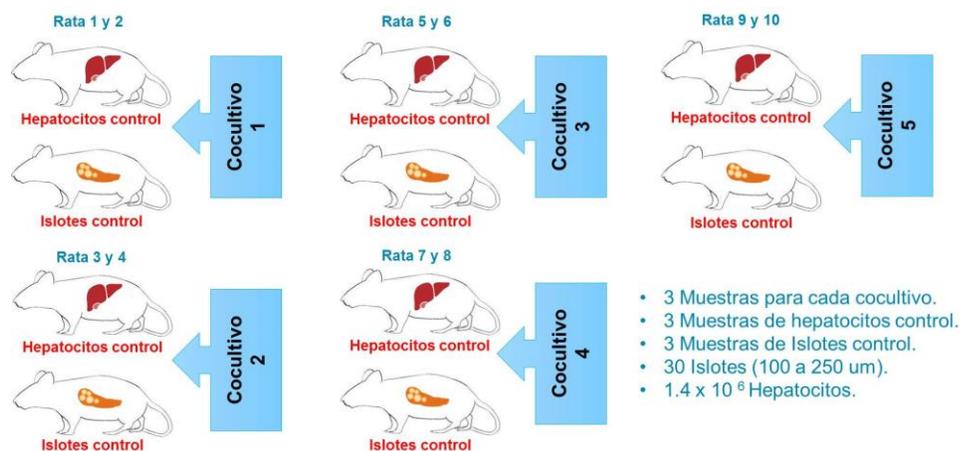


Figura 5-1: Protocolo desarrollado para las pruebas de viabilidad y funcionalidad del cocultivo. Elaboración propia.

5.1 Pruebas de viabilidad.

5.1.1 Hepatocitos.

Durante las pruebas de viabilidad de los hepatocitos con el kit de Calceína AM/Homodimero de Etidio-1, se observó que estos se teñían tanto de rojo (en su núcleo o núcleos) como de verde (el resto de la célula) por lo que se tenía la duda si estaban viables o no.

Por tal motivo se recurrió a otro tipo de sustancias comúnmente empleadas para medir viabilidad como azul de tripano y cristal violeta en donde se obtuvieron buenos resultados de 85 al 95% de viabilidad que son los reportados en la mayoría de los artículos que trabajan con este tipo celular.

Con estos resultados presentes, se realizó una revisión en la literatura y se encontró que los hepatocitos tienen afinidad y metabolizan el Etidio, razón por la cual cuando se usa el Bromuro de Etidio o el Homodimero de Etidio-1 se presenta este fenómeno[57], por lo tanto se prefiere usar el Ioduro de propídio para las pruebas de viabilidad en este tipo de célula.

Debido a esta situación ya no fue posible realizar un conteo de pixeles verdes/rojos para lograr una medición cuantitativa de la viabilidad recurriéndose a un análisis cualitativo comparando las imágenes obtenidas mediante el microscopio confocal.

Tanto en los hepatocitos control como en los hepatocitos en cocultivo se observaron condiciones de viabilidad similares, detectándose de una a cinco células no viables como máximo en cada una de las muestras para todos los días del estudio (1 a 5 días de cultivo) y apreciándose que entre más días se mantuvieran en cultivo las muestras más fácilmente se despegaban los hepatocitos cuando eran trasladados al laboratorio para su visualización en el microscopio confocal y por ello se aprecian más espacios y agregados en las imágenes (ver figura 5-2).

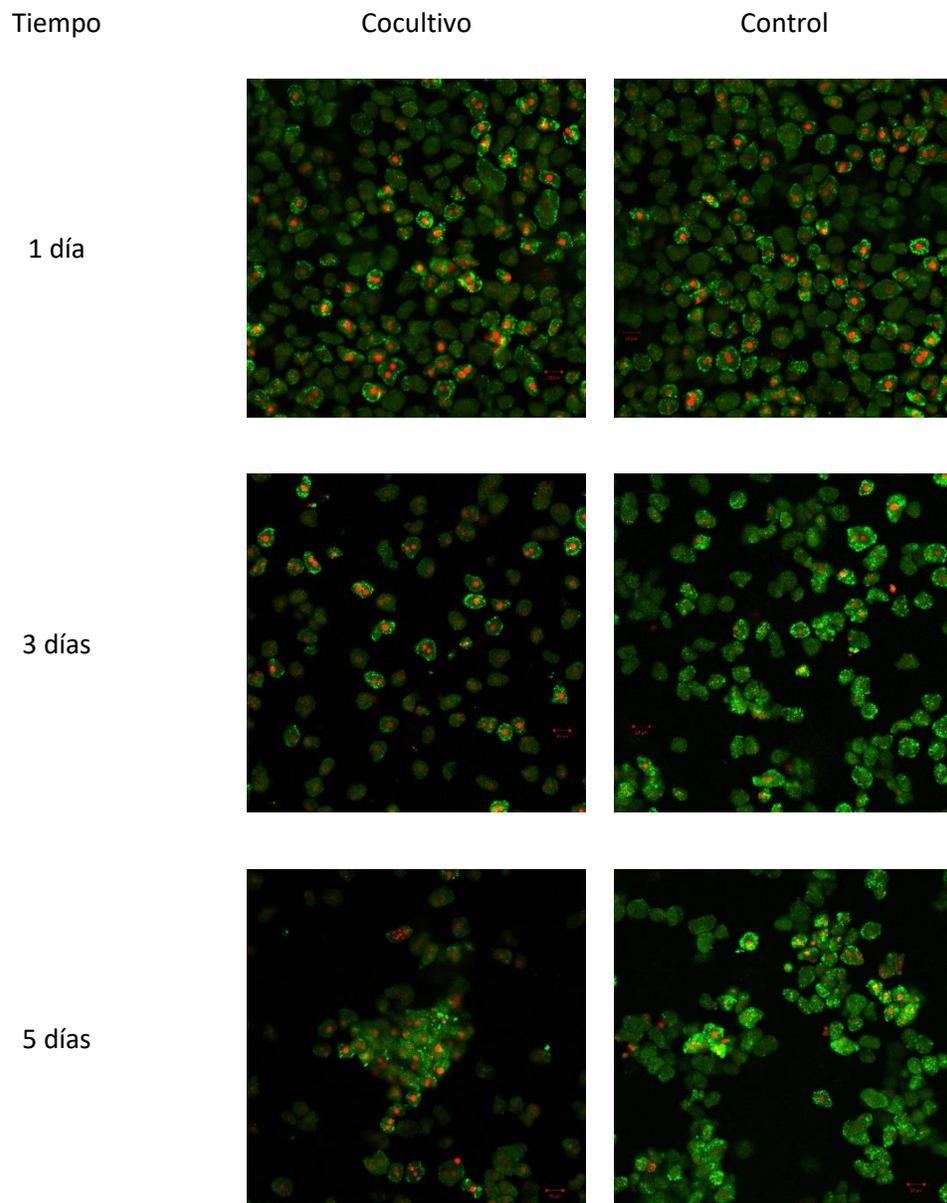


Figura 5-2: Pruebas de viabilidad celular realizadas con Calceina-AM y Homodimero de Etidio en los hepatocitos en cocultivo y hepatocitos control. Elaboración propia.

5.1.2 Islotes.

Una situación similar a la de los hepatocitos se pudo apreciar durante las pruebas de viabilidad en los islotes pancreáticos donde la totalidad de estos tanto en cocultivo como los control se encontraban viables, no detectándose que alguna de sus células componentes estuviera teñida de rojo (ver figura No. 5-3).

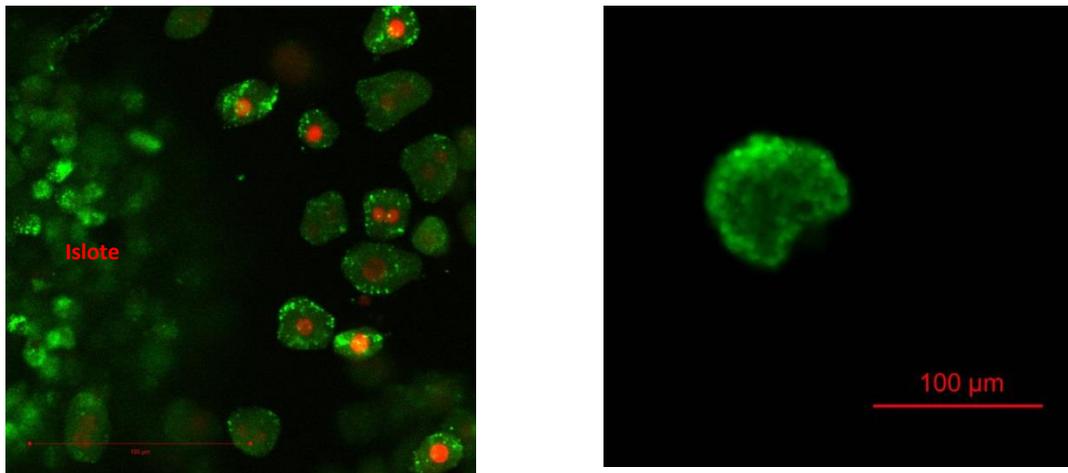
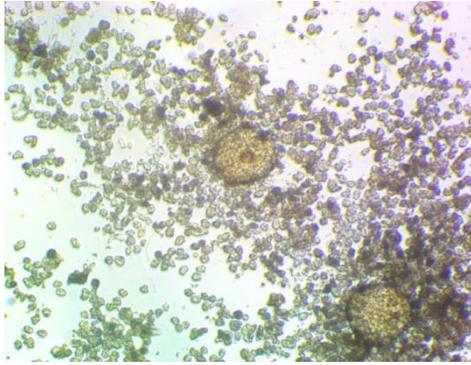


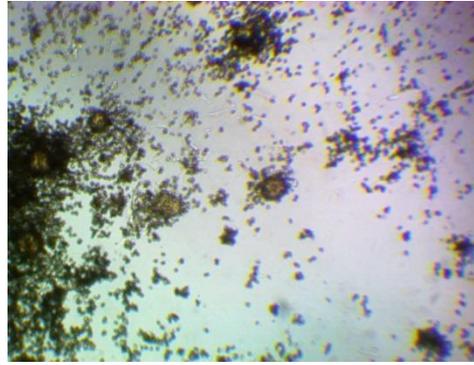
Figura 5-3: Pruebas de viabilidad realizadas en los islotes en cocultivo vs islotes control.

5.1.3 Cocultivo en campo claro.

Adicionalmente se realizaron observaciones de los cocultivos en campo claro a través del microscopio invertido, pudiéndose identificar claramente como los hepatocitos se benefician de la presencia de los islotes, puesto que después de 7 días de ser cultivados, los que se encuentran en la periferia de los islotes se mantienen adheridos en la caja de Petri, mientras que los más alejados se desprendieron y fueron removidos durante los cambios de medio dejando los espacios vacíos (ver figura 5-4).



(a)



(b)

Figura 5-4: Análisis morfológico en campo claro de los cocultivos islotes-hepatocitos de cultivo primario a los 7 días de cultivo, (a) X100, (b) X50.

5.2 Pruebas de Funcionalidad.

Para la prueba de ELISA, se utilizó un espectrofotómetro en donde fue introducida la placa (Ver figura No. 5-5) conteniendo los controles, estándares y muestras de sobrenadante de las cajas de cultivo con islotes en cocultivo y de las cajas con los islotes control para obtener sus valores de absorbancia o densidad óptica (DO) correspondientes.

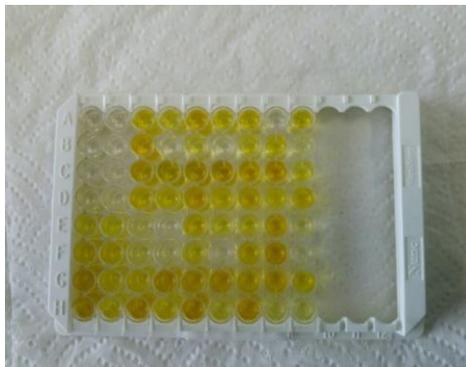


Figura 5-5: Placa de ELISA para detectar insulina de rata empleada durante las pruebas de funcionalidad.

Con los valores promedio de DO de los estándares proporcionados por el fabricante y su concentración en ng/ml, se obtuvo la curva de calibración estándar mediante un ajuste de regresión logística de cuatro parámetros como lo recomienda el fabricante (Ver figura 5-6).

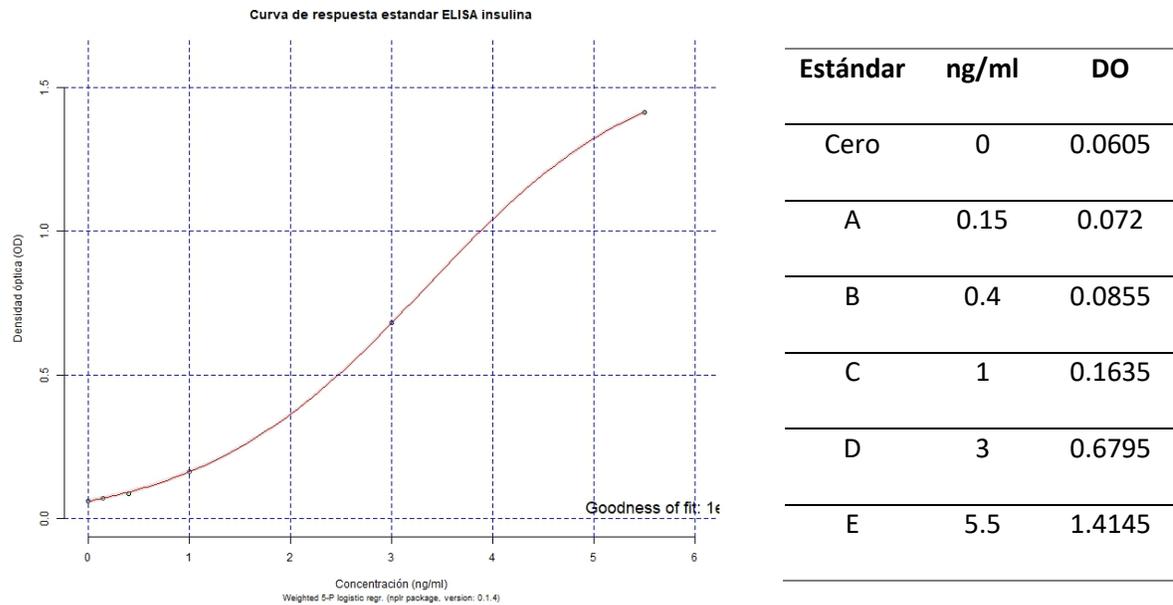


Figura 5-6: Curva estándar obtenida durante la prueba de ELISA para insulina de rata.

Posteriormente y antes de obtener los valores de concentración de las muestras, se les restó a todos ellos el valor de DO del estándar cero para hacer el ajuste y obtener los valores reales, mismos que se muestran en la tabla 5-1 para el caso de los islotes control y en la tabla 5-2 para los islotes cultivados junto con los hepatocitos en el cocultivo.

Es importante mencionar que se hicieron las mediciones de la insulina generada por las muestras siendo estimuladas tanto con una concentración baja de glucosa (2.75 mM) como con una concentración alta de glucosa (16.5 mM).

Esto con el propósito de calcular el índice de estimulación (IE), que es una razón entre la cantidad de insulina generada durante un tiempo de 60 minutos por los islotes estimulados en una alta concentración de glucosa entre la cantidad de insulina generada por los islotes estimulados con una concentración baja de glucosa y cuyo propósito es eliminar el sesgo derivado por los diferentes tamaños de los islotes contenidos en las muestras[58,59].

Muestra	Conc. Glucosa	1 día	2 días	3 días	4 días	5 días
		islotes	islotes	islotes	islotes	islotes
		1	2	3	4	5
1	Alta	1.329	1.519	1.919	2.415	0.332
	Baja	0.51	0.441	0.438	0.952	0.101
2	Alta	2.99	3.174	2.85	2.699	1.883
	Baja	0.673	0.633	0.738	1.027	0.513
3	Alta	2.51	0.688	1.805	2.214	2.753
	Baja	0.21	0.218	0.83	0.844	1.321

Tabla 5-1: Valores de DO obtenidos en las muestras con islotes control durante la prueba de ELISA para insulina de rata.

Muestra	Conc. Glucosa	1 día	2 días	3 días	4 días	5 días
		Cocult.	Cocult.	Cocult.	Cocult.	Cocult.
		1	2	3	4	5
1	Alta	1.232	2.291	1.922	1.493	1.33
	Baja	0.329	0.231	0.766	0.361	0.198
2	Alta	2.29	0.4	2.146	2.815	1.411
	Baja	0.901	0.11	0.418	0.697	0.279
3	Alta	0.998	0.895	2.795	2.052	2.678
	Baja	0.688	0.163	0.361	1.12	0.795

Tabla 5-2: Valores de DO obtenidos en las muestras de cocultivo durante la prueba de ELISA para insulina de rata.

Con base a los datos anteriores y sustituyendo los resultados de la DO en la ecuación de la curva estándar se obtuvieron los valores de la concentración de insulina (ng/ml) de cada una de las muestras de los cocultivos y controles, mismas que se indican en las tablas 5-3 y 5-4.

Muestra	Conc. Glucosa	1 día	2 días	3 días	4 días	5 días
		islotes	islotes	islotes	islotes	islotes
		1	2	3	4	5
1	Alta	5	6.4	7.63	9.27	1.9
	Baja	2.5	2.324	2.275	3.7	1.275
2	Alta	12.3	13	12.07	11.49	7.48
	Baja	3	2.9	3.45	4	2.5
3	Alta	9.4	3	7.26	8.36	10.69
	Baja	1.18	1.19	3.625	3.4	4.97

Tabla 5-3: Valores de concentración de insulina (ng/ml) obtenidos en la prueba de ELISA de los islotes control.

Muestra	Conc. Glucosa	1 día	2 días	3 días	4 días	5 días
		Cocult.	Cocult.	Cocult.	Cocult.	Cocult.
		1	2	3	4	5
1	Alta	4.6	8.66	7.65	6.1	5.07
	Baja	1.9	1.4	3.2	2	1.2
2	Alta	8.6	2.1	8.25	10.9	5.5
	Baja	3.6	0.6	2.2	3.21	1.73
3	Alta	3.9	3.6	11.92	7.9	10.31
	Baja	3	1	2	4.1	3.29

Tabla 5-4: Valores de concentración de insulina (ng/ml) obtenidos en la prueba de ELISA de las muestras con los cocultivos.

La producción promedio de insulina en 1 hora (30 islotes por muestra) del cocultivo y de los islotes control se muestra en la tabla 5-5. Los valores son acordes a los reportados en otros trabajos [51] y son ligeramente mayores para los islotes control, lo cual puede ser por la asimilación de insulina que tienen los hepatocitos en el cocultivo.

Producción promedio de insulina producida en ng/ml			
Cocultivo		Islotes control	
Glucosa baja	Glucosa alta	Glucosa baja	Glucosa alta
2.30	7.00	2.82	8.35

Tabla 5-5: Valores de concentración de insulina promedio (ng/ml) para alta y baja glucosa de las muestras.

Para verificar si existían diferencias significativas en los valores de concentración de insulina generada por los islotes en cocultivo vs islotes control en las diferentes concentraciones de glucosa se realizó la prueba estadística de U Mann-Whitney, no encontrándose diferencias significativas ($P > 0.05$) entre ellas.

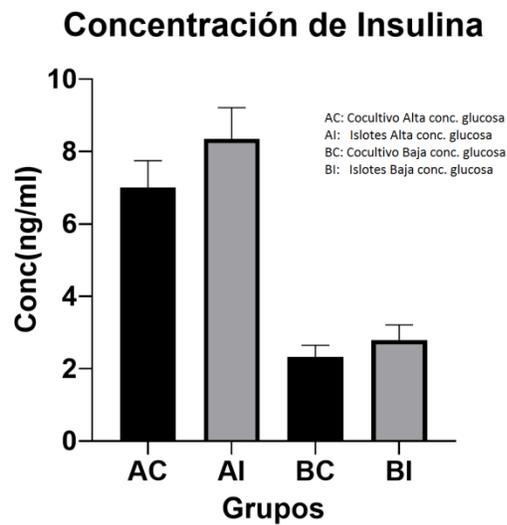


Figura 5-7: Gráfica de barras con los valores promedio de concentración de insulina obtenidos con alta y baja concentración de glucosa en el cocultivo vs islotes control, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los grupos. Elaboración propia.

Asimismo, se realizó la prueba de U Mann-Whitney para comparar los dos grupos tomando en consideración los valores de los índices de estimulación, no encontrándose diferencias significativas entre ellos ($P > 0.05$).

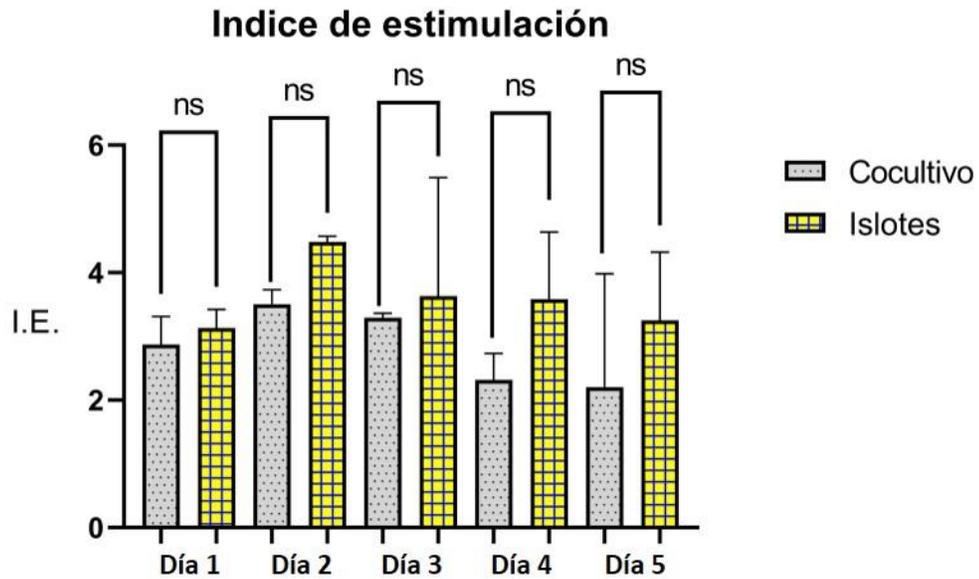


Figura 5-8: Gráfica de la prueba estadística U Mann-Whitney comparando índice de estimulación del cocultivo vs control. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los grupos. Elaboración propia.

5.3 Registro de actividad eléctrica.

Mediante el uso de la infraestructura de electrofisiología existente en el laboratorio de biofísica y con el propósito de verificar si existía un cambio en la actividad eléctrica durante la secreción de insulina al ser estimulados los islotes pancreáticos mediante la glucosa se empezaron a realizar experimentos de registro de actividad eléctrica extracelular de islotes pancreáticos (Ver figura 5-9).

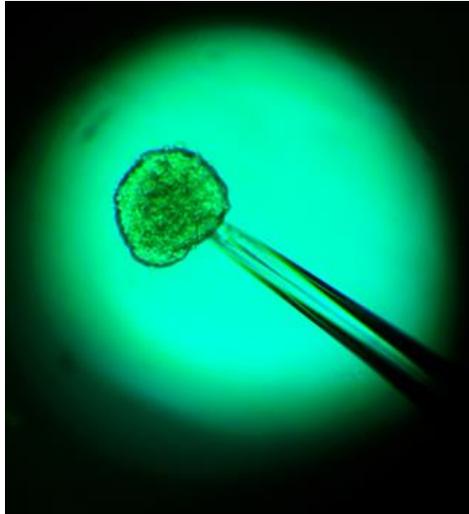


Figura 5-9: Registro de la actividad eléctrica extracelular de los islotes pancreáticos de rata. Elaboración propia.

Dichos experimentos consistieron primeramente en registrar la actividad eléctrica extracelular basal de los islotes con una muy baja glucosa (2.75mM) para compararla con la señal eléctrica que generan cuando son estimulados con una alta glucosa (26 mM), para detectar las diferencias y evidenciar la secreción de insulina.

Se realizó un análisis básico en el cual se promediaron 4 ventanas de tiempo de 10 segundos para descartar que pudiera ser ruido y para obtener el contenido en frecuencia de las señales registradas, observándose una diferencia tanto en amplitud como en frecuencia entre el nivel basal y la señal obtenida con estimulación de alta glucosa (Ver figura No. 10).

Esta señal eléctrica se pretendía comparar con la generada por los islotes en cocultivo con hepatocitos, para ver si las señales eran mayores en amplitud o se presentaban más frecuentemente las ráfagas por las interacciones entre los dos tipos de células, pero por

problemas técnicos (daño en el amplificador) ya no se pudo continuar con los trabajos de registro de la actividad eléctrica extracelular.

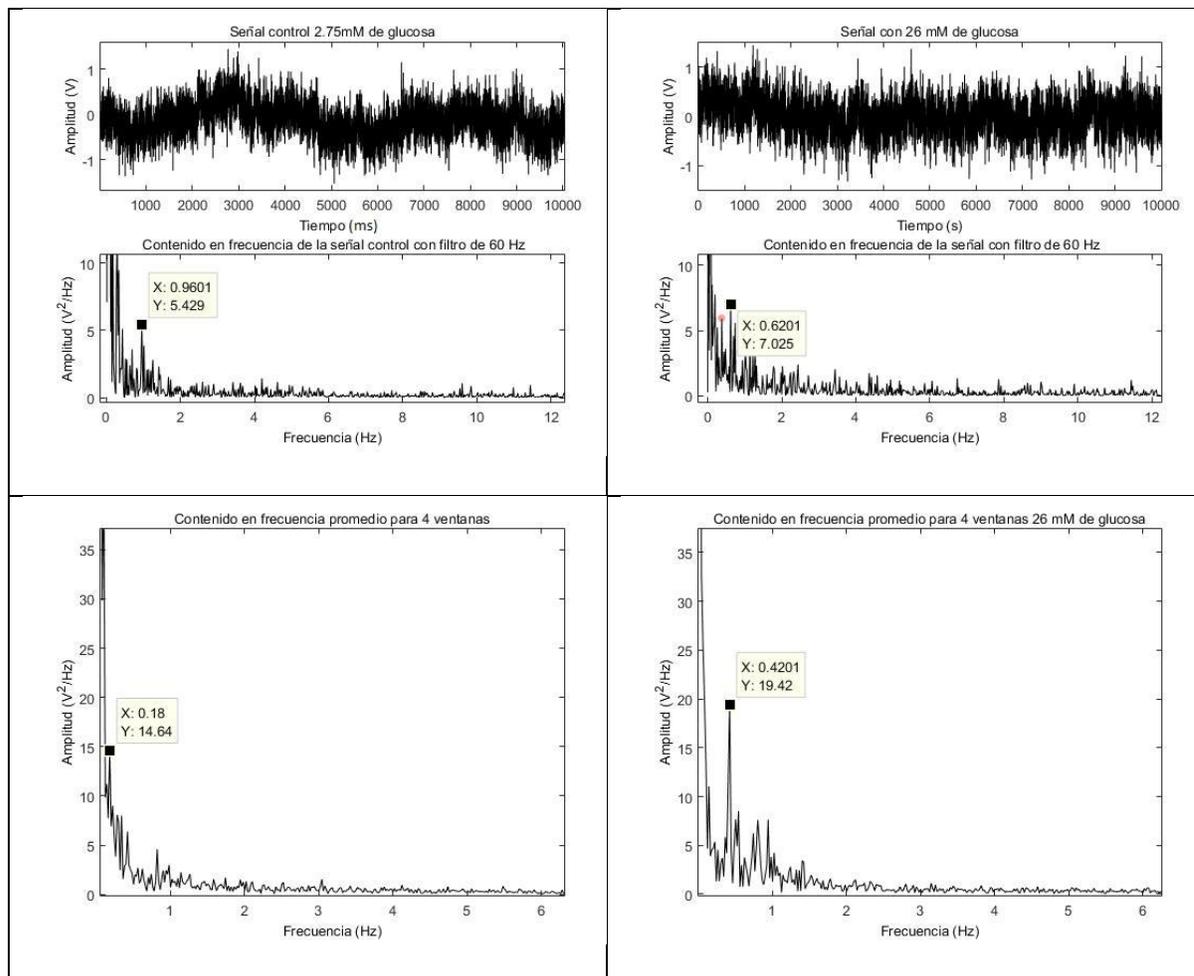


Figura 5-10: Contenido en frecuencia de las señales obtenidas durante el registro de actividad eléctrica de los Islotes. Elaboración propia.

5.4 Efectos de alta concentración de glucosa.

Con la intención de verificar experimentalmente los efectos de someter a los islotes a una alta concentración de glucosa, se cultivaron con una concentración de 25 mM, que está muy por

arriba de los 11.11 mM que contiene el medio de cultivo, observándose que presentaron daños a partir de los 7 días de cultivo mismos que se manifestaron inicialmente con células muertas en el centro de los islotes y posteriormente con su desintegración a los 15 días aproximadamente debido a la falta de cohesión por dichas células muertas (Ver figura 5-11).

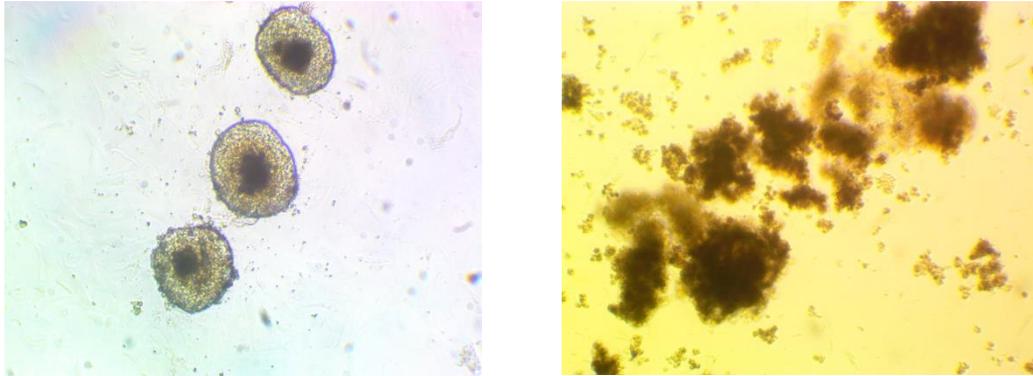


Figura 5-11: Efectos sobre los islotes de una concentración muy alta de glucosa en el medio de cultivo (a) Apoptosis en el centro de los islotes, (b) Disgregación de las células del islote. Elaboración propia.

6. Discusión.

El hígado es el sitio preferido para los trasplantes de islotes por su enorme espacio vascular que proporciona apoyo nutricional y físico para los islotes[60], sin embargo estos no se mantienen viables y funcionales más que por dos o tres años [37,38] por lo que se han realizado diversos trabajos de investigación intentando explicar este fenómeno, sin embargo hasta la fecha de la realización del presente trabajo no se había analizado la posibilidad de que las interacciones que se establecen con los propios hepatocitos les pudiera generar algún daño.

Este proyecto de investigación aporta evidencias de que es posible generar un modelo biológico de cocultivo hepatocitos-islotes pancreáticos que permita comprender cuales son los efectos de los hepatocitos sobre la viabilidad y funcionalidad de los islotes pancreáticos trasplantados en el hígado.

En el trabajo inicial se consideró el uso de líneas celulares para realizar este modelo biológico (RIN-m, RIN-m5F), por la facilidad y practicidad en el manejo que tienen este tipo de células, sin embargo durante los primeros experimentos se observó que su comportamiento no era homogéneo debido quizás a su origen tumoral. Esta situación junto con los avances que se iban teniendo en la estandarización de las técnicas para la obtención de células de cultivo primario originó que se decidiera realizar el cocultivo con islotes pancreáticos y hepatocitos obtenidos directamente del páncreas y del hígado de la rata respectivamente, lo que permitió que se tuviera un modelo más aproximado a la realidad.

Esta decisión generó cambios en el procedimiento para llevar a cabo el cocultivo, sobre todo en la forma en que se incorporaban las células, ya que con líneas celulares se colocaban inicialmente las células pancreáticas (RIN-m5F) las cuales una vez adheridas favorecían que los hepatocitos se fijaran a ellas, pero con el empleo de los islotes pancreáticos y debido a que solo se usaron 30 por

muestra, estos eran cubiertos por los hepatocitos e impedían su ubicación y visualización, por lo que se tuvo que intercambiar el orden, siendo necesario el uso de poly-L-lisina para recubrir las cajas de Petri para favorecer la adhesión de estos últimos.

Aprovechando que se contaba con los islotes pancreáticos de cultivo primario, se comprobó experimentalmente las consecuencias de que estén expuestos a altas concentraciones de glucosa, presentando apoptosis a partir de los 7 días de cultivo y desintegrándose aproximadamente a los 15 días, lo cual coincide con lo reportado por otros trabajos de investigación [61,62,63]

Los Hepatocitos se ven beneficiados con la presencia de los islotes y la generación de la insulina, situación que se apreció con la microscopía en campo claro en los cocultivos cuando al paso del tiempo y en la mayoría de los casos después de los 5 días, los hepatocitos más alejados de los islotes se empezaban a desprender; situación que coincide con lo descrito en la literatura [47,48,64].

Con la intención de realizar un estudio más completo se pretendía analizar los efectos que tienen los islotes sobre los hepatocitos, lográndose cubrir únicamente la viabilidad, ya que cuando se iba a efectuar la medición de la funcionalidad mediante la cuantificación de la albúmina generada, se tuvo conocimiento que el SFB incorporado al medio de cultivo contiene grandes cantidades de esta proteína. Situación que se decide exponer en esta discusión para que sea tomada en cuenta en trabajos posteriores.

Durante el desarrollo del presente trabajo también se logró conocer el procedimiento para el registro de la actividad eléctrica celular, lo cual permitió vislumbrar el enorme potencial que tiene este método para el estudio de los islotes pancreáticos y las células que los componen, registro que en la mayoría de los trabajos se realiza sobre las células beta aisladas por ser las productoras de la insulina, sin embargo por los experimentos realizados mediante la técnica del registro de actividad eléctrica extracelular confirmamos que el registro de islote completo es posible y valioso

ya que permitiría ahondar en fenómenos reportados como el acoplamiento existente entre las células[65–67], la existencia de un marcapasos funcional entre otros.[68]

Mediante el uso de la técnica de ELISA para medir insulina, el empleo del microscopio confocal y un kit de viabilidad con Calceina-AM y Homodimero de Etidio-1, así como el análisis mediante microscopía en campo claro, se pudo concluir que los hepatocitos por si solos no presentan efectos deletereos sobre los islotes pancreáticos, debido a que no se observaron en estos cambios significativos en su viabilidad y funcionalidad.

Los daños en los islotes se pueden deber entonces a factores ya reportados en la literatura como a la baja tensión de oxígeno que experimentan cuando han sido recién trasplantados, a los altos niveles de glucosa a los que son sometidos, exposición de metabolitos y fármacos, anoikis, entre otros[69,70,71,72].

Asimismo existen trabajos de investigación que han encontrado que algunos de los fármacos inmunosupresores (principalmente los corticoesteroides) que los pacientes tienen que estar usando para evitar el rechazo de los islotes trasplantados se concentran en el hígado y resultan tóxicos para estos, por lo que al paso del tiempo terminan por dañarlos [73].

7. Conclusiones.

Con base a los resultados obtenidos en este trabajo de investigación se puede concluir lo siguiente:

Mediante el uso de medios enzimáticos se logró en el Laboratorio de Biofísica, la obtención de hepatocitos e islotes pancreáticos de cultivo primario de rata en cantidades y con una viabilidad acorde a lo reportado por otros laboratorios.

Es posible generar un modelo biológico murino *in vitro* de cocultivo hepatocitos-islotes pancreáticos que permita verificar si la viabilidad y funcionalidad de estos últimos se ve afectada por las interacciones que ocurren entre ellos, durante los trasplantes de islotes en el hígado.

Las observaciones realizadas con microscopia en campo claro de los cocultivos hacen que se concluya que los hepatocitos se benefician con las hormonas generadas por los islotes pancreáticos principalmente la insulina la cual tiene efectos mitógenos sobre ellos.

Las mediciones de la insulina generada en las muestras de los islotes pancreáticos en cocultivo e islotes control realizadas a través de ELISA y las observaciones realizadas con el kit de Calceina-AM/Homodimero de Etidio-1, aportan indicios de que los hepatocitos por si solos no afectan negativamente la viabilidad y funcionalidad de los islotes.

8. Perspectivas.

Por la relevancia que representa el trasplante de islotes pancreáticos como posible terapia para tratar la diabetes mellitus tipo 1, es conveniente seguir investigando con mayor profundidad y extensión al respecto, por ello las perspectivas que se ven a futuro son las siguientes:

Se considera importante seguir realizando más experimentos para aumentar el tamaño de la muestra y obtener una potencia estadística mayor, ya que por las limitaciones en el tiempo y principalmente de reactivos, el tamaño de la muestra n de los experimentos para determinar la viabilidad y funcionalidad fue de 3.

En estos nuevos experimentos y para tener el panorama más completo de lo que ocurre durante los trasplantes de islotes pancreáticos, se considera conveniente que se realice la prueba de funcionalidad en los hepatocitos (ELISA albúmina), evitando usar medio de cultivo durante la hora que dura el experimento para recolectar el sobrenadante o usar medio pero sin suplementar con SFB.

Debido a que se logró efectuar el registro de la actividad eléctrica extracelular en los islotes, se considera importante la materialización de un trabajo de investigación donde se lleve a cabo un registro eléctrico y un procesamiento de las señales más completo, que permita investigar si existen diferencias en el tipo de señal generado por los islotes vs células beta aisladas, si las señales eléctricas generadas por las células alfa tienen influencia sobre las células beta y viceversa o si este tipo de células pueden ser empleadas como biosensores para desarrollar dispositivos que permitan medir la glucosa aprovechando este fenómeno de producción de corrientes eléctricas.

Realizar estudio *in vivo* en modelo murino con la finalidad de considerar los efectos globales, como por ejemplo la acción del sistema inmune, así como variables que no es posible replicar en un modelo *in vitro*.

9. Referencias.

1. Organization, W. H. Diabetes. Fact sheet No. 312. <http://www.who.int/> (2015).
2. CITR. Scientific Summary of the Collaborative Islet Transplant Registry (CITR) 2015 (Tenth) Annual Report. **2015**, 1–16 (2015).
3. Shapiro, M. J. *et al.* International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N. Engl. J. Med.* **355**, 1318–30 (2006).
4. Center, U. of C. at L. A. M. *Scientific Registry of Transplant Recipients, Transplant Program (Organ): Heart.* (2015).
5. Center, U. of C. at L. A. M. *Scientific Registry of Transplant Recipients, Transplant Program (Organ): Kidney.* (2015).
6. Robertson, R. P. Pancreas and islet transplants for patients with diabetes: taking positions and making decisions. *Endocr. Pract.* **5**, 24–28 (1999).
7. Organization, W. H. *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus.* (1999).
8. World Health Organization. Global Health Estimates 2016: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region 2000-2016. http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/en/. (2016).
9. Organization, W. H. *Global status report on noncommunicable diseases 2014.* (2014).
10. Barraza-Lloréns, M., Guajardo-Barrón, V., Picó, J., García, R. & Hernández, C. Carga económica de la diabetes mellitus en México. *Funsalud* (2015).
11. (ADA), A. D. A. Economic costs of diabetes in the U.S. in 2007. *Diabetes Care* **31(3)**, 596–615 (2008).
12. Organization, W. H. *Noncommunicable Diseases (NCD) Country Profiles , Mexico.* http://www.who.int/nmh/countries/mex_en.pdf (2014).
13. Fonseca, V. A. Defining and characterizing the progression of type 2 diabetes. *Diabetes*

Care **32 Suppl 2**, (2009).

14. Weyer, C. & Tataranni, P. A. Insulin Resistance and Insulin Secretory Dysfunction Are Independent Predictors. *Pathophysiology/Complications* **24**, 89–94 (2001).
15. Group, U. K. P. D. S. U.K. Prospective Diabetes Study 16: Overview of 6 Years' Therapy of Type II Diabetes: A Progressive Disease. *Diabetes* **44**, 1249–1258 (1995).
16. American Diabetes Association. Approaches to Glycemic Treatment. *Diabetes Care* **39**, 52–59 (2016).
17. Foretz, M., Guigas, B. & Viollet, B. Understanding the glucoregulatory mechanisms of metformin in type 2 diabetes mellitus. *Nat. Rev. Endocrinol.* **15**, 569–589 (2019).
18. Wei, L. V., Xianqing, W., Qian, X. & Wencong, L. Mechanisms and Characteristics of Sulfonylureas and Glinides. *Curr. Top. Med. Chem.* **20**, 37–56 (2020).
19. Center, H. I. The National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases.
20. Peyser T., Dassau E., Breton M., S. J. S. The artificial pancreas: current status and future prospects in the management of diabetes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1311**, 102–123 (2014).
21. D.B., K. Pancreas Transplantation. *Medscape* (2015).
22. Rosenberg, L. Pancreatic and Islet Transplantation. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **2**, 165–172 (2000).
23. Sutherland, D. E. R. *et al.* Beta-cell replacement therapy (pancreas and islet transplantation) for treatment of diabetes mellitus: An integrated approach. *Transplant. Proc.* **36**, 1697–1699 (2004).
24. Saito, K., Iwama, N. & Takahashi, T. Morphometrical analysis on topographical difference in size distribution, number and volume of islets in the human pancreas. *Tohoku J Exp Med.* **124**, 177–186 (1978).
25. Korsgren, O. *et al.* Current status of clinical islet transplantation. *Transplantation* **79**, 1289–1293 (2005).
26. Cabrera, O. *et al.* The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications

- for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 2334–2339 (2006).
27. Brissova, M. et al. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem* **53**, 1087–1097 (2005).
 28. Arias Diaz, J., Vara, E. & Balibrea, J. L. Ultimos avances en el campo del trasplante de islotes de Langerhans. *Cir. Española* **70**, 310–313 (2001).
 29. Yang E.Y., Kronenfeld J.P., S. C. H. Engineering Biomimetic Materials for Islet Transplantation. *Curr Diabetes Rev.* **11(3)**, 163–169 (2015).
 30. Papas, K. K. et al. NMR spectroscopy in beta cell engineering and islet transplantation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **944**, 96–119 (2001).
 31. Kemp, C. B., Knight, M. J., Scharp, D. W., Ballinger, W. F. & Lacy, P. E. Effect of transplantation site on the results of pancreatic islet isografts in diabetic rats. *Diabetologia* **9**, 486–491 (1973).
 32. Najarian, J. S. et al. Total or near total pancreatectomy and islet autotransplantation for treatment of chronic pancreatitis. *Ann. Surg.* **192**, 526–542 (1980).
 33. Sutherland, D., Matas, A., Goetz, F. & Najarian, J. Transplantation of Dispersed Pancreatic Islet Tissue in Humans: Autografts and Allografts. *Diabetes* **29**, 31–44 (1980).
 34. Scharp, D. W. et al. Insulin Independence After Islet Transplantation Into Type I Diabetic Patient. *Diabetes* **39**, 515–518 (1990).
 35. Cantarelli, E. & Piemonti, L. Alternative transplantation sites for pancreatic islet grafts. *Curr. Diab. Rep.* **11**, 364–374 (2011).
 36. Ryan, E. A. et al. Five-Year Follow-Up After Clinical Islet Transplantation. *Diabetes* **54**, 2060–2069 (2005).
 37. Alejandro, R., Barton, F. B., Hering, B. J. & Wease, S. 2008 Update from the Collaborative Islet Transplant Registry. *Transplantation* **86**, 1783–8 (2008).
 38. Barton, F. B. et al. Improvement in outcomes of clinical islet transplantation: 1999-2010. *Diabetes Care* **35**, 1436–1445 (2012).

39. Markmann, J. F. *et al.* Magnetic Resonance–Defined Periportal Steatosis Following Intraportal Islet Transplantation. *Diabetes* **52**, 1591–1594 (2003).
40. Ian, F. R. *Culture of Animal Cells A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. (Wiley Blackwell, 2016).
41. ATCC. RINm (ATCC® CRL-2057™). *Prod. sheet* 1–3 (2007).
42. ATCC. RIN-m5F (ATCC® CRL- 11605™). *Product sheet* 1–3 (2007).
43. Berry, M. N. & Friend, D. S. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J. Cell Biol.* **43**, 506–550 (1969).
44. Seglen, P. O. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol.* **13**, 29–83 (1976).
45. Shen, L., Hillebrand, A., Wang, D. Q.-H. & Liu, M. Isolation and primary culture of rat hepatic cells. *J. Vis. Exp.* 1–4 (2012) doi:10.3791/3917.
46. Gazdar, A. D. I. F. *et al.* continuous, clonal, insulin- and somatostatin-secreting cell lines established from a transplantable. **77**, 3519–3523 (1980).
47. Kuo, C., Juang, J. & Peng, H. Coculture of Hepatocytes with Islets. *Elsevier* **43**, 3167–3170 (2011).
48. Kaufmann, P. M. *et al.* Influence of Pancreatic Islets on Growth and Differentiation of Hepatocytes in Co-Culture. *Tissue Eng.* **5**, 583–596 (1999).
49. Yamada, S., Otto, P. S., D.L., K. & T.F., W. The effects of dexamethasone on metabolic activity of hepatocytes in primary monolayer culture. *In Vitro* **16**, 559–570 (1980).
50. Oh, H. Y., Namkoong, S., Lee, S. J., Por, E. & Kim, C. K. Dexamethasone protects primary cultured hepatocytes from death receptor-mediated apoptosis by upregulation of cFLIP. *Cell Death Differ.* **13**, 512–523 (2006).
51. Bailly-Maitre, B., De Sousa, G., Boulukos, K. & Gugenheim, J. Dexamethasone inhibits spontaneous apoptosis in primary cultures of human and rat hepatocytes via Bcl-2 and Bcl-xL induction. *Cell Death Differ.* **8**, 279–288 (2001).
52. Fugett Abu-Absi, S., Hu, W. S. & Hansen, L. K. Dexamethasone Effects on Rat Hepatocyte

- Spheroid Formation and Function. *Tissue Eng.* **11**, 3–4 (2005).
53. Moore, P., MacCoubrey, I. & Haugland, R. A rapid, pH insensitive, two color fluorescence viability (cytotoxicity) assay. *J. Cell Biol. Biol* **111** (1990).
 54. Gutierrez, L., Stepien, G., Perez-Hernandez, M., Pardo, J. & De la fuente, J. M. General Perspective – The Future of Drug Discovery. *Elsevier* 264–295 (2017).
 55. Aydin, S. A short history , principles , and types of ELISA , and our laboratory experience with peptide / protein analyses using ELISA. *Peptides* **72**, 4–15 (2015).
 56. Konstantinou, G. N. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Methods Mol Biol.* **1592**, 79–94 (2017).
 57. Tetley, J. N. A., Skellern, G. G., Midgley, J. M., Grant, M. H. & Pitt, A. R. Intracellular localization and metabolism of the phenanthridinium trypanocide, ethidium bromide, by isolated rat hepatocytes. *Xenobiotica* **29**, 349–360 (1999).
 58. Dellê, H., Saito, M. H., Yoshimoto, P. M. & Noronha, I. L. The Use of Iodixanol for the Purification of Rat Pancreatic Islets. *Elsevier* 467–469 (2007) doi:10.1016/j.transproceed.2007.01.039.
 59. Sakata, N., Egawa, S. & Sumi, S. Optimization of Glucose Level to Determine the Stimulation Index of Isolated Rat Islets. *Pancreas* **36**, 417–423 (2008).
 60. Pepper, A. R., Gala-lopez, B., Ziff, O. & Shapiro, A. M. J. Revascularization of Transplanted Pancreatic Islets and Role of the Transplantation Site. *Clin. Dev. Immunol.* **2013**, 1–13 (2013).
 61. Federici, M., Hribal, M., Perego, L., Ranalli, M. & Caradonna, Z. High Glucose Causes Apoptosis in Cultured Human Pancreatic Islets of Langerhans. *Diabetes* **50**, 1290–1301 (2001).
 62. Mellado-Gil, J. M. & Aguilar-Diosdado, M. High glucose potentiates cytokine- and streptozotocin-induced apoptosis of rat islet cells: effect on apoptosis-related genes. *Endocrinology* **1**, 155–162 (2004).
 63. Gong, L., Qiang, L. F., Wang, L. & Wang, X. P. Hyperglycemia induces apoptosis of

- pancreatic islet endothelial cells via reactive nitrogen species-mediated Jun N-terminal kinase activation. *Biochim. Biophys. Acta* **1813**, 1211–1219 (2011).
64. Wang, M. *et al.* Insulin-like growth factor 2 is a key mitogen driving liver repopulation in mice. *Cell Death Dis.* 1–11 (2018) doi:10.1038/s41419-017-0186-1.
 65. Eddlestone, G. T., Gonçalves, A., J.A., B. & E., R. Electrical coupling between cells in islets of langerhans from mouse. *J. Membr. Biol.* **77**, 1–14 (1984).
 66. Briant, L. J. B., Reinbothe, T. M., Spiliotis, I., Miranda, C. & Rodriguez, B. δ -cells and β -cells are electrically coupled and regulate α -cell activity via somatostatin. *Physiology* **2**, 197–215 (2018).
 67. Zhang, Q., Galvanovskis, J. & F., A. Cell Coupling in Mouse Pancreatic β -Cells Measured in Intact Islets of Langerhans. *Philos. Trans.* **366**, 3503–3523 (2008).
 68. Johnston, N. R., Mitchell, R. K., Haythorne, E. & Pessoa, M. P. Beta Cell Hubs Dictate Pancreatic Islet Responses to Glucose. *Cell Metab.* **24**, 389–401 (2016).
 69. Mridha, A. R., Dargaville, T. R. & Tuch, B. E. Bioengineering Approaches to Islet Transplantation for Management of Diabetes. *Compr. Biomater. II* **6**, 424–434 (2017).
 70. Rother, K. I. & Harlan, D. M. Challenges facing islet transplantation for the treatment of type 1 diabetes mellitus. *Sci. Med.* **114**, 877–883 (2004).
 71. Bottino, R., Knoll, M. F., Knoll, C. A., Bertera, S. & Trucco, M. M. The Future of Islet Transplantation Is Now. *Front. Med.* **5**, 1–13 (2018).
 72. Robertson, P., Davis, C., Larsen, J., Stratta, R. & Sutherland, D. Pancreas and Islet Transplantation for Patients With Diabetes. *Diabetes* **23**, 112–116 (2000).
 73. Emamaullee, J. A., Pepper, A. & James Shapiro, A. M. Islet Cell Transplantation. *Princ. Regen. Med.* 987–1007 (2019).
 74. Ling, Z., Hannaert, J. C. & Pipeleers, D. Effect of nutrients, hormones and serum on survival of rat islet beta cells in culture. *Diabetologia* **37**, 15–21 (1994).
 75. Berney, T. Proliferation of sorted human and rat beta cells. *Diabetologia* (2008) doi:10.1007/s00125-007-0855-1.

76. Ribalet, B. & Ciani, S. Regulation by cell metabolism and adenine nucleotides of a K channel in insulin-secreting B cells (RIN m5F) PON ! *Physiol. Sci.* **84**, 1721–1725 (1987).
77. Praz, G. A. *et al.* Regulation of immunoreactive-insulin release from a rat cell line (RINm5F). *Biochemical* **210**, 345–352 (1983).
78. Amoreaux, W. J. L. *et al.* Taurine regulates insulin release from pancreatic beta cell lines. *J. Biomed. Sci.* **17**, 1–8 (2010).
79. Cui, Y., Shakesheff, K. M. & Adams, G. Encapsulation of RIN-m5F cells within Ba 2 þ cross-linked alginate beads affects proliferation and insulin secretion. *J. Microencapsul.* **23**, 663–676 (2006).

10. Apéndices.

10.1 Apéndice "A": Procedimiento para el cultivo de células Rin-m y Rin-m5F.

1. Antes de extraer los viales conteniendo las células congeladas del depósito de nitrógeno líquido o del ultracongelador, se requiere poner a calentar el medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con SFB y con A/A en un baño maría a 37 °C, para lavar las células inmediatamente una vez que las células sean descongeladas y evitar empiecen a sufrir daños por el DMSO agregado durante su congelación, el cual es citotóxico a temperatura ambiente.
2. En la campana de flujo laminar agregar el medio de cultivo a 37 °C en un tubo cónico en una proporción de 4:1 de la cantidad de células contenidas en el microvial.
3. Extraer los viales del recipiente de nitrógeno líquido y descongelarlos en el baño maría a 37°C.
4. Una vez que se hayan descongelado completamente y que ya no presenten rastros de hielo, se rocían con alcohol y se introducen en la campana de flujo laminar.
5. Con una pipeta se extraen las células y se vacían en el tubo cónico previamente preparado con el medio de cultivo para lavar el DMSO.
6. Posteriormente se centrifugan a una velocidad de 1200 RPM durante 5 minutos para que se forme el pellet celular en el fondo del tubo.
7. Terminado el tiempo se extraen de la centrifuga y se rocían con alcohol y se llevan a la campana donde se retira el medio de cultivo empleado para su lavado, extrayéndolo con

mucho cuidado para evitar desintegrar el pellet celular y retirar accidentalmente las células.

8. Una vez retirado completamente el medio empleado para el lavado, colocar 1 ml de medio de cultivo fresco previamente calentado a 37 °C y se homogeniza con la pipeta para deshacer el pellet celular.
9. Se colocan sobre cajas de Petri de 100 mm previamente marcadas con el tipo celular cultivado, el número de pase y la fecha en que se realizó el cultivo con 5 o 6 ml de medio evitando hacer burbujas con la pipeta.
10. Se balancea suavemente la caja de un lado a otro en ambas direcciones evitando hacer giros para que se dispersen por toda la superficie de la caja.
11. Se observan en el microscopio para ver la concentración, las características y morfología de las células.
12. Se colocan en la incubadora de CO₂ con una concentración de 5% de CO₂ y a una temperatura de 37°C.

Cambio de medio de cultivo.

1. El cambio de medio de cultivo se realiza a las primeras 24 horas inmediatamente después de descongelar las células y posteriormente cada tercer día.
2. Calentar el medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con SFB y A/A a 37 °C.
3. Sacar las células de la incubadora de CO₂ observarlas en el microscopio para ver sus condiciones y detectar que tantas células se adhirieron y que porcentaje no son viables y se encuentran flotando.

4. En la campana de flujo laminar, con una mano abrir la tapa de la caja de Petri y con la otra tomar la pipeta para extraer el medio de cultivo haciéndolo con cuidado para evitar tocar las paredes o el fondo de la caja.
5. Si existen muchas células muertas es conveniente realizar un lavado con PBS, por lo que debemos retirar la totalidad del medio, caso contrario retirar solo una parte, procurando dejar unos 2 ml para evitar detener la proliferación de las células, ya que este medio contiene sustancias que favorecen el crecimiento.
6. Con una nueva punta de pipeta incorporar el medio de cultivo fresco en la misma cantidad que la que retiramos más 1 ml para compensar la evaporación.
7. Antes de guardar la caja de Petri con las células en la incubadora de CO₂, observarla en el microscopio para ver el estado de nuestras células.

Subcultivo de las células.

1. Cuando las células RIN-m o RIN-m5F lleguen a confluencia (o preferentemente cuando el porcentaje de ocupación de la caja de Petri sea entre el 80 y 90%) es necesario realizar el subcultivo de las mismas para evitar que compitan por los nutrientes o que se inhiba la división celular por contacto.
2. Las células RIN-m y RIN-m5F se adhieren al fondo de la caja en forma de monocapa, por lo que es necesario el empleo de enzimas (tripsina) para despegarlas y poder realizar el subcultivo o pase.
3. Con una pipeta retirar el medio de cultivo totalmente, teniendo cuidado de no dañar las células con la punta.

4. Realizar un lavado con PBS ya que con esto se elimina el suero del medio el cual se comporta como un inhibidor de la tripsina.
5. Retirar el PBS e incorporar de 1.5 a 2 ml de tripsina-EDTA al 0.25% (No. Cat. T4049 Sigma-Aldrich) para que se cubra la totalidad de la superficie de la caja, mover gentilmente para favorecer su acción.
6. Introducir la caja de Petri en la incubadora de CO₂ de 2 a 5 minutos, ya que a la temperatura de 37 °C se potencializa su efecto, observando las células a cada minuto en el microscopio para determinar el tiempo exacto que requieren para que se despeguen y evitar se empiecen a dañar por una sobreexposición a la tripsina.
7. Retirar con una pipeta las células despegadas y colocarlas en un tubo cónico con medio fresco en una proporción de 4:1 es decir con 8 ml de medio.
8. Centrifugar por 5 minutos a 1200 RPM para que se forme el pellet o botón celular.
9. Rociar con alcohol etílico al 70% el tubo cónico para introducirlo a la campana de flujo laminar en donde con una pipeta se retira el sobrenadante.
10. Incorporar 1 ml de medio RPMI-1640 fresco suplementado y homogenizar las células.
11. Con la pipeta tomar la cantidad de medio necesario en función de las cajas de petri a cultivar o la cantidad de células que queremos colocar en cada caja (usar previamente un hemocitometro o contador celular para determinar la concentración).
12. Colocar las células en cajas de Petri con 5 a 6 ml de medio RPMI-1640 fresco suplementado previamente marcadas con tipo celular, número de pase y fecha.
13. Observar en el microscopio e introducir en la incubadora de CO₂.

10.2 Apéndice “B”: Procedimiento para la obtención de hepatocitos de rata de cultivo primario.

1. Anestesiarse a la rata con Isoflurano con 1 ml para inducción y 1 ml para mantenimiento, si se cuenta con máquina de anestesia seguir las indicaciones de concentración del fabricante.
2. Rasurar la zona abdominal de la rata y rociar dicha zona con alcohol etílico al 70% para su desinfección.
3. Realizar un corte con las tijeras de punta roma (piel y músculo) por ambos lados a partir de un centímetro arriba de los genitales y hasta llegar a las costillas siguiendo el contorno exterior del abdomen.
4. Con una pinza Kelly levantar la piel y músculo cortados y colocarla hacia la parte de la cabeza, para despejar y exponer las vísceras.
5. Con una sonda acanalada hacer las vísceras hacia el lado derecho para exponer la vena porta, posteriormente con una pinza de disección con punta muy fina realizar la disección de la vena para introducir por debajo dos pedazos de hilo para sutura que servirán para fijar el catéter calibre 18 G con el cual se perfundirán los bufferes hacia el hígado.
6. Introducir el catéter 18G en la vena porta con mucho cuidado para evitar romperla y después sujetarlo con los hilos de sutura haciendo doble nudo para que no se mueva.
7. Conectar la bomba peristáltica al catéter y perfundir con el primer buffer (100 ml HBSS sin calcio, sin magnesio y con EDTA) a una velocidad de 10 ml/min lo que provocará que el hígado se empiece a blanquear (se torna de un color amarillento), en cuanto esto ocurra cortar la vena cava inferior para permitir que el buffer salga y aumentar la velocidad de perfusión a 25 ml/min.

8. Una vez consumidos los 100 ml del primer buffer, cambiar al segundo buffer (150 ml HBSS con calcio y con 500 U de la colagenasa tipo II Mca. Gibco No. Cat. 17101-015) manteniendo la velocidad de 25 ml/min.
9. Ambos buffers deberán de estar a baño maría a una temperatura de 42 °C, lo que permitirá que cuando hagan el recorrido por la bomba peristáltica y lleguen al catéter tengan una temperatura aproximada de 37 °C.
10. Periódicamente interrumpir el flujo a través de la vena cava presionándola por unos segundos con la sonda acanalada para que la colagenasa tenga un mejor efecto.
11. Una vez concluido el proceso de perfusión, extraer el hígado el cual debe tener una consistencia muy gelatinosa y de color amarillento uniforme, para posteriormente sacrificar a la rata por dislocación cervical.
12. Colocar el hígado extraído en una caja de Petri estéril con 5 ml de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% SFB y 1% A/A y con un raspador celular machacarlo gentilmente para dispersar las células y separarlas de la cápsula de Glisson (membrana transparente que protege al hígado).
13. Sobre un tubo cónico de 50 ml filtrar las células con un filtro celular de nylon de 100 µm para retirar el tejido conectivo y tejido sin digerir.
14. Colocar el contenido filtrado con 10 ml de medio RPMI-1640 suplementado en un tubo cónico de 15 ml y centrifugar durante 3 min a 750 RPM para lavar las células y retirar la colagenasa. Aspirar el sobrenadante con una pipeta y repetir el mismo procedimiento.
15. Una vez retirado el sobrenadante del segundo lavado, colocar 5 ml de medio de cultivo fresco y homogenizar los hepatocitos; incorporar 5 ml de gradiente de densidad Percoll al 90% sobre PBS y centrifugar a 1200 RPM durante 10 minutos (si se cuenta con una centrifuga refrigerada realizar el procedimiento a 4 °C).

16. Retirar el sobrenadante y las células muertas que se encontrarán por arriba del gradiente de densidad. Incorporar 10 ml de medio fresco y realizar un lavado para retirar el Percoll centrifugando a 750 RPM durante 3 minutos.
17. Una vez retirado el sobrenadante del lavado, incorporar 1 ml de medio fresco, homogenizar y tomar una muestra para contar los hepatocitos en el hemocitometro o contador celular para conocer la concentración.
18. Colocar la cantidad deseada de hepatocitos en la caja de Petri de 100 mm con 6 ml de RPMI1640 e incubar a 37 °C con 5% de CO₂.

10.3 Apéndice “C”: Procedimiento para el aislamiento y purificación de islotes pancreáticos de rata de cultivo primario.

1. Anestesiarse al animal con pentobarbital sódico con una dosis de 50 mg/kg vía intraperitoneal.
2. Rasurar y rociar el abdomen con alcohol 70% para reducir la posibilidad de contaminación con el pelo del animal.
3. Con unas tijeras de punta roma, realizar un corte sobre la piel y músculo en forma de C a partir de 1 cm por arriba de los genitales y extendiéndose a las partes laterales hacia las costillas para exponer todos los órganos de la cavidad peritoneal.
4. Con una pinza Kelly levantar la piel y músculo cortados y colocarla hacia la parte de la cabeza, para despejar y exponer las vísceras.
5. Con una sonda acanalada hacer las vísceras hacia el lado derecho para exponer el páncreas. Ubicar la unión con el duodeno (ámpula de vater) y colocar una pinza Kelly en

ese punto como referencia y para ayudar a realizar la disección de aproximadamente 5 mm del conducto pancreático en su porción más distal.

6. Canular el conducto pancreático, con un catéter 26G, teniendo mucho cuidado para no romperlo ya que es extremadamente delgado, pudiendo emplear una lámpara para facilitar esta acción.
7. Fijar el catéter al conducto pancreático usando un pedazo de hilo de sutura procurando usar la presión correcta para impedir que se salga el catéter pero sin ser demasiada como para aplastarlo, asimismo colocar otro hilo de sutura en la parte más proximal del conducto para evitar que el buffer se fugue hacia el hígado.
8. Llenar una jeringa con 10 ml de HBSS lo más frío posible pero sin llegar a la congelación y perfundir el páncreas con dicha solución a través del catéter ya instalado en el conducto pancreático, lo que facilitará la identificación y extracción de este órgano, así como para mejorar la viabilidad celular. Una vez perfundido retirar la jeringa.
9. Usando tijeras de punta muy fina separar suavemente el páncreas de los intestinos, para continuar hacia la curvatura mayor del estómago y finalmente separarlo del bazo, haciendo los cortes con precaución para evitar la ruptura intestinal y reducir el riesgo de contaminación. Una vez extraído sacrificar a la rata mediante dislocación cervical.
10. Colocar el páncreas en un caja de Petri con 10 ml de HBSS frío para realizar el lavado del órgano y retiro de coágulos sanguíneos. Repetir si es necesario este paso una vez más.
11. Verter el páncreas en un vaso de precipitado de 250 ml para cortarlo en trozos muy pequeños con unas tijeras finas. Agregar 5 ml de HBSS frío mezclados con 3 mg de colagenasa (Colagenasa Tipo V Mca. Sigma No. Cat. c9263-500), cortar el páncreas por otros 30 segundos para favorecer el contacto con la colagenasa y vaciar todo en un tubo cónico de 15 ml.

12. Incorporar otros 5 ml de HBSS frío al vaso de precipitado para realizar un lavado y tratar de recuperar todo el tejido. Vaciar al tubo cónico del paso anterior para lograr la concentración deseada (0.3 mg/ml de colagenasa).
13. Colocar el tubo en un baño maría con agitación a 37°C durante 6 minutos a 110 RPM. El tubo debe quedar completamente sumergido, para que se active la colagenasa y haga su función.
14. Posteriormente agitar vigorosamente de manera manual el tubo que contiene el páncreas digerido, durante 30 segundos para completar la separación del tejido.
15. Distribuir el contenido del tubo, en dos tubos cónicos de 15 ml y agregar HBSS enriquecida con SFB al 5% y A/A al 1% para detener el efecto de la colagenasa, hasta completar los 10 ml.
16. Centrifugar ambos tubos durante 10 min a 750 RPM a 4°C.
17. Retirar el sobrenadante con una pipeta serológica haciéndolo de forma circular sobre la superficie, hasta dejar 2.5 ml aproximadamente. Agregar HBSS enriquecido frío hasta llegar a 5 ml, agitar manualmente para romper el botón y posteriormente agregar 5 ml más de dicha solución. Esto en ambos tubos.
18. Repetir los dos pasos anteriores hasta completar 3 lavados con HBSS enriquecido frío, para retirar la colagenasa y evitar se empiecen a digerir los islotes así como para quitar la mayoría del tejido acinar.
19. Resuspender manualmente el pellet obtenido en ambos tubos del aislamiento previo, con 5 ml de HBSS frío y posteriormente agregar más hasta completar 10 ml; colocar los tubos en una hielera con hielo triturado.
20. Colocar uno de los tubos que contiene los islotes pancreáticos en una caja de Petri de 100 mm con fondo negro para facilitar la visibilidad y recolección de estos.

21. Visualizar la muestra directamente bajo un microscopio estereoscópico, y realizar la recolección manual de cada uno de los islotes con una micropipeta y colocar los islotes en un tubo cónico de 15 ml con 5 ml de HBSS colocado dentro de la hielera con hielo picado.
22. Al terminar de recolectar los islotes, desechar el resto del contenido de la caja de Petri y enjuagar perfectamente los restos con agua destilada estéril. Repetir este proceso de dos a tres veces en los dos tubos hasta que ya no se vean detritus y queden solamente los islotes.
23. Colocar la cantidad de islotes pancreáticos deseados en cajas de Petri de 35 o 100 mm, con medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% SFB y 1% de A/A e introducirlos en la incubadora de CO₂ a 37°C con 5% de CO₂.
24. Dejar cultivados los islotes por lo menos durante 24 horas para su recuperación antes de realizar cualquier experimento.

10.4 Apéndice “D”: Prueba de viabilidad con Calceína AM/Homodímero de Etidio-1.

1. Extraer con una micropipeta todo el medio de cultivo y desechar, tomándolo de una zona de la caja de Petri donde se verificó que no hubiera islotes, para evitar desprenderlos.
2. Realizar un lavado con PBS, es decir, agregar 1 ml de PBS y homogeneizar con movimientos circulares suaves, posteriormente retirar todo el PBS. Esto ayudará a retirar los restos de RPMI que hayan quedado.
3. Agregar 1 ml de PBS, con 0.5 μ L calceína-AM y 2 μ L de la solución de Homodimero de Etidio-1 y homogeneizar.

4. Incubar a temperatura ambiente en la campana de flujo laminar apagada durante 30 minutos.
5. Visualizar bajo el microscopio de epifluorescencia o microscopio confocal.
6. Realizar el conteo de islotes con células teñidas de verde (vivas) y células teñidas de rojo (muertas).

10.5 Apéndice “E”: Prueba de funcionalidad con ELISA para insulina.

1. Sacar las cajas de Petri de la incubadora.
2. Ubicar bajo el microscopio estereoscópico una zona en la periferia de cada caja donde no se encuentren islotes, verificando el estado general de los mismos y que se encuentren adheridos.
3. Recolectar 75 μ l de sobrenadante y criopreservar en el ultracongelador a -80°C en tubos eppendorf. En este punto se debe tener cuidado de no extraer accidentalmente uno o varios islotes, ya que podría alterar la medición de ELISA.
4. Una vez obtenidas todas las muestras, realizar la prueba de ELISA tipo sándwich según las indicaciones del fabricante.

10.6 Apéndice “F”: Medios de cultivo empleados para el cultivo de células Rin-m y Hepatocitos.

Fuente	H-4-II-E (Hepatocitos de rata)	Células beta (RIN-m/RIN-m5F)
Empresa ATCC	EMEM con 10% de suero fetal bovino	RPMI-1640 con 10% de suero fetal bovino
Empresa Thermofisher	Williams Medium E Hepatocyte Thaw Medium (HTM) CHRM® Medium (Cryopreserved Hepatocyte Recovery Medium)	----
Artículos	RPMI-1640 [47] Williams medium [48]	Ham’s F10 [74] DMEM [75,46] RPMI-1640 [76,46,77,78,79]
Foros	DMEM RPMI-1640 William’s medium	

10.7 Apéndice “G”: Comparación en la composición de los medios de cultivo RPMI-1640 Vs William’s.

RPMI-1640		William's	
Inorganic salts (g/liter)		Inorganic salts (g/liter)	
KCl	400	Potassium Chloride (KCl)	400
NaHCO ₃	1500	Sodium Bicarbonate (NaHCO ₃)	2200
MgSO ₄ (anhydrous)	48.84	Magnesium Sulfate (MgSO ₄)	97.67
NaCl	6000	Sodium Chloride (NaCl)	6800
Na ₂ HPO ₄ (anhydrous)	800	(Na ₂ HPO ₄) anhydrous	140
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	100		
		Cupric sulfate (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	1.00E-04
		Manganese chloride	1.00E-04
		Zinc sulfate (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	2.00E-04
		Calcium Chloride (CaCl ₂)	200
		Ferric nitrate (Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O)	1.00E-04

Amino Acids (g/liter)		Amino Acids (g/liter)	
L-Methionine	15	L-Methionine	15
L-Asparagine·H ₂ O	56.82	L-Asparagine·H ₂ O	20
L-Aspartic Acid	20	L-Aspartic acid	30
L-Cystine·2HCl	65.2	L-Cystine 2HCl	26.07
L-Glutamic Acid	20	L-Glutamic Acid	50

Glycine	10	Glycine	50
L-Leucine	50	L-Leucine	75
L-Lysine·HCl	40	L-Lysine hydrochloride	87.46
L-Phenylalanine	15	L-Phenylalanine	25
L-Proline	20	L-Proline	30
L-Serine	30	L-Serine	10
L-Threonine	20	L-Threonine	40
L-Tryptophan	5	L-Tryptophan	10
L-Tyrosine-2Na-2H ₂ O	28.83	L-Tyrosine disodium salt dihydrate	50.65
L-Valine	20	L-Valine	50
L-Arginine (free base)	200	L-Arginine	50
L-Histidine (free base)	15	L-Histidine	15
Hydroxy-L-Proline	20		
L-Glutamine	300		
L-Isoleucine	50		
		L-Alanine	90
		L-Cysteine	40

Vitamins (g/liter)		Vitamins (g/liter)	
Thiamine-HCl	1	Thiamine hydrochloride	1
Folic Acid	1	Folic Acid	1
Inositol	35	Inositol	2
Riboflavin	0.2	Riboflavin	0.1
Vitamin B-12	0.005	Vitamin B12	0.2
Choline Chloride	3	Choline chloride	1.5
D-Biotin	0.2	Biotin	0.5
p-Amino Benzoic Acid	1		
Nicotinamide	1		
D-Pantothenic Acid	0.25		
Pyridoxine-HCl	1		
		Ascorbic Acid	2
		Vitamin A (acetate)	0.1
		Ergocalciferol	0.1

Other (g/liter)		Other (g/liter)	
Sodium Pyruvate	110	Sodium Pyruvate	25
D-Glucose	4500	D-Glucose	2000
Phenol Red, Sodium Salt	5	Phenol Red	10
Glutathione (reduced)	1	Glutathione (reduced)	0.05
HEPES	2383		
		Methyl linoleate	0.03



Generación de un modelo biológico de cocultivo hepatocitos-células beta para simular y determinar las interacciones que se presentan en los trasplantes de islotes pancreáticos



Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 12:00 horas del día 6 del mes de octubre del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DR. JUAN MORALES CORONA
DR. JOSE RAFAEL GODINEZ FERNANDEZ
DR. JUAN MALDONADO CUBAS

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS (INGENIERIA BIOMEDICA)

DE: J JESUS ALBITER BENITEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

J JESUS ALBITER BENITEZ
ALUMNO

REVISÓ

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI

DR. JESUS ALBERTO OCHOA TAPIA

PRESIDENTE

DR. JUAN MORALES CORONA

VOCAL

DR. JOSÉ RAFAEL GODINEZ FERNANDEZ

SECRETARIO

DR. JUAN MALDONADO CUBAS

El presente documento cuenta con la firma –autógrafa, escaneada o digital, según corresponda- del funcionario universitario competente, que certifica que las firmas que aparecen en esta acta – Temporal, digital o dictamen- son auténticas y las mismas que usan los c.c. profesores mencionados en ella