

73  
Zef



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

CAMPUS IZTACALA

DETERMINACION DE LOS PARAMETROS PARA LA  
ELECTROFUSION DE CELULAS DE ISLOTES  
DE LANGERHANS DE RATA WISTAR

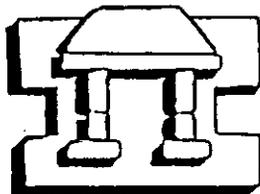
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A:

ALONSO ANTONIO VILCHES FLORES



No. de Cuenta: 9251095-9

GENERACION 1992-1995

ASESOR DE TESIS: M.C. EDUARDO BARRERA ESCORCIA

IZTACALA

LOS REYES IZTACALA., DICIEMBRE DE 1999

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

270089



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradezco a mis sinodales Dr. Luis Arturo Baiza, M. En C. Martha Salcedo, M. C. Rafael Flores y Biol. José Martínez por sus valiosas opiniones y correcciones a este trabajo. Se que pudo ser más y sin haber dejado tanto tiempo correr, pero el sistema aveces demuestra que es sólo un trámite.

Esta tesis se desarrolló en el laboratorio de biorregulación L-511 de la UNAM *Campus Iztacala*, bajo la dirección del M.C. Eduardo Barrera Escorcia. Muchas gracias por más de 5 años de trabajo, de apoyo y por hacerme parte de tu proyecto. Ahora espero que mi trabajo cumpla con tu próxima meta, pues esta tesis también es tuya.

## DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

De ser posible imprimiría una tesis para cada persona, pero lo mínimo que puedo hacer es incluir a todos en la siguiente lista. Si no ésta tu nombre, haré lo posible por mencionarlo en otra tesis; no fue omisión intencional, sino cuestión práctica y de espacio. Una parte de esta tesis es de cada uno también.

Primero, a mi madre y mi hermana. Emm... emm... ¡UY! ¡Que difícil es tratar de escribir más de un sentimiento! Finalmente aquí está esa famosa tesis que igualmente no fue fácil terminar.

A mis abuelos Gloria y Jesús y a todos mis tíos, tías, primos y primas ... podría mencionar cada uno pero esa sería otra tesis; quienes quiero mucho desde hace ya varios años (y por todos los que siguen, claro), que me ayudaron en unos u otros momentos brindándome algo más que un hogar cuando más lo necesite y por quienes continúo donde estoy.

En especial, a mi tía Pastora y mi tío Douglas. Los viajes ilustran el presente y el futuro. Por todas esas temperaturas bajo cero.

A Leonardo, por esperarme cada noche para jugar y por ser mi conejillo de Indias para tus futuros primos.

A mis profesores y maestros por su inteligente guía y por dedicarme una parte de su vida para mi formación como persona. En especial, a Marquitos "Vargas", Guillermo Avila, Francisco López, Edith López, Mario Fernández, Cesar Sanchez V., Dr. León Cázares y Angel Durán.

A mi amiga y "madre académica" Tamara Rosenbaum, de su único "clon", y, aunque no lo crea, a la Dra. Marcia Hiriart y su grupo de trabajo, quienes me enseñaron lo que realmente es una célula & y mucho más.

Al equipo de trabajo del laboratorio de Biorregulación del L-511, quienes vivieron de cerca esta tesis. En especial, a Martha e Irma, por ser mis maestras, amigas, críticas, colaboradoras, etc., y a Agustín Vargas, por toda su asesoría y enseñanzas a lo largo de varios trabajos.

A mis amigos del primero y original PAEA: Miriam, Tere, Gaby, Alejandra, Isa, Carmen, Cyntia, Rebeca, Paty, Bongo, Artemio, Rafa, Heliot, Cesar y Yuri. Por toda la experiencia que fue una carrera y por muchos "conejitos de oro".

En especial, a Natalia, por ser mi gran amiga por tantos años codo a codo... mejor ni hagas cuentas.

A mis amigos y alumnos de Iztacala. Igual, si no los menciono uno por uno no se ofendan. Ustedes son con los que demuestro el título que esta tesis dice.

A mis "compadres" Oscar, Enrique y Lalo, por su sincera, incondicional y única amistad por tantos años. ¡Este es un verdadero "cierre"!

Aunque no tengan mucho que ver, también a mis amigos del SWFC, principalmente a Mau, Mario, Daniel, Jorge, Eduardo (Mejia), Salma (aunque ella no lo crea), Gerardo, Ives, Aram, Eduardo y Juan Ramón (desde Monterrey), Minerva (de Infotel), Rafael (SLP), Luis (Colima), Ruben (Sonora), Savitri (Indonesia), Isabel, Arancha y Belem (España), Martin, Mary Jo, Jim y Neel (Estados Unidos) y Hector (Puerto Rico). Gracias por compartir un sueño en común y por ser parte de mis locuras (que en verdad ya son muchas). En especial, a Carolina Moreno: The true is out there...

## IN MEMORIAM

A mi abuela Julia ("Tata") y a mi padre. Esta tesis es por y para ustedes. Se que habria una sonrisa de felicidad por cada lágrima que dejaron aquí al partir. Con todo mi amor.

To Nathan Olsen, for many, many chess games, e-mail messages and hours in front of the computer.

## INDICE

RESUMEN	1
I. INTRODUCCION.	2
1. La estructura del islote de Langerhans	2
2. La molécula de insulina	3
3. La diabetes mellitus	5
4. Tratamientos para la diabetes mellitus	7
5. La fusión celular	8
II. ANTECEDENTES.	12
III. OBJETIVO GENERAL.	16
IV. OBJETIVOS PARTICULARES.	16
V. MATERIALES Y METODOS.	17
1. Animales	17
2. Obtención de células de los islotes de Langerhans	17
3. Marcaje celular	17
4. Electrofusión	18
5. Evaluación del rendimiento	18
6. Análisis de datos	18
VI. RESULTADOS Y ANALISIS.	20
VII. DISCUSIÓN.	24
1. Diferenciación entre homodicariontes y heterodicariontes	24
2. Rangos de fusión celular	24
3. Rendimiento de electrofusión	25
VIII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.	27
IX ANEXO	28
X. BIBLIOGRAFIA.	31

## **RESUMEN.**

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica ocasionada por la pérdida parcial o total de la secreción o acción de la insulina. Sus causas están asociadas a factores genéticos y ambientales que provocan algún defecto en la síntesis, secreción o acción de la hormona. Para promover el restablecimiento del metabolismo de los carbohidratos de manera natural, están en estudio los trasplantes de islotes encapsulados, o la implementación de un páncreas artificial. Sin embargo, estas opciones pueden provocar una respuesta inmunológica de rechazo y conducen al paciente al uso de inmunosupresores. Recientemente se ha estudiado como propuesta alternativa, el empleo del trasplante de células pancreáticas híbridas obtenidas por electrofusión.

Una célula híbrida es el producto de la fusión de dos células de diferentes características u orígenes, que manifiesta algunas características morfológicas y fisiológicas de ambas y sus aplicaciones son diversas en las áreas de genética, biología celular e inmunología. Existen varias técnicas que permiten obtener células fusionadas, como el uso de virus, de polietilenglicol, entre otras. Destaca la electrofusión ya que presenta mayores ventajas debido a su alto rendimiento de hibridación, facilidad y mínima manipulación de las células y el fenómeno puede ser observado bajo el microscopio óptico. En esta técnica, se emplean campos eléctricos para agregar y fusionar a las células.

Se ha empleado la electrofusión con células de islotes pancreáticos normales y células tumorales para obtener una línea híbrida secretora; así como, por otro lado, para el establecimiento de los parámetros óptimos de tiempo de exposición y concentración, en células pancreáticas totales de conejo, con el fin de obtener mayor rendimiento de la hibridación. Sin embargo, dichos parámetros de electrofusión no se pueden generalizar hacia los tipos celulares presentes en los islotes de Langerhans, que poseen características diferentes y funciones específicas.

Considerando a la electrofusión como una herramienta para inducir artificialmente la recombinación genética, en el presente trabajo se propone establecer los parámetros específicos y óptimos de electrofusión para células del islote de Langerhans, obtenidas de ratas Wistar.

Se obtuvieron las células insulares por el método de Lacy y Kostianovsky, disgregadas enzimáticamente. Una vez marcadas en cultivo con microesferas de látex de dos diferentes tamaños, las células se ajustaron a concentraciones de 2, 3 y 4 x10<sup>5</sup> céls/mL y se electrofusionaron entre sí, con 15 y 20 seg de exposición a la radiofrecuencia (RF) de 0.5 Mhz a 10 V de corriente alterna, y un pulso de corriente directa de 300 V durante 1 mseg. El rendimiento de cada fusión se determinó evaluando la viabilidad y el número de células libres sin fusionar, homodicariones, heterodicariones, policariones, diferenciándolos entre sí por su marcaje con las microesferas y por el número de núcleos presentes en el citoplasma.

El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre las diferentes concentraciones pero sí en el tiempo de exposición a RF para obtener los mejores rendimientos de células heterodicariones viables.

En las condiciones experimentales establecidas, el mayor porcentaje de heterodicariones (14.72%) se obtuvo a la concentración celular de 3x10<sup>5</sup> céls/mL con 15 seg de exposición a RF, con una viabilidad total del 75%. Estos resultados pueden variar si se modifican otros parámetros como el voltaje de las corrientes o el tipo de solución amortiguadora.

**Abreviaturas empleadas:** ATP: Trifosfato de adenosina; BSA: albúmina sérica bovina; CA: corriente alterna; CD: corriente directa; céls/mL: células por mililitro; HEPES: sal sódica y buffer para cultivos celulares; HIT: Insulinoma de hamster; HBSS: Solución salina balanceada de Hank; IDDM: Insulin-dependent Diabetes Mellitus; NIDDM: Non Insulin-dependent Diabetes Mellitus; PEG: Polietilenglicol; RF: radiofrecuencia; RINm5F: Insulinoma de rata línea 5; RPMI: medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute; SBF: suero bovino fetal; seg: segundos.

# I. INTRODUCCIÓN.

## 1. La estructura del islote de Langerhans.

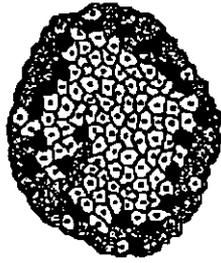
El páncreas en los mamíferos es una glándula mixta de gran importancia para la digestión y el equilibrio homeostático. La respuesta exócrina es realizada por el tejido acinar, secretando varias enzimas digestivas hacia el duodeno. La función endócrina se le atribuye a las hormonas producidas por las células que conforman el islote de Langerhans <sup>1</sup>.

Los islotes, descubiertos por Paul Langerhans en 1869, comprenden entre el 2 y 3% de la masa total del páncreas y se distribuyen a lo largo de la glándula, principalmente en la región caudal. Su tamaño y número varía según la especie. En la rata adulta, los islotes miden de 50 a 500  $\mu\text{m}$  de ancho y se estima que hay cerca de 100, 000 por órgano, cada uno con aproximadamente 3, 000 células <sup>2,3</sup>. Poseen gran irrigación sanguínea a través de capilares fenestrados que penetran al islote para un mejor contacto con las células, y su actividad es regulada finamente por hormonas y neurotransmisores provenientes de terminales nerviosas simpáticas y parasimpáticas <sup>2,4</sup>.

Existen al menos cuatro tipos de células diferentes dentro de la membrana permeable del islote:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y F, cada una con diferente distribución, cantidad y hormona de secreción (Tabla 1). Las células  $\alpha$  cuyas funciones son hiperglucémiantes, constituyen del 10 al 15% de la población y secretan glucagon y factor liberador de corticotropina; las  $\beta$  conforman entre el 70 y el 75% y son secretoras de insulina y amilina, con efectos hipoglucémiantes y metabólicos, entre otros. Las células  $\delta$  producen somatostatina, una hormona reguladora de las dos anteriores, y se encuentran en menos de un 10%. Finalmente las F, productoras de polipéptido pancreático, otro regulador de el glucagon y la insulina, son muy raras y no siempre están presentes en el islote (figura 1) <sup>5,6</sup>.

Tipo Celular	Proporción en islote (%)	Tamaño celular ( $\mu\text{m}$ )	Localización	Hormona secretada	Estructura de la hormona
$\alpha$ (alfa)	10 - 15	10 - 15	periferia	glucagon	1 cadena 29 aminoácidos
$\beta$ (beta)	70 - 75	10 - 15	centro	insulina	2 cadenas unidas a de 21 aminoácidos b de 30 aminoácidos
$\delta$ (delta)	8 - 10	8 - 12	periferia	somatostatina	2 formas S-14 14 aminoácidos S-28 28 aminoácidos
F	1 - 5	10	centro	polipéptido pancreático	1 cadena 36 aminoácidos

Tabla 1. Constituyentes endocrinos del páncreas <sup>5</sup>.



- △ Células alfa
- Células delta
- ⊙ Células beta

**Figura 1. Representación esquemática de la distribución celular de un islote normal de rata. Las células beta se encuentran en la región central en mayor número y las alfa y delta en la periferia.**

Dentro del islote las células están ordenadas en forma de columnas con cierta polaridad hacia el capilar. Además, existen uniones estrechas entre las mismas células que permiten el intercambio de pequeñas moléculas y la regulación parácrina de sus secreciones <sup>7,9</sup>.

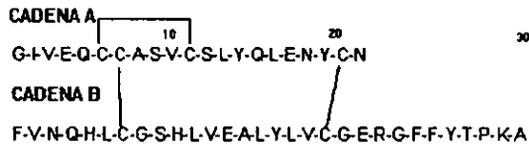
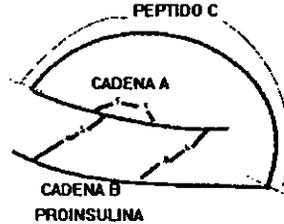
La mayoría de las investigaciones realizadas con islotes se enfocan en la fisiología de la célula  $\beta$  y su secreción de insulina. Varios trabajos han demostrado que las células  $\beta$  presentan cierta heterogeneidad funcional en cuanto a su producción de insulina y a su respuesta hacia diferentes estímulos para la secreción <sup>8,9</sup>.

## **2. La molécula de insulina.**

En 1922, Frederick G. Banting, Charles Best y sus colegas lograron aislar por primera vez en un extracto la hormona de insulina (del latín *insulae*, que significa isla) <sup>1,10</sup>. Su estructura está dada por dos cadenas peptídicas (A y B), de 21 y 30 aminoácidos respectivamente, unidas por dos puentes disulfuro (figura 2). Su síntesis es regulada por varios factores, siendo el principal la entrada y asimilación de glucosa en la célula  $\beta$  <sup>1,9</sup>.

El gene de la insulina se transcribe exclusivamente en la célula  $\beta$ , donde es regulado finamente por un sistema de segundos mensajeros y enzimas expresadas en estas células. El ARNm es traducido por los ribosomas en una sola cadena peptídica: la preproinsulina. El péptido señal es removido en el lumen del retículo endoplásmico para dar lugar a la proinsulina, donde las dos cadenas se encuentran unidas por un segmento de 31 aminoácidos denominado péptido C.

Posteriormente en el aparato de Golgi se realiza el corte de la molécula y la unión de los puentes disulfuro. La insulina y el péptido C son concentrados en forma de dímeros o hexámeros en vesículas, las cuales se fusionarán después con la membrana plasmática para liberar la hormona hacia la luz del capilar más cercano <sup>3,11,12</sup>.



Dr. Charles Best y Dr. Frederick Banting en 1921 <sup>10</sup>

Figura 2. Estructura de la molécula de proinsulina e insulina humana <sup>1</sup>

La actividad secretora de la célula β puede iniciarse por la estimulación de varios secretagogos, tales como nutrientes, hormonas o neurotransmisores, siendo el principal la glucosa. El azúcar entra gracias al transportador membranaral de tipo GLUT-2 de la célula e inmediatamente es metabolizado. El aumento del nivel de ATP intracelular provoca el cierre de los canales de K<sup>+</sup> sensibles a ATP y la despolarización de la membrana. Este cambio electroquímico conduce a la apertura de canales iónicos que incrementan a su vez, por diferentes mecanismos, la concentración de Ca<sup>2+</sup> en el citosol. A continuación se inician varias cascadas de reacciones mediadas por segundos mensajeros que movilizan los gránulos de secreción y estimulan al promotor de la síntesis de la hormona <sup>13,14,15</sup>.

Una vez liberada la insulina al torrente sanguíneo, sus efectos son más notorios en aquellas células blanco con mayor cantidad de receptores a la hormona, tales como las musculares, las hepáticas y los adipocitos; y menores en las neuronas, en los eritrocitos, en células de la mucosa intestinal y de los túbulos renales. Entre sus principales acciones se encuentran <sup>16,17</sup>.

- Promover el transporte activo de glucosa y la entrada de aminoácidos a la célula.
- Estimular indirectamente la activación de las vías metabólicas para la glucólisis, lipogénesis, síntesis de glucógeno, de colesterol, de proteínas y de ácidos nucleicos.
- Estimular el almacenamiento de triglicéridos y glucógeno.
- Inhibir la glucogenólisis, la lipólisis, la gluconeogénesis, la formación de urea, así como disminuir los niveles de degradación de proteínas.

La deficiencia en la producción o acción de la insulina provoca varios trastornos en la asimilación de carbohidratos y altera notablemente el metabolismo de los lípidos y proteínas en todo el organismo. Desde hace varios siglos a esta falta se le ha denominado como diabetes mellitus.

### 3. La diabetes mellitus.

La diabetes mellitus es un grupo de enfermedades metabólicas heterogéneas caracterizada por episodios de hiperglucemia, debidos a la pérdida parcial o total de la secreción de insulina, ó bien a la acción inadecuada de ésta, ocasionada principalmente por factores genéticos<sup>18,19,20</sup>. La diabetes afecta del 4 al 10% de la población mundial y de acuerdo a su etiología se clasifica en:

A). Diabetes mellitus tipo 1 (antes diabetes mellitus dependiente de insulina o IDDM), donde ocurre la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  por parte de linfocitos T. Se ha encontrado más de una asociación genética, entre ellas, la presencia de proteínas nativas relacionadas con los complejos principales de histocompatibilidad en la célula  $\beta$ , que provocan una enérgica respuesta autoinmunológica contra ellas. No está completamente demostrado que factores ambientales, infecciones virales o ciertos agentes químicos desencadenen también la respuesta inmunitaria (figura 3)<sup>18,19,20,21</sup>.

B). Diabetes mellitus tipo 2 (antes diabetes mellitus no dependiente de insulina o NIDDM), donde las causas están asociadas a varios factores genéticos y ambientales que provocan la ineficiencia de enzimas y transportadores involucrados en el metabolismo de la glucosa, la resistencia a los efectos de la insulina, o bien, la disminución de su síntesis y secreción por las células  $\beta$  (figura 3)<sup>19,21,22,23</sup>.

C). Diabetes gestacional, la cual se presenta con altos niveles de glucemia durante el embarazo, principalmente en el tercer trimestre. En relación a los antecedentes genéticos, este tipo de diabetes puede desaparecer o desarrollarse posteriormente en algún tipo definido<sup>19,22,24</sup>.

D). Diabetes de otros tipos específicos, cuyas causas pueden ser variadas y su tratamiento depende de la gravedad del daño: mutaciones en el receptor de insulina, infecciones del páncreas,

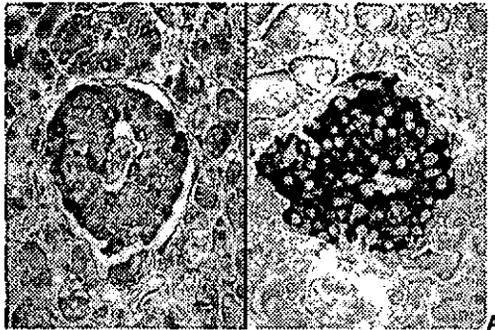
pancreatitis, pancreatectomía, insulinoma, endocrinopatías de otras hormonas antagonistas a la insulina, infecciones virales específicas, desnutrición y síndromes genéticos asociados<sup>19,22</sup>.

E). Intolerancia a carbohidratos, donde los valores de glucemia basal son superiores a los normales (>126 mg/dL) pero inferiores a los de diagnóstico de diabetes (<180 mg/dL). Puede deberse a diversas causas y no implica necesariamente el inicio de un estado patológico<sup>19,22</sup>

Sin un adecuado tratamiento, en cualquier tipo de diabetes se pueden presentar varias complicaciones micro y macro vasculares, que afectan diversos sistemas e incluso pueden causar la muerte del enfermo: hipertensión, cetoacidosis, desequilibrio osmótico, propensión a las infecciones y úlceras, retinopatía, nefropatía, neuropatía, aterosclerosis, coma diabético e infartos<sup>22,23,25,26,27</sup>

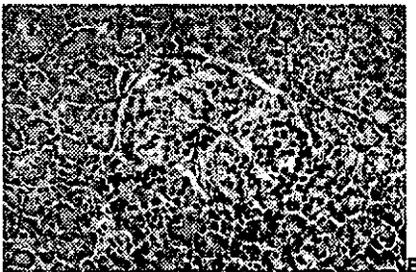
**Figura 3. Observaciones histológicas de islotes de Langerhans. Imágenes obtenidas de:**

<http://www.pathology.org>



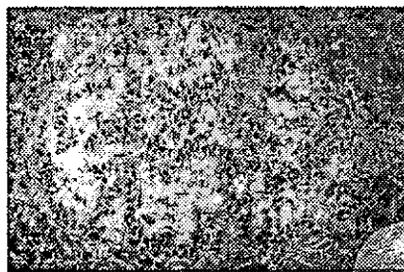
A

**A. Islotes de Langerhans normales con inmunotinción por peroxidasa. A la izquierda se identifican con el marcaje más oscuro a las células  $\alpha$  y en la derecha a las  $\beta$ .**



B

**B. Insulinitis o inflamación del islote de Langerhans por infiltrado linfocitario (puntos oscuros) en el principio de una reacción autoinmune. La destrucción de los islotes eventualmente provocará IDDM.**



C

**C. Islote de Langerhans con hialinización de color rosa (depósitos de amiloides) en varias células. Aspecto característico en algunos pacientes con NIDDM.**

#### 4. Tratamientos para la diabetes mellitus.

Para lograr una mejor calidad de vida del paciente diabético y el control de su enfermedad se administran diferentes tratamientos dependiendo del tipo y condiciones particulares: la inyección subdérmica o intravenosa de insulina humana exógena, actualmente de origen sintético; la ingesta de hipoglucemiantes orales tales como guanidinas y extractos de plantas medicinales; la medicación de estimuladores de la secreción de insulina como sulfonilureas, y en todos los casos, el control dietético bajo en carbohidratos y alto en fibras vegetales<sup>27,28,29</sup>. Sin embargo, estas terapias sólo representan un control para retrasar la aparición de las complicaciones crónicas, sin darle solución definitiva a la enfermedad<sup>22,27</sup>.

Otra opción es el trasplante de páncreas, practicado en pacientes diabéticos con difícil control de hipo e hiperglucemia, con disfunción renal, retinopatía y/o neuropatía crónicas. A pesar de restaurar normalmente los niveles de glucemia, la operación es técnicamente compleja y extensa con un alto riesgo a complicaciones<sup>30,31</sup>. Hoy en día están en estudio los trasplantes de islotes de Langerhans encapsulados, ya sean de humano adulto, fetales, o de origen animal (porcino), depositados en órganos o lugares específicos (figura 4)<sup>30,31,32,33,34</sup>. Sin embargo, en todos los casos se presenta la respuesta inmunológica, en intensidad variable, que rechazará al trasplante finalmente; esto conducen al paciente a complementar el tratamiento con inmuno-supresores, tales como la ciclosporina, lo que a su vez, implica el aumento de la susceptibilidad a infecciones oportunistas, neoplasias y la eventual falla del trasplante<sup>36,37,38</sup>. La implementación de bombas de insulina o páncreas artificiales que respondan de manera automática a los cambios de glucemia son otra opción aún en estudio<sup>35</sup>.

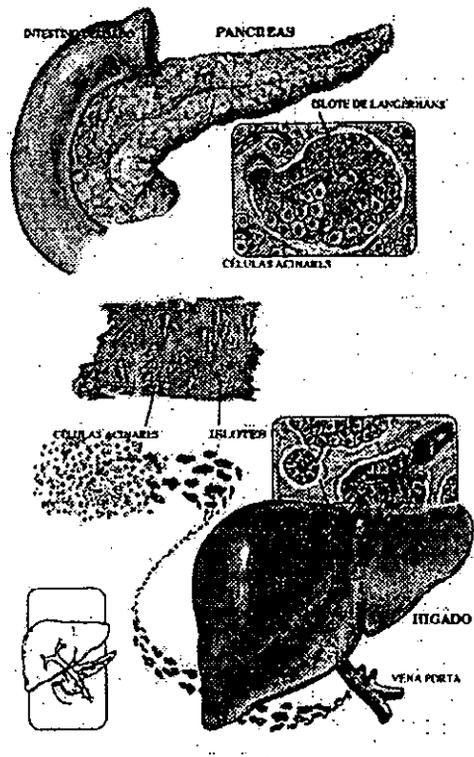


Figura 4. Trasplante de islotes de Langerhans inyectados a través de la vena porta del hígado<sup>32</sup>.

Por último se encuentra la manipulación genética a nivel celular y molecular, donde se persigue modificar la antigenicidad de las células del islote antes de ser transplantadas, transferir los genes responsables de la síntesis, secreción y regulación de la insulina o establecer líneas celulares secretoras derivadas de células  $\beta$  normales<sup>39,40</sup>. En las terapias génicas, la inserción de secuencias específicas, la introducción de genes completos o de juego de genes al núcleo pueden efectuarse a través de infecciones virales, por electroporación de la membrana celular o por fusión de células. Con esta última técnica, el equipo de trabajo del Dr. E. Barrera ha estudiado como propuesta alternativa para revertir el cuadro clínico de la diabetes mellitus, el empleo del trasplante de células pancreáticas híbridas obtenidas por electrofusión<sup>41</sup>.

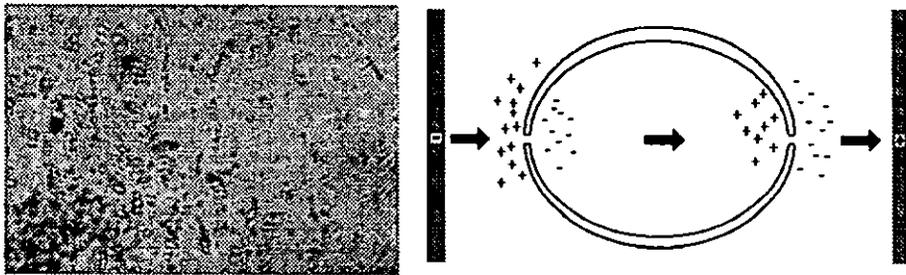
### 3. La fusión celular.

Una célula híbrida es el producto de la fusión de dos células de diferentes progenitores u orígenes, que manifiesta algunas características morfológicas y fisiológicas de ambas<sup>42,43</sup>. En la naturaleza ocurre normalmente la fusión celular, principalmente en la reproducción y entre las membranas adyacentes de diversos tejidos en los organismos<sup>42</sup>. Sus aplicaciones son diversas en las áreas de genética, biología celular, embriología e inmunología; principalmente en la expresión, coexpresión y/o supresión de genes, cambios o ajustes metabólicos, producción de anticuerpos monoclonales, mejoramiento vegetal, etc.<sup>43,44,45,46</sup>.

Existen varias técnicas biológicas, químicas y físicas que permiten obtener células fusionadas. Entre estas destacan los usos de:

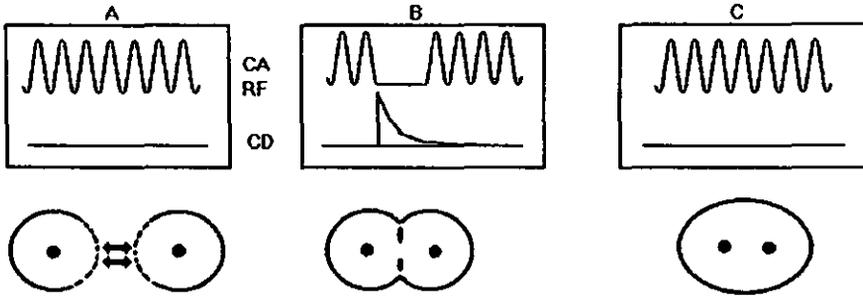
- a) el virus Sendai inactivo, el cual permite la entremezcla azarosa de membranas cercanas, creando micro-vesículas entre ellas en varios puntos de interacción<sup>42</sup>;
- b) el polietilenglicol (PEG), un polímero de alto peso molecular que expulsa las moléculas de agua entre las células, forzando el contacto entre las membranas y fusionándolas bajo presión<sup>42,45,46</sup>;
- c) altas concentraciones de iones, que modifican drásticamente la polaridad de la membrana y su permeabilidad, pudiendo dañar irreversiblemente a la célula<sup>42,47,48</sup>;
- d) detergentes ligeros de membranas, como la lisolecitina, que permiten la mezcla de secciones cercanas de fosfolípidos membranales;
- e) la electrofusión, en donde las células se agregan y fusionan bajo la influencia de un campo eléctrico aprovechando las características de sus membranas<sup>43,45,47</sup>. Esta última técnica presenta mayores ventajas sobre las anteriores debido a su alto rendimiento y control de los productos híbridos, facilidad y menor tiempo de manipulación de las células, lo que disminuye los riesgos de contaminación. Puede aplicarse a varios tipos celulares gracias a las propiedades dieléctricas comunes de las membranas y el fenómeno puede ser observado bajo el microscopio óptico<sup>45,47,48</sup>.

La electrofusión en general consiste en la exposición de las células a pulsos alternados de corriente eléctrica de diferente intensidad. En cuestión de segundos, bajo la influencia de corriente alterna (CA) de baja intensidad, se promueve el fenómeno de dielectroforesis de las células, en donde éstas se aproximan mutuamente debido a la formación de dipolos en sus membranas, formando cadenas o "rosarios" de acuerdo al gradiente de corriente (figura 5). La agregación también se puede lograr por micromanipulación, centrifugación o por cultivos en confluencia <sup>47,49</sup>. Después, con uno o varios pulsos de corriente directa (CD) de alto voltaje, durante micro o milisegundos, se logra la fusión de las membranas adyacentes (figura 6).



**Figura 5. Dielectroforesis de células. Las cadenas o "rosarios" de células alineadas (izquierda) aparecen bajo la influencia de una corriente eléctrica que re-distribuye las cargas en las membranas (derecha). El espacio entre las células es de 15 a 25 nm. <sup>47,50</sup>**

Figura 6. Protocolo de electrofusión<sup>47,51</sup>.



A.- Bajo la influencia de un débil campo eléctrico de corriente alterna (CA) en el rango de radiofrecuencia (RF), en MHz o KHz, se promueve la formación de dipolos en las células y su dielectroforesis, entre 5 y 30 seg de exposición.

B.- Una vez aproximadas las membranas, con uno o varios pulsos de corriente directa (CD) del orden de  $1 \times 10^2$  a  $1 \times 10^5$  volts, aplicados durante micro o mili-segundos, se crean microporos membranales y se fusionan las células.

C.- Inmediatamente se restaura la CA para estabilizar las membranas fusionadas, durante 300 a 60 segundos. Bajo ciertas condiciones óptimas de cultivo, los citoplasmas reunirán posteriormente a los núcleos.

Los diferentes productos que se obtienen de la electrofusión son: células heterodicariontes, provenientes de la fusión de dos células de diferente origen; homodicariontes, de la fusión de dos células del mismo origen; y policariontes, de tres o más células fusionadas de orígenes variados<sup>43,47,48</sup> (figura 7). En condiciones óptimas de cultivo, los citoplasmas fusionados se reorganizan y reúnen a los diferentes núcleos para realizar la recombinación o la eliminación de algunos cromosomas<sup>43,47</sup>.

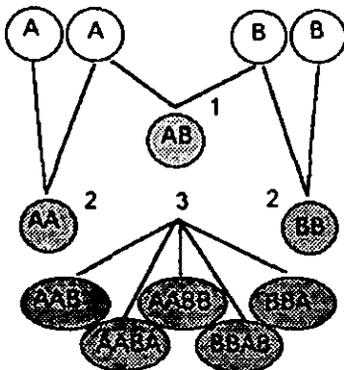


Figura 7. Productos de la fusión celular entre diferentes orígenes, A y B: una célula híbrida heterodicarionte AB (1) por cada dos homodicariontes AA y BB (2). Con el uso de PEG, de altas concentraciones de iones o de largos periodos de dielectroforesis aumentan las probabilidades de obtener células policariontes, AAB, BBA, AABB, AABA, BBAB, etc. (3)<sup>47,51</sup>.

Para efectuar la electrofusión de células debe considerarse:

- la intensidad del campo eléctrico que permita el libre movimiento de iones y la polarización de la célula, sin quebrantar la integridad de las membranas;
- el diámetro celular, que influye en la velocidad de desplazamiento y la fuerza de resistencia de la célula en el medio de conducción;
- la conductividad y resistencia de las membranas a fusionar, las cuales permitirán la distribución de cargas, el tamaño y la cantidad de microporos durante el pulso de CD;
- la conductividad y resistencia del medio, que deben contribuir a que la corriente promueva la dielectroforesis de las células, la formación de dipolos y microporos en las membranas, así como evitar la elevación brusca de la temperatura;
- el tiempo óptimo de exposición a la corriente eléctrica para ejercer la fuerza y presión suficientes en las membranas sin que las destruya.

Otros factores que influyen son la osmolaridad, la temperatura, la presencia de iones y la heterogeneidad misma de las células (ver anexo) <sup>45, 46, 47, 50</sup>.

Uno de los protocolos más empleados consiste en ajustar las concentraciones celulares a fusionar en ordenes mínimos de  $1 \times 10^5$  céls/mL y mezclarlas en relación 1:1; se induce el fenómeno de la dielectroforesis con corriente alterna (CA) de baja intensidad y de alta frecuencia, en el rango de radiofrecuencia (RF), entre 5 y 15 segundos. Seguido se aplica de uno a tres pulsos de corriente directa (CD), ya sean de decaimiento exponencial o cuadrados, en el orden de  $\mu$ seg a mseg, dependiendo de la intensidad, y se restaura la CA para mantener unidas y estabilizar las membranas fusionadas durante un minuto. Inmediatamente se evalúa el rendimiento de la fusión por conteo celular y pruebas de viabilidad, y la muestra se coloca en el medio de cultivo selectivo, en condiciones óptimas para la recuperación total de la integridad membranal y los procesos intracelulares <sup>43, 45, 47, 50, 51</sup>.

## II. ANTECEDENTES.

Desde hace más de 20 años se ha realizado la fusión de varios tipos celulares en diversas condiciones y con diferentes objetivos (tabla 2). Además de la producción de anticuerpos monoclonales, la hibridación celular ha tenido algunas aplicaciones en los trasplantes de células y tejidos, donde se ha observado mayor tolerancia hacia los injertos híbridos por más tiempo en comparación con sus grupos control, manteniendo además su funcionalidad <sup>41,52,53,54,56</sup>. Entre estos estudios destacan las fusiones de células de piel; de hepatocitos y de células pancreáticas, totales e insulares.

En el trasplante de las células híbridas de islotes normales fusionados con células de una línea tumoral de hámster (obtenidos con PEG), se observó que la malignidad, el número de cromosomas y el ritmo de duplicación del tumor disminuyó notablemente con el tiempo, sin presentarse metástasis ni alteraciones en la secreción de hormonas endocrinas <sup>50</sup>.

Empleando la electrofusión para obtener células híbridas pancreáticas totales, se realizó el trasplante de éstas en conejos diabéticos, presentándose una mejoría irregular en el cuadro clínico durante 5 meses, que progresó hacia los valores normales de glucemia, peso y otros parámetros en los siguientes meses hasta el año y medio, sin manifestaciones aparentes de rechazo inmunológico. El área del injerto presentó cierta desorganización celular y algunas estructuras semejantes a islotes <sup>41</sup>.

Autor	Año	Tipo celular	Organismo(s)	Técnica empleada	Objetivo	Referencias
Rehmann, et al	1992	mieloma K <sub>6</sub> H <sub>6</sub> /B5 y linfocito B	humano	electrofusión	Híbridomas productores de anticuerpos monoclonales	47
Nishihira, et al.	1979	células L de C3H/HE con JLS-V9 de BALB/c	ratón	fusión con virus Sendai inactivo	Transplante de células híbridas comparado con un tratamiento inmunosupresor común	52
González, et al	1983	hepatocitos	rata	fusión con PEG	Evaluación del transplante de células hepáticas híbridas para regeneración hepática	53, 54
Pace, et al.	1980	islotes de Langerhans	rata	electroporación	Estudio de intermediarios del metabolismo de la célula β y la exocitosis de insulina	55
Yassen, et al.	1982	islotes de Langerhans	rata	electroporación	Permeabilización de iones y sacarosa al espacio extracelular dentro del islote	56
German, et al.	1993	islotes de Langerhans	rata	electroporación	Estudio de intermediarios en la secreción de insulina.	57
Takaki, et al.	1984	células insulares normal y línea In-111-6TG tumoral	hámster	fusión con PEG	Establecimiento y caracterización de una línea híbrida secretora de glucagon e insulina	58
McClenaghan, et al.	1996	células insulares normales y línea RINm5F tumoral	rata	electrofusión	caracterización de la producción y secreción de insulina, metabolismo y morfología de las líneas BRIN-BG5, BRIN-BG7 y BRIN-BD11	59, 60, 61
Barrera, et al.	1997	células pancreáticas totales	conejo	electrofusión	Parámetros óptimos de electrofusión para mayor rendimiento de heterodímeros	62

Tabla 2. Antecedentes de hibridación celular.

Específicamente para la manipulación de células pancreáticas con electroporación y electrofusión, los parámetros de referencia empleados en diversos trabajos presentan algunas diferencias entre si (tabla 3). En la electroporación de islotes completos, donde se estudiaron algunos mecanismos involucrados en la secreción de insulina, las condiciones son similares entre si excepto en las soluciones amortiguadoras preparadas <sup>55,56</sup>.

Para la obtención de las líneas híbridas BRIN-BG5 y BRIN-BG7, a partir de la electrofusión de células  $\beta$  normales y RINmF5 tumorales de rata, el protocolo de electrofusión empleado es el que generalmente se recomienda para células de mamíferos que midan de 10 a 20  $\mu\text{m}$  de diámetro, sin embargo, no se reportan los rendimientos de dicha fusión en términos de productos obtenidos <sup>51,59,60,61</sup>.

Con células pancreáticas totales de conejo se han establecido determinados parámetros, ajustados a las características del equipo empleado en base a otros protocolos <sup>62</sup> (ver anexo). Cabe mencionar que el número de células empleadas para la fusión varían entre estos 2 trabajos, de  $1 \times 10^5$  en el primero a  $3 \times 10^5$  en el segundo.

Ref	Células empleadas	Protocolo	CA o RF	CD	Distancia entre electrodos (cm)
55	islotes completos de rata	electroporación	2.5 KV/cm 5 pulsos 250 $\mu\text{seg}$	-	1
56	islotes completos de rata	electroporación	3.4 KV/cm 5 pulsos 200 $\mu\text{seg}$	-	1
59 60 61	islotes disgregados y línea tumoral RINm5F de rata	electrofusión	1.5 KV/cm 1 MHz 50 $\mu\text{seg}$	1.5 KV/cm 20 $\mu\text{seg}$	1
62	páncreas total disgregado de conejo	electrofusión	10 V/cm RMS 0.5 MHz 15 - 20 seg	300 V/cm 1 mseg	0.5

**Tabla 3. Parámetros empleados en los diferentes estudios de electroporación y electrofusión con células del islote de Langerhans.**

Para cada tipo celular es necesario establecer las condiciones específicas de voltaje, tiempo y concentración para su óptima electrofusión. Dichos parámetros han sido evaluados para células pancreáticas totales de conejo, sin embargo, estos resultados no se pueden extrapolar completamente hacia los tipos celulares tan especializados que se presentan en los islotes de Langerhans, ya que cada población posee características propias y definidas, lo que también dificulta el cálculo matemático exacto de los requerimientos de tiempo y corriente eléctrica óptimos para cada estirpe <sup>1,47,48,61</sup>.

Además, para los estudios realizados en conejo, la obtención de sus islotes pancreáticos por los métodos más empleados resulta muy difícil debido a sus características anatómicas e histológicas. En comparación con otros animales, la rata presenta la anatomía del páncreas más definida y sus islotes pueden obtenerse por muchas técnicas ya estandarizadas, lo que ha facilitado los estudios más detallados sobre la morfología y fisiología de las células  $\beta$ , así como los modelos experimentales para la diabetes <sup>33,63,64,65,79</sup>.

Considerando a la electrofusión como una herramienta para obtener recombinación genética, y con el antecedente de su aplicación en conejos diabéticos, en el presente trabajo se propone establecer los parámetros específicos y óptimos de electrofusión para células del islote de Langerhans, obtenidos estos de ratas Wistar.

### **III. OBJETIVO GENERAL.**

Establecer los parámetros necesarios para la óptima electrofusión de células de islotes de Langerhans entre si, obtenidas de ratas macho Wistar.

### **IV. OBJETIVOS PARTICULARES.**

A). Obtener células de islotes de Langerhans de rata, aisladas en cultivo primario y diferenciadas en dos grupos con marcaje intracelular de microesferas de látex.

B). Evaluar el rendimiento de la electrofusión de diferentes concentraciones celulares y tiempos de exposición a la radiofrecuencia, en base a los porcentajes obtenidos de cada producto de la electrofusión y a su viabilidad total.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS.

1. **Animales.** Se utilizaron 60 ratas macho Wistar, de peso entre 200 y 250 g, obtenidas del Bioterio de la U.N.A.M. *Campus* iztacala y mantenidas con ingesta de agua y alimento *ad libitum*.

2. **Obtención de las células de los islotes de Langerhans.** Se emplearon 4 ratas en cada repetición a las cuales se les extrajo el páncreas por medio de la técnica de Lacy-Kostianovski, con modificaciones de Hiriart y Ramírez-Medeles<sup>8,14,66,67,68</sup>. Las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico intraperitoneal (60mg/Kg) y se abrió el abdomen completamente bajo condiciones semi-estériles. Una vez localizado y ligado el conducto de Wirsung, se inyectó 10 mL de solución balanceada de sales de Hank (HBBS) a través del conducto pancreático principal para poder identificar mejor del tejido endocrino del páncreas y poderlo separar de la porción acinar. El tejido se cortó en pequeños trozos y se disgregó con colagenasa tipo IV (Worthington), 2.5 mg/mL, a 37°C durante 10 min. Los islotes se purificaron por centrifugación en un gradiente discontinuo de albúmina<sup>69</sup> y se disgregaron con una solución de tripsina (2.5 mg/mL en HBBS) durante 10 minutos. Seguido se determinó el número de células obtenidas y su viabilidad en un hemocitómetro empleando la técnica de exclusión de azul de tripano.

3. **Incubación y marcaje celular.** Las células insulares se separaron en dos grupos iguales; ambos se incubaron en tubos cónicos estériles durante 24 horas a 37°C, en medio RPMI 1640 (Sigma Co., con 5.958 g/L de HEPES y 2 g de bicarbonato de sodio), suplementado con 10% de SBF y 3% de solución preparada de antibióticos (Gibco BRL): penicilina 200 µg/mL, estreptomina 200 µg/mL y anfotericina B 0.5 µg/mL. Para lograr un marcaje celular en el citoplasma, a un grupo se le añadió 5 µl/mL de solución de microesferas de látex (Sigma Co.) de 1.16 µm de diámetro, y al otro, de 0.45 µm.

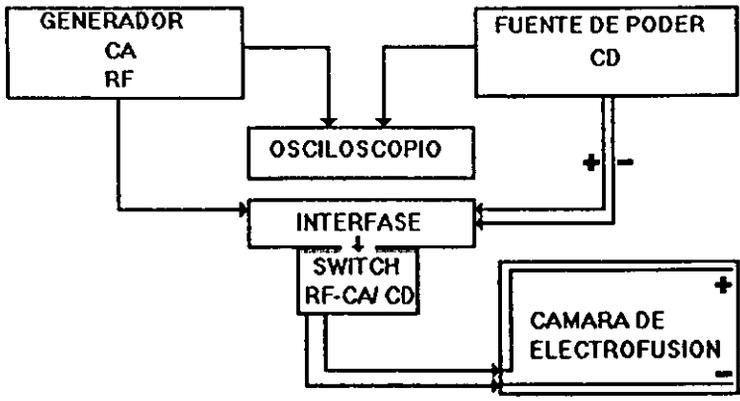
Después de la incubación, las células de cada grupo se lavaron para eliminar las microesferas del medio y se evaluó por hemocitometría y exclusión de azul de tripano el número de células viables con microesferas incluidas en su citoplasma. Los 2 grupos marcados se ajustaron a una misma concentración celular para su electrofusión: 2, 3 y 4 x10<sup>5</sup> céls/mL, en la siguiente solución amortiguadora: HEPES 16 mM, glutamato de potasio 100 mM, glutamato sódico 40 mM, glucosa 5 mM, cloruro de magnesio 1 mM, EGTA 5 mM, BSA 3 mg/ml; pH de 7.4 a temperatura ambiente, osmolaridad 290 mOsmol/Kg y resistencia de 0.5 ohms<sup>55</sup>. Las células de ambos grupos se mezclaron en proporción 1:1 v/v y se depositaron 0.3 mL en la cámara de electrofusión.

**4. Electrofusión.** El equipo fue diseñado y construido en el Taller de Equipo y Laboratorio para la Enseñanza (TELE) de la U.N.A.M. *Campus Iztacala*. Las condiciones de electrofusión que se emplearon fueron (ver anexo):

- Cámara de electrofusión de acrílico de 4 x 0.7 x 0.5 cm, con 2 electrodos de platino separados entre sí 0.5 cm y conectados directamente a la interfase (figura 8).
- Tiempos de exposición a la CA de 15 y 20 segundos, medido cronométricamente (cronómetro Gallet: 0 - 30 min., división 1 seg.).
- Campo de RF de 0.5 MHz con salida sinusoidal y 10 V RMS de CA, pico a pico (generador Famell, mod. Sgi -0.1 - 100 MHz)<sup>62</sup>.
- Pulso único de 300 V de CD con decaimiento exponencial (fuente de poder TELE 0.0 + 50 Amperes; 0 - 500 V de corriente directa), de 1 mseg.
- Interfase de RF y voltaje con capacitor y respuesta de 1 mseg, construida y modificada de acuerdo a especificaciones previas<sup>70,71</sup>.
- Reestablecimiento de la RF durante 60 seg. para estabilizar las membranas fusionadas.

**5. Evaluación del rendimiento.** Inmediatamente después de la fusión se tomó una alícuota para determinar en un hemocitómetro la viabilidad y la cantidad de las células sin fusionar, homocariotes, heterodicariotes y policariotes obtenidos, diferenciándolas al microscopio óptico por el tipo de microesferas presentes en el citoplasma y por el número de núcleos contenidos, usando nuevamente la exclusión de azul de tripano para verificar su viabilidad.

**6. Análisis de datos.** Para determinar la significancia de los resultados ( $p < 0.05$ ) se realizó una prueba de homogeneidad para todos los datos y el análisis de varianza bifactorial, donde se evaluó el factor A definido como la concentración de células ( $2, 3$  y  $4 \times 10^5$  céls/mL), el factor B como el tiempo de exposición a RF (15 y 20 seg) y la posible interacción entre ambos, para cada una de las variables de respuesta: células libres, homodicariotes, heterodicariotes, policariotes y viabilidad total. El análisis se realizó con el programa Statística 4.1 para Windows 3.11.



**Figura 8. Esquema del aparato para la electrofusión. La cámara de electrofusión recibe constantemente del generador la corriente alterna (CA) a cierta radiofrecuencia (RF); al cambiar el "switch" de la interfase, se interrumpe durante 1 milisegundo con el pulso de corriente directa (CD) almacenada en el capacitor, restaurándose inmediatamente la RF. <sup>50</sup>**

## VI. RESULTADOS Y ANÁLISIS.

La viabilidad de las células insulares después de ser disgregadas fue superior al 90% en promedio, manteniéndose así durante la incubación para su marcaje con las microesferas de látex. Después de la electrofusión, la viabilidad de todos los productos celulares se situó arriba del 70% en promedio, sin diferencias significativas entre ellas a las diferentes concentraciones y tiempos empleados (tabla 4). Entre las células muertas, la mayoría se apreciaron como células libres o en pares que sólo se habían unido pero cuya membrana estaba dañada.

Concentración celular (célis/mL x 10 <sup>5</sup> )	Tiempo de exposición a RF (seg)	
	15	20
2	73.78±18.5	72.69±26.56
3	75.96±18.34	72.6±18.6
4	72.36±21.33	74.75±19.64

**Tabla 4. Viabilidad promedio total (%), relativa a la concentración celular y al tiempo de exposición a la radiofrecuencia.**

La forma como se observaron las células al microscopio óptico se aprecia en la figura 9. Las células  $\beta$  pancreáticas se identifican por su núcleo definido, una forma semi esférica y por pequeñas vesículas (gránulos de insulina) en su citoplasma. Las microesferas de látex se diferenciaron por su refringencia y tamaño relativo como pequeños puntos sin color.

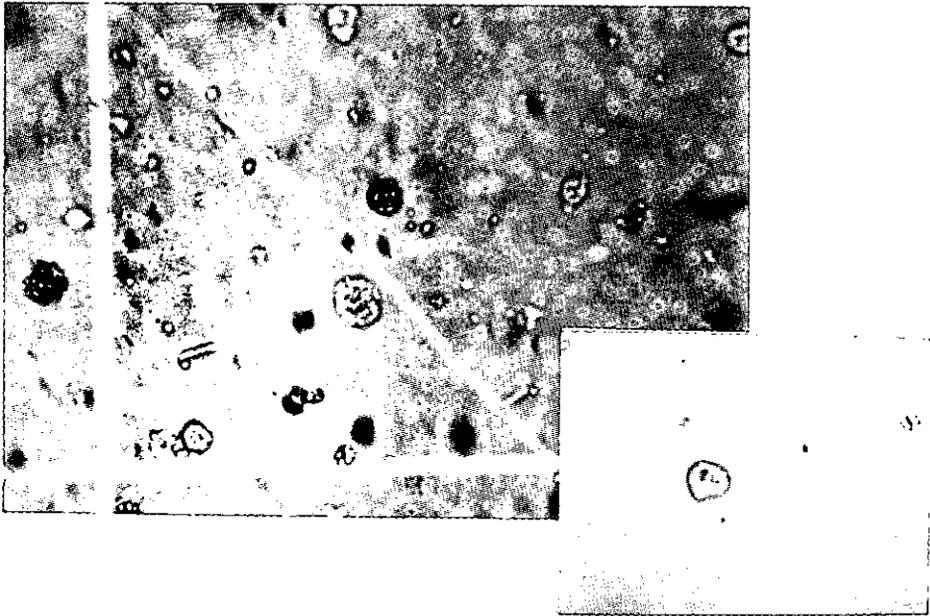
En las figuras 10, 11 y 12 se presentan los porcentajes promedio de cada producto obtenido de la electrofusión, a las diferentes concentraciones celulares, en 15 y 20 seg de exposición. En general, se aprecia la disminución en su rendimiento a mayor tiempo de exposición a RF y el aumento en relación a la concentración celular. Cabe destacar que sólo el porcentaje de células policariontes aumentó de 7.4% con 15 seg de RF a 9.4% con 20 seg, en la concentración de  $3 \times 10^5$  células/mL.

En los diferentes tiempos y concentraciones celulares evaluados, el número de células libres (no electrofusionadas) obtenidas se incrementó en relación al tiempo de exposición a RF, siendo más notorio a la concentración de  $2 \times 10^5$  células/mL (figura 13). También se observó una ligera disminución en su porcentaje relativo después de la electrofusión conforme aumentó la concentración celular.

Con el análisis de varianza no se detectaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) entre las distintas concentraciones, así como tampoco se encontró alguna interacción con el factor tiempo. Sin embargo, las exposiciones a RF de 15 y 20 seg. si presentaron diferencias significativas ( $p < 0.03$ ) entre los rendimientos obtenidos de células homodiariontes y heterodiariontes, siendo el óptimo de 15 seg, donde los promedios fueron mayores al 10%.

Al analizar cada concentración celular dentro del tiempo de 15 seg (figura 14), el mejor rendimiento de la electrofusión se observó a  $3 \times 10^5$  céls/mL, donde fue mayor el porcentaje de heterodiariontes obtenidos (14.72%) y menor el de policariontes (uno de productos no deseados), en relación a las otras concentraciones.

La viabilidad total a la concentración de  $3 \times 10^5$  céls/mL con 15 seg. de RF aplicada fue de 75.96%, pero como me mencionó anteriormente, no existieron diferencias significativas con respecto a las demás ni tampoco una predominancia de mortalidad sobre algún tipo de producto de la electrofusión.



**Figura 9: Células insulares sin marcaje, con marcaje y un heterodiarionte. Las microesferas se diferencian entre si por su refringencia dentro del citoplasma y por su tamaño relativo. 40x**

Figuras 10, 11, 12 y 13. Porcentajes obtenidos de los diferentes productos de la electrofusión a dos tiempos de exposición a RF, 15 y 20 seg.

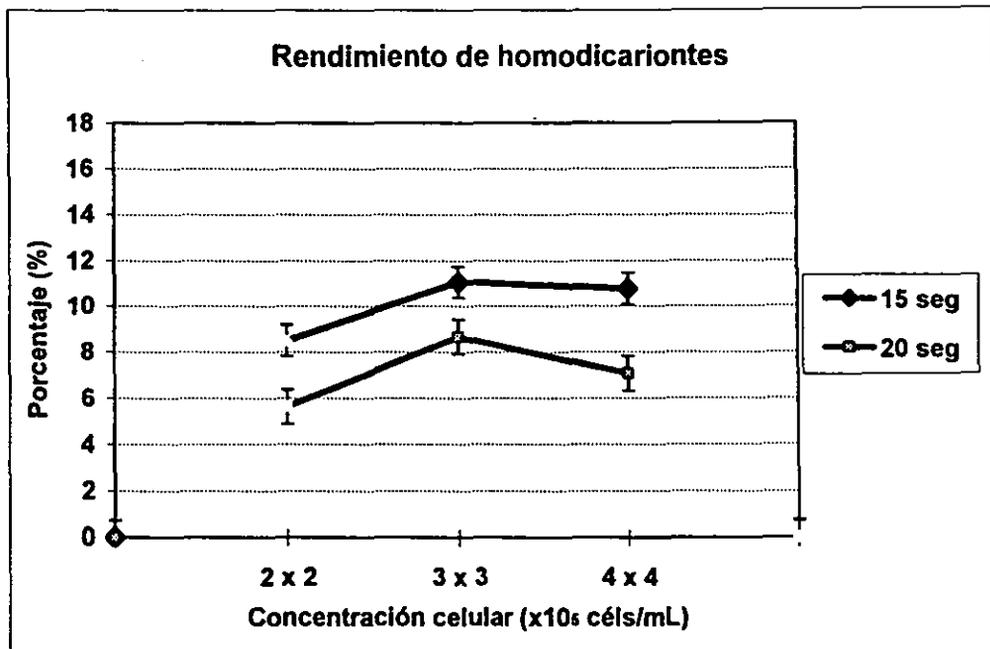


Figura 10. Comparación de rendimiento de homodicariones a 2 tiempos de exposición a RF

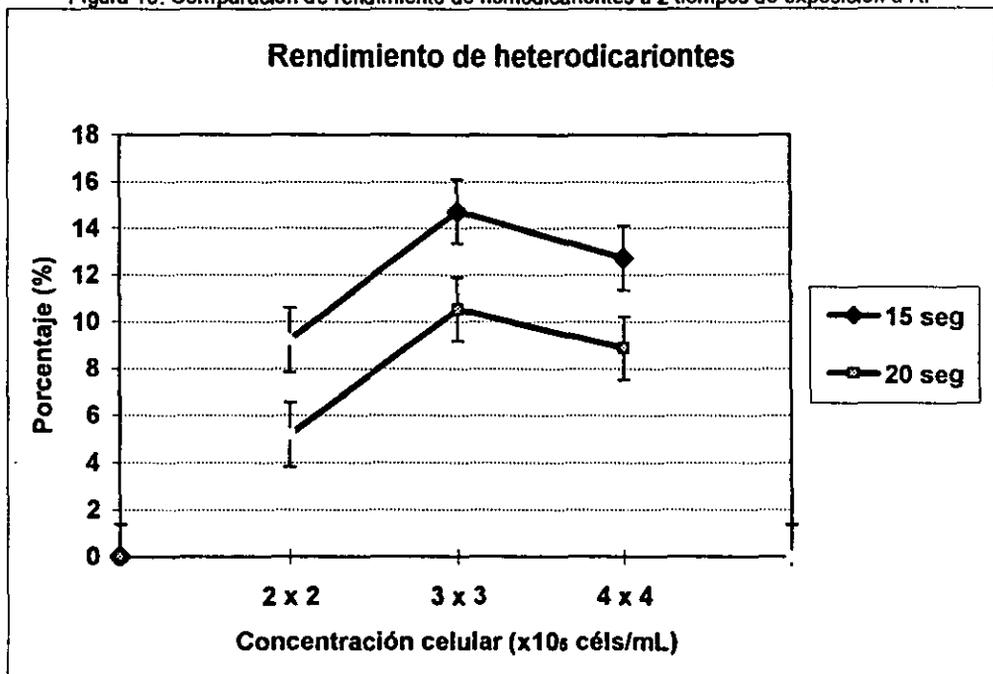


Figura 11. Comparación de rendimiento de heterodicariones a 2 tiempos de exposición a RF

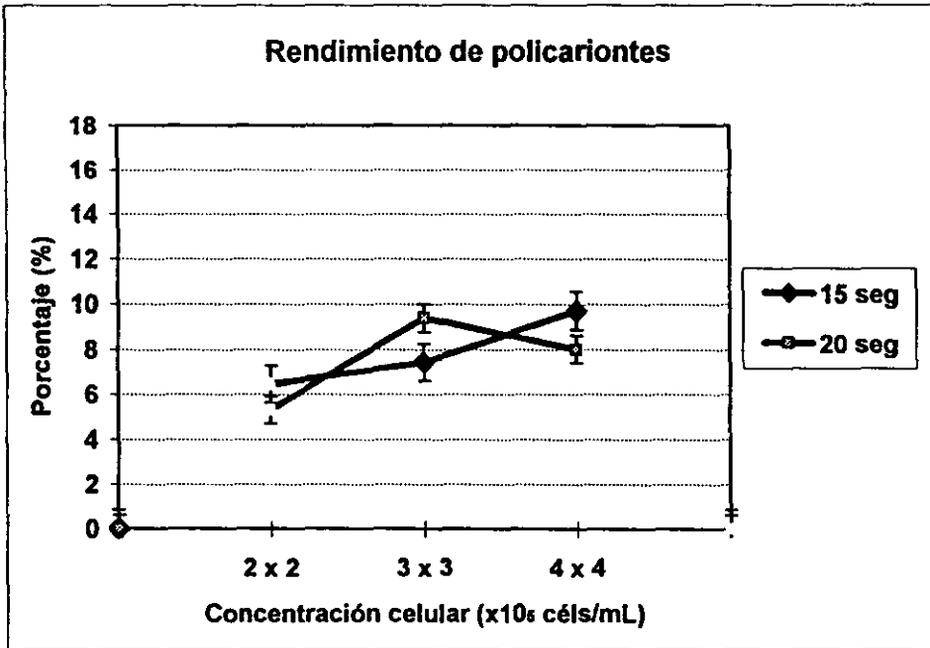


Figura 12. Comparación de rendimiento de policariontes a 2 tiempos de exposición a RF

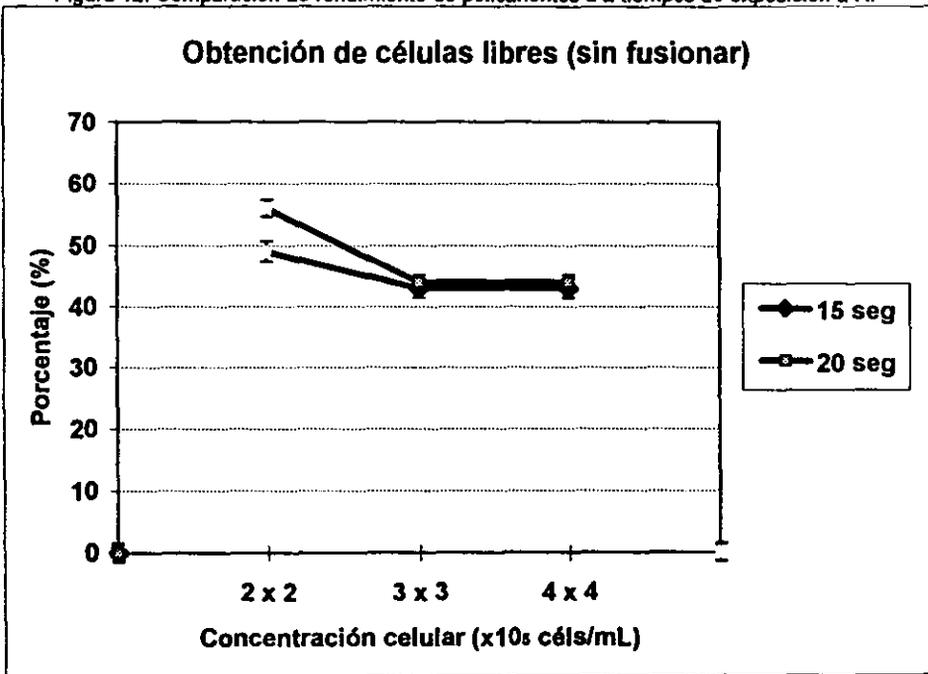
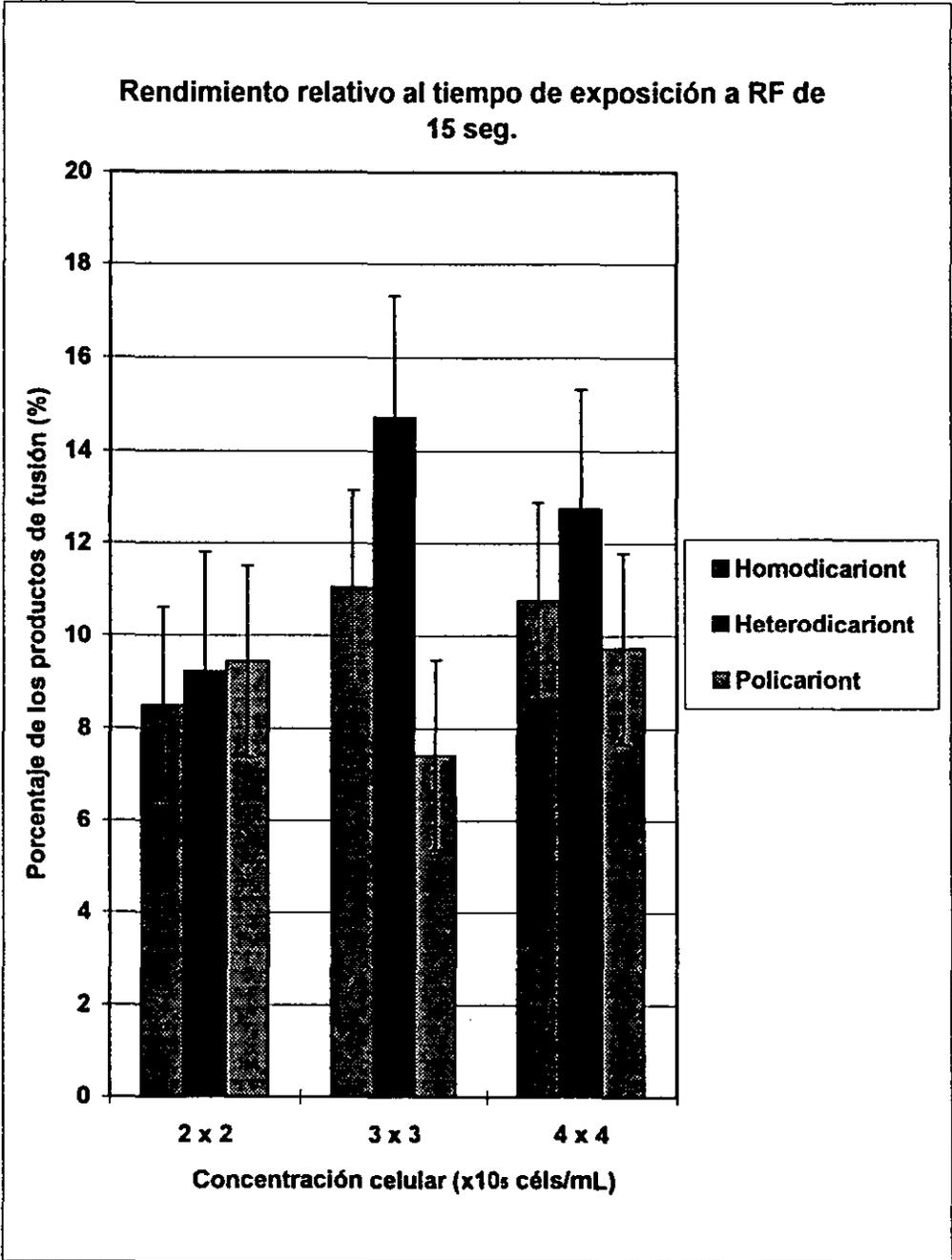


Figura 13. Presencia de células libres (no fusionadas) a 2 tiempos de exposición a RF

Figura 14. Comparación de los rendimientos obtenidos de productos de la fusión, entre las tres concentraciones celulares a 15 seg de exposición a RF.



## VII. DISCUSIÓN.

**1. Diferenciación entre homodícariontes y heterodícariontes.** El aislamiento y marcaje de las células insulares de rata con microesferas de látex fue lo suficientemente satisfactorio para los objetivos de este trabajo. Durante la incubación de las células, las microesferas que fueron introducidas al citoplasma no provocaron una disminución notable en la viabilidad. El periodo empleado de 24 horas fue el necesario para poder observar de 1 a 2 microesferas incluidas dentro de la mayoría de las células viables.

En trabajos similares, las células ha sido marcadas con la endocitosis de agar teñido previamente con diferentes colorantes, los cuales pueden resultar tóxicos hasta cierto grado para las células una vez que el agar es asimilado completamente, y por lo tanto, afectarían directamente a la viabilidad<sup>62,72</sup>. La citofluorometría de flujo se presenta como la mejor opción para este tipo de estudios, ya que permite el aislamiento exclusivo de las células de interés; en este caso, de las células B de los islotes de Langerhans y posteriormente la separación de cada uno de los productos de la electrofusión dependiendo del número de núcleos presentes en el citoplasma<sup>75,76</sup>. Sin embargo, el costo de los reactivos y del equipo es muy elevado en comparación con los métodos anteriores y requiere del manejo cuidadoso debido a su sofisticación<sup>73,74</sup>.

Las microesferas de latex han sido empleadas principalmente en estudios de flujo sanguíneo entre los islotes de Langerhans, y para el aislamiento y purificación de éstos, resultando una buena opción, inerte a las funciones normales de las células secretoras<sup>77,78</sup>.

**2. Rangos de fusión celular.** En el presente trabajo, la electrofusión demostró ser una técnica aceptable para obtener células híbridas viables en un corto tiempo y con relativa facilidad como se ha reportado anteriormente<sup>47,50,51,62</sup>. En algunas pruebas de viabilidad se observó, en una pequeña proporción relativa, la fusión de células vivas con muertas y la presencia de restos celulares, los cuales podrían deberse a la manipulación mecánica al momento de mezclar los grupos celulares para su fusión.

Durante la fase de estandarización de las técnicas se realizó solo una observación general, empleando para la electrofusión concentraciones celulares de 1, 2, 3 y 4 x10<sup>5</sup> céls/mL con 10, 15, 20 y 25 seg de exposición a RF, de donde se delimitaron los rangos para cada variable en base a los mayores rendimientos obtenidos de células heterodícariontes.

En todas las concentraciones probadas a 10 seg de RF, los rendimientos fueron inferiores a los obtenidos a 15, sin embargo, de acuerdo con los resultados observados en este trabajo, resultaría conveniente realizar otras repeticiones y variar la concentración celular en función al tiempo.

Para un óptimo rendimiento de células heterodicas, obtenidas a partir de células insulares de rata electrofusionadas, el tiempo de exposición a la RF de 15 seg fue estadísticamente más determinante que la concentración celular, aunque los mayores porcentajes fueron obtenidos cuando se emplearon  $3 \times 10^5$  céls/mL. Estos resultados concuerdan con lo observado en la electrofusión de células pancreáticas totales de conejo, donde la concentración celular de  $3 \times 10^5$  fue significativa <sup>41</sup>.

Cabe resaltar aquí la especificidad del presente trabajo con respecto a su antecedente, donde se emplea un modelo animal mejor estudiado y con características más afines a la diabetes mellitus humana <sup>79</sup>. La electrofusión de células pancreáticas exclusivamente endócrinas (75% de ellas células  $\beta$ ), es más aceptable que si se mezclan con aquellas provenientes del tejido acinar, ya que las propiedades eléctricas en sus membranas son diferentes <sup>1</sup>. Además, la solución amortiguadora empleada por Pace para la electroporación de islotes, proporciona la osmolaridad y resistencia adecuada que no presenta la solución HBSS <sup>55</sup>.

Al comparar los resultados obtenidos con otros estudios de electroporación y electrofusión con células del islote de Langerhans, algunos de los parámetros eléctricos empleados son similares entre sí; sin embargo, otros difieren debido a que:

- la distancia entre los electrodos empleada fue menor (0.5 cm, generalmente es de 1 cm), que junto con la resistencia de la interfase implica disminuir el voltaje de las corrientes eléctricas y aumentar el tiempo de exposición <sup>51, 55, 56, 58</sup>.
- la dielectroforesis se realizó principalmente con CA de alta radiofrecuencia y de voltaje moderado para permitir (preferencialmente) el acercamiento de las células en pares.

Si se alterara cualquiera de los parámetros establecidos en el presente trabajo, las cadenas o "rosarios" de células que se forman en la dielectroforesis tenderían a ser más largas y podría incrementarse el número de células fusionadas entre sí, produciendo policariones. O bien, si la intensidad de las corrientes eléctricas o la exposición de las células a estas aumentan, podría exceder el límite para la apertura de microporos en las membranas y provocar su rompimiento irreversible <sup>43, 47, 51</sup>. Por esta razón se podría explicar el porque la cantidad de policariones no aumento en relación al tiempo.

Se empleó la solución amortiguadora señalada por Pace (1981) para electroporación de islotes, ya que ofrece al medio externo de la célula la conductividad y resistencia adecuadas al flujo de cargas, considerando el tiempo de exposición al voltaje y a la RF de la CA para la dielectroforesis, así como la resistencia dada por la interfase <sup>55</sup>. Para futuros trabajos, podría ser interesante evaluar los rendimientos de electrofusión variando las soluciones amortiguadoras, considerando los estudios previos de electroporación de islotes y obtención de líneas híbridas, además de las características despolarizantes de la membrana de la célula  $\beta$ , que son un evento determinante para la secreción de insulina <sup>4,15,56,61</sup>.

**3. Rendimiento de electrofusión.** En los trabajos de McClenaghan donde se electrofusionan específicamente células insulares normales con tumorales (1996) no se reporta el rendimiento en términos de cantidad de productos obtenidos, sino en la restauración de la función secretora y la proliferación de la línea híbrida establecida <sup>59,60,61</sup>. Considerando a la baja concentración celular empleada ( $1 \times 10^5$  céls/mL), es poco probable que se obtuviesen células policariontes. Además, sus resultados de hibridación y recombinación genética de la línea híbrida BRIN refleja directamente un aceptable rendimiento de células heterodicariontes.

En la electrofusión de células insulares de rata, el mejor rendimiento obtenido de células heterodicariontes fue de 14.72% con una viabilidad superior al 70%. Este resultado es muy similar al observado en el establecimiento de los parámetros para células pancreáticas totales de conejo, pero en este, la viabilidad fue mayor. Esta diferencia podría deberse a la presencia y características de las células acinares y otros tipos, además de las diferencias propias entre especies animales.

Cabe recordar que la finalidad del establecimiento de estos parámetros de electrofusión es para lograr la máxima obtención de células híbridas productoras de insulina. Al obtener mayor cantidad de células heterodicariontes, siendo de orígenes diferentes, aumentan las probabilidades de obtener diferentes combinaciones de material genético. En su aplicación para pacientes con diabetes mellitus, de fusionarse células  $\beta$  donadas con una muestra celular del receptor enfermo, la expresión genética ideal de las células híbridas sería la conservación de la capacidad de producción, regulación y secreción de insulina, al mismo tiempo de presentar las características inmunológicas de histocompatibilidad que eviten el rechazo de las células al injertarse. La combinación híbrida de genotipos y fenotipos puede observarse en células heterodicariontes fusionadas donde no predomina la carga genética de alguno de los progenitores por la cantidad de núcleos presentes, sin embargo, es necesario profundizar en el estudio de dichos híbridos.

## VIII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

En el presente trabajo se estableció que:

1.- Con el fin de obtener rendimientos óptimos de células heterodiariontes híbridas de células  $\beta$  pancreáticas, las condiciones de electrofusión para células del islote de Langerhans de rata wistar deben ser:

- Concentraciones celulares de ambos orígenes a fusionar ajustadas a  $3 \times 10^5$  céls/ml, en relación 1:1 v/v, en solución amortiguadora preparada según las especificaciones de Pace (1981).

- Tiempo de exposición de 15 segundos a radiofrecuencia de 0.5 Mhz con salida sinusoidal y 10 voltios RMS de corriente alterna, y pulso de corriente directa con salida de 300 voltios y decaimiento exponencial durante 1 milisegundo, en cámara de electrofusión de acrílico con electrodos de platino separados 0.5 cm.

2.- Bajo las condiciones experimentales antes mencionadas, se obtiene un rendimiento de células heterodiariontes híbridas del 14.72% con 75% de viabilidad.

3.- El marcaje de células insulares pancreáticas por endocitosis de microesferas de látex bajo condiciones de cultivo resulta una opción sencilla y práctica para la evaluación de los rendimientos de productos obtenidos de la electrofusión.

Estos parámetros podrían evaluarse en relación al cambio de voltaje, a las soluciones amortiguadoras empleadas, y al grado de pureza, viabilidad y origen de las muestras celulares.

Así como en los trabajos previos de electrofusión para el establecimiento de la línea celular híbrida BRIN, es necesario desarrollar la separación de dichas células  $\beta$  heterodiariontes, la selección de los híbridos y caracterizar la producción y secreción de insulina; la conservación, eliminación o recombinación de genes y cromosomas; la presencia y propiedades de los complejos de histocompatibilidad membranales y su viabilidad en condiciones fisiológicas, para finalmente evaluar su posible trasplante en sujetos diabéticos.

## IX. ANEXO.

La electrofusión de células se puede lograr induciendo de manera controlada, el estrecho acercamiento de las membranas plasmáticas en un campo eléctrico homogéneo, y la unión de pares o múltiples células se obtiene al aplicar uno varios pulsos de alta intensidad en breve tiempo. Esto es el resultado de los fenómenos de dielectroforesis y electroporación a los que se expone la célula ante un campo eléctrico.

El primer fenómeno de la dielectroforesis o movimiento de las células se establece cuando un campo eléctrico externo a la célula altera las cargas del medio extra e intracelular. Este cambio o potencial transmembranal  $\Delta\Psi$  se establece como la diferencia de cargas entre el interior y el exterior de la membrana de una célula, idealmente esférica, con un radio  $a$ , expuesta a un campo eléctrico uniforme  $E_0$ :

$$\Delta\Psi = 1.5faE_0 \cos\theta [1 - \exp(-t/\tau)]$$

$$\tau = faC_m (r_i + r_e/2)$$

$$f = 1 / (1 + aG_m(r_i + r_e))$$

Donde

$t$  es el tiempo de exposición al campo eléctrico

$C_m$  es la capacitancia de la membrana por unidad de área. En células de mamífero, la capacitancia es de  $1\mu\text{F}/\text{cm}^2$ .

$r_i$  y  $r_e$  son las resistencias específicas de los medios intra y extra celulares

$G_m$  es la conductancia de la membrana por unidad de área, considerada como uniforme. Este valor por lo general es tan pequeño que  $f \approx 1$ .

En el caso de las células insulares pancreáticas de rata, los diámetros celulares varían desde 8 hasta  $15\mu\text{m}$ .

Un  $\Delta\Psi$  óptimo para lograr la completa polarización de la membrana debe ser aproximadamente de 0.75 a 1 V en una célula esférica, lo que implica un rango de intensidad de corriente entre 100 y 400 V/cm. Si se consideran los ángulos de  $0^\circ$  y  $180^\circ$  donde la corriente es perpendicular a la membrana, la  $\Delta\Psi$  resulta mayor, induciendo la mayor separación de cargas a través de la membrana, ya que ésta funciona entonces como capacitor separando los iones y creando una polarización de la célula. Se establece entonces una fuerza de dielectroforesis  $F$  determinada por un gradiente de corriente externa uniforme  $E$ , por las características combinadas de la célula polarizada y la conductividad que tenga el medio  $B$ :

$$F = (2\pi a^3)(B)\Delta E_0^2$$

Esta fuerza de acercamiento entre las células permite un contacto muy cercano en cuestión de unos segundos de exposición. Dicho tiempo tiene una relación directa con la distancia que existe entre los electrodos, la intensidad del campo eléctrico y la amplitud o frecuencia del pulso de aplicación. Las soluciones con baja cantidad de iones permiten una baja conductividad de la corriente, y por lo tanto, una alta resistencia, la cual puede ser calculada como:

$$\text{Resistencia (ohms)} = \text{resistividad (ohm/cm)} \times \text{longitud de la cámara (cm)} \text{ por área (cm}^2\text{)}$$

La mayoría de los medios o soluciones empleadas en los protocolos de electrofusión poseen una conductividad de 50 a 150  $\mu\text{S/cm}$  (resistividad =  $6.67 \times 10^3$  Oms/cm) y una molaridad de 250 a 300 mM, lo que permite un rango de frecuencia de 100 kHz a 10 MHz, aplicable entre 5 y 20 seg., dependiendo del voltaje. Con estas características, el medio no solo favorece la formación de dipolos y la dielectroforesis de las células, sino también reduce considerablemente el calentamiento por la corriente y el daño celular.

Para aplicar la corriente de alta intensidad que induzca a la fusión de las membranas, también debe considerarse las características de la cámara de electrofusión. Considerando una distancia entre los electrodos de 0.5 cm., y un pulso de CD con decaimiento exponencial, puede aplicarse la relación de voltaje y tiempo que se expresa en la figura 15.

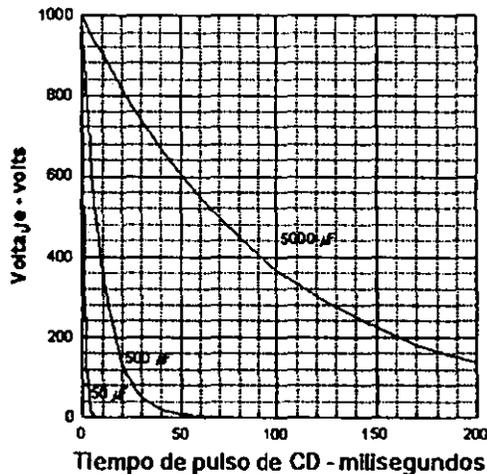


Figura 15. Relación de tiempo de duración y voltaje de CD descargado de un capacitor.

La generación de un pulso de alto voltaje se logra con un capacitor que almacene el voltaje de una fuente de poder y que lo "descargue" de manera gradual o exponencial. La cantidad de electrones por volt que puede retener un capacitor se denomina Faradio. La membrana celular también puede funcionar como un capacitor, separando cargas.

Para el presente trabajo, cabe destacar las características propias que poseen las células productoras de insulina. La célula  $\beta$  pancreática presenta actividad eléctrica en su membrana gracias a los canales iónicos presentes en ella. En estado de reposo, la membrana se mantiene polarizada, es decir, con mayor cantidad de cargas o iones en su exterior, con un potencial de membrana de  $-70\text{mV}$ . Ante un estímulo, como puede ser la presencia de glucosa, ocurre una lenta apertura de los canales membranales y, consecuentemente, una despolarización de la célula que culmina con la activación de los mecanismos de secreción de insulina.

Se ha determinado una relación directa entre la despolarización de la célula y la exocitosis de los gránulos de insulina. La función de capacitor de la membrana para la polarización de la célula  $\beta$ , la fusión de vesículas con la membrana plasmática y su forma tridimensional en solución semi-esférica son elementos que dificultan la determinación exacta de los parámetros adecuados y que podrían variar las predicciones de un cálculo matemático teórico para considerar el tiempo y la intensidad de las corrientes eléctricas.

## X. BIBLIOGRAFÍA.

- 1.- Ashcroft, F.M. y Ashcroft, S.J.H. (1992). Insulin molecular biology to pathology. IRL Press, New York. 421 pp.
- 2.- Pipeleers, D., Kiekens, R. y In't Veld, P. (1992). Morphology of the pancreatic  $\beta$ -cell. En Ashcroft, F.M. y Ashcroft, S.J.H.: Insulin molecular biology to pathology. IRL Press, New York.
- 3.- Orci, L., Vassalli, J.D. y Perrelet, A. (1988). The insulin factory. *Scientific American*; 09: 85-94.
- 4.- Hiriart, M. (1988). Análisis de los canales iónicos y la actividad secretora de células  $\beta$  individuales del páncreas de la rata. Tesis de doctorado. CINVESTAV, I.P.N.
- 5.- Walsh, D.A. (1996). The endocrine pancreas and pancreatic hormones.  
<http://medlstage.ucdavis.edu/endo/lecture/panc.htm>
- 6.- Orci, L. y Unger, R.H. (1975). Funcional subdivision of islets of Langerhans and the possible role of D-cells. *Lancet*; 2: 1243-1244.
- 7.- Orci, L., Malaisse Lagae, F., Ravazolla, M., Rouiller, D., Renold, A.E., Perrelet, A. y Unger, R. (1975). A morphological basis for intracellular communication between  $\alpha$ - and  $\beta$ -cells in the endocrine pancreas. *J. Clin. Invest.*; 56: 1066-1070.
- 8.- Hiriart, M. y Ramírez-Medeles, M. (1991). Funcional subpopulations of individual pancreatic  $\beta$  cell in culture. *Endocrinology*; 128 (6): 3193-3198.
- 9.- Pipeleers, D., Veld, P., Maes, E. y Van De Winkel, M. (1992). Glucose-induced insulin release depends on functional cooperation between islet cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 79: 7322-7325.
- 10.- Canadian Diabetes Association (1998). The Banting Museum.  
<http://www.diabetes.ca/banting/banting.htm>.
- 11.- Stein, R. (1993). Regulation of insulin gene transcription. *Trends Endocrinol Metab.*; 4: 96-101.
- 12.- Goodison, S., Kenna, S., Ashcroft, S.J.H. (1992). Control of insulin gene expression by glucose. *Biochem. J.*; 285: 563-568.
- 13.- Hiriart, M. y Mattesson, D.R. (1988).  $\text{Na}^+$  channel and two types of  $\text{Ca}^{++}$  channels in rat pancreatic  $\beta$  cell identified with the reverse hemolytic plaque assay. *J. Gen Physiol.*; 91: 617-639.
- 14.- Rosenbaum, T. (1994). Análisis del efecto del factor de crecimiento neural (NGF) sobre las corrientes iónicas de células  $\beta$  pancreáticas de rata. Tesis de Licenciatura en Biología, Facultad de Ciencias - U.N.A.M.
- 15.- Ashcroft, F.M. y Ashcroft, S.J. (1992). Mechanism of insulin secretion. En Ashcroft, F.M. y Ashcroft, S.J.H.: Insulin molecular biology to pathology. IRL Press, New York.
- 16.- Exton, J.H. (1991). Some thoughts on the mechanism of action of insulin. *Diabetes*; 40, 4: 522-525.

- 17.- Kahn, C.R., White, M. (1988). The insulin receptor and the molecular mechanism of insulin action. *J. Clin. Invest.*; 82: 1151-1156.
- 18.- Román R., R. (1993). Diagnóstico y clasificación de la diabetes mellitus. *Cemenáhuac* 1; 26: 16-17.
- 19.- American Diabetes Association (1997). Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 07: 1183.  
<http://www.diabetes.org/DiabetesCare/1997-07/pg1183.htm>
- 20.- Atkinson, M. y Maclaren, N. (1990). What causes diabetes?. *Sci Am*; 233 (1): 62-71.
- 21.- Serreze, D.V. (1993) Autoimmune diabetes results from genetic defects manifest by antigen presenting cells. *FESB Lett.*, 7: 1092-1096.
- 22.- Islas, A.S. y Lifshitz, G.A. (1993). Diabetes Mellitus. Interamericana-McGraw Hill, México. 366 pp.
- 23.- Madrazo, N. M. y Lifshitz, G.A. (1997). Guía diagnóstico-terapéutica. Diabetes mellitus tipo 2. *Rev. Med. IMSS*; 35 (5): 353-368.
- 24.- Menon, R., Cohen, R., Sperling, M., Cutfield, W., Mimouni, F. y Khoury, J. (1990). Pasaje transplacentario de insulina en mujeres embarazadas con diabetes mellitus insulino-dependiente. *N Engl J Med*; 323: 309-315.
- 25.- The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1993). Efecto del tratamiento intensivo de la diabetes en la aparición y progresión de complicaciones crónicas de la Diabetes Mellitus insulino-dependiente. *N Engl J Med*; 329: 977-986.
- 26.- Dinneen, S., Gerich, J. y Rizza, R. (1992). Metabolismo de los carbohidratos en la Diabetes Mellitus No Insulino Dependiente. *N Engl J Med*; 327, 10.
- 27.- Román, R.R. y Alarcón, A.F. (1994). Alternativas en el control de la diabetes mellitus. *Cemenáhuac* 2; 20: 15-17
- 28.- Beaser, R. (1992). Como Afinar La Insulinoterapia. *Postgraduate Medicine*; 91 (4), Marzo.
- 29.- Moller, D. y Flier, J. (1991). Resistencia a la insulina: Mecanismos, síndromes e implicaciones. Reimpreso de Eli Lilly y Compañía de México. *N Engl J Med*; 325; 13.
- 30.- Dinsmoor, R. (1995) Islet cell transplantation. *Diabetes Self-Management*.  
[http://www.castleweb.com/diabetes/d\\_0n\\_701.htm](http://www.castleweb.com/diabetes/d_0n_701.htm)
- 31.- Lanza R., Sullivan, S. y Chick, W. (1992). Islet Transplantation with immunoisolation. *Diabetes*; 41: 1503-1510.
- 32.- Meza, M.S., Fanghanel, S.G. y Gutiérrez, G.R. (1997). Transplante de islotes pancreáticos. *Revista de Endocrinología y Nutrición*; 5 (2): 27-32.
- 33.- Tze, W.J., Tai, J., Cheung, S.C., Bissada, N. y Tsang, A. (1993). A diabetic rabbit model for pig islet xenotransplantation. *Transplantation*; 56 (6): 1348-1352.
- 34.- Sun, Y.L., Ma X., Zhou, D., Vacek, I. y Sun, A.M. (1993). Porcine pancreatic islets: isolation, microencapsulation, and xenotransplantation. *Artif Organs*; 17 (8): 727-733.

- 35.- Tamborlane, W., Champion, M., Rizza, R., Service, J. y Bergenstal, R. (1985). Observations on control of glycemia with conventional insulin therapy or continuous subcutaneous infusion. *Diabetes*; **34** (Suppl.3): 22-26.
- 36.- Eisenbarth, G.S. (1996). Islet and pancreatic transplantation - Autoimmunity and alloimmunity. *N Engl J Med*; **335**, 12: 888-890.
- 37.- Wang, T. (1992). Prevention of recurrence of IDDM in islet-transplanted diabetic NOD mice by adjuvant immunotherapy. *Diabetes*; **41**: 114-117.
- 38.- Stegall, M.D., Lafferty, K.J., Kam, I. y Gill, R.G. (1996). Evidence of recurrent autoimmunity in human allogenic islet transplantation. *Transplantation*; **61** (8): 1272-1274.
- 39.- Newgard, C. (1994). Cellular engineering and gene therapy strategies for insulin replacement in diabetes. *Diabetes*; **43**: 341-50.
- 40.- Csete, M.E., Benhamou, P.Y., Drazan, K.E., Wu, L., McIntee, D.F., Afra, R., Mullen, Y., Busutil, R.W. y Shaked, A. (1995). Efficient gene transfer to pancreatic islets mediated by adenoviral vectors. *Transplantation*; **59** (2): 263-268.
- 41.- Barrera, E., Aranda, A., Vilches, A., Fregoso, M., Castillo, I., Martínez, J. y Vargas, A. (1998) Transplante de células pancreáticas totales electrofusionadas: Cuadro clínico y análisis histopatológico en conejo a los 18 meses. En Mancilla, J.M. y Vilaclara, G. *Cuadernos de investigación interdisciplinaria en ciencias de la salud, la educación y el ambiente*. Vol. I. México: U.N.A.M.
- 42.- Ringertz, N. y Savage, R. (1976). Cell Hybrids. Academic Press, U.S.A.: 366 pp.
- 43.- Neumann, E., Sowers, A. y Jordan, C. (1989). Electroporation and Electrofusion in Cell Biology. Plenum Press, U.S.A.: 436 pp.
- 44.- Potter, H. (1988). Electroporation in biology: methods, applications, and instrumentation. *Anal. Biochem.* **175**: 361-373.
- 45.- Wen Hui, S. y Stenger, D. (1993). Electrofusion of cells: Hybridoma production by electrofusion and polyethylen glycol. Induction of cell-cell fusion en Academic Press Methods in Enzimology; **220** (16): 212-227.
- 46.- Karsten, U., Stolley, P. y Seidel, B. (1993). Polyethylene Glycol and Electric Field-Mediated Cell Fusion For Formation of Hybridomas. Induction of cell-cell fusion en Academic Press Methods in Enzimology **220** (17): 228-237.
- 47.- Chang, D., Chassy, B., Saunders, J. y Sowers, A. (1992). Guide to electroporation and electrofusion. Academic Press, U.S.A.:581 pp.
- 48.- Zimmermann, U. y Veinken, J. (1982) Electric field-induced cell-to-cell fusion. *J. Membrane Biol.*; **67**: 165-182.
- 49.- Abidor, I.G., Barbul, A.I., Zhelev, D.V., Doinov, P., Bandrina, I.N., Osipova, E.M. y Sukharev, S.I. (1993). Electrical properties of cell pellets and cell electrofusion in a centrifuge. *BBA*; **1152**: 207-218.

- 50.- Cytopulse Sciences Inc. (1998). Electrofusion Tutorial. <http://www.cytopulse.com/main.html>
- 51.- Zimmerman, U. (1986). Electrical breakdown, electropermeabilization and electrofusion. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*; **105**: 176-250.
- 52.- Nishihira, T., Ishii, H., Kasai, M. y Tachibana, T. (1979). Prolonged survival time of allogenic skin grafts in host pretreated with somatic cell hybrids and prednisolone. *Tohoku J Exp Med.*; **129** (1): 71-74.
- 53.- Gonzalez R. J., Nuñez, A., Guerrero P. E. y Martínez, T. (1983). Formación de homocariocitos hepáticos producidos con polietilenglicol. Ausencia de rechazo histopatológico. Aspecto histológico producido por la fusión celular. *Bol. Estud. Méd. Mex.*; **32** Supl.: 219-227.
- 54.- Gonzalez, R. J. (1995). Hibridación de células humanas. Resultados en hemofilia. *Rev. Med. IMSS*; **33**: 137-139.
- 55.- Pace, C., Tarvin, P., Neighbors, A., Pirkle, J. y Greider, M. (1980). Use of high voltage technique to determine the molecular requirements for exocytosis in islets cells. *Diabetes*; **29**: 911-918.
- 56.- Yessen, M.A., Pedley, K.C., y Howell, S.L. (1982). Regulation of insulin secretion from islets of Langerhans rendered permeable by electric discharge. *Biochem. J.*; **206**: 81.
- 57.- German, M.S. (1993). Glucose sensing in pancreatic islet  $\beta$ -cells: the key role of glucokinase and the glycolytic intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **90**: 1781-85.
- 58.- Takaki, R., Ono, J., Yokogawa, Y., Kumae, S., Nakamura, M., Koyama, H. y Kawaoi, A. (1984). Establishment of glucagon-producing cells by cell hybridization. *Diabetes*; **33** (9): 879-887.
- 59.- McClenaghan, N.H., Barnett, C.R., O'Harte, F.P., Swanston-Flatt, S.K., Ah-Sing, E. y Flatt, P.R. (1996). Characteristics of BRIN-BG5 and BRIN-BG7, two novel glucose-responsive insulin-secreting cell lines produced by electrofusion. *J Endocrinol*; **148** (3): 409-417.
- 60.- McClenaghan, N.H., Gray, A.M., Barnett, C.R. y Flatt, P.R. (1996). Hexose recognition by insulin-secreting BRIN-BD11 cells. *Biochem Biophys Res Commun*; **223** (3): 724-728.
- 61.- McClenaghan, N.H., Barnett, C.R., Ah-Sing, E., Abdel-Wahab, Y.H., O'Harte, F.P., Yoon, T.W., Swanston-Flatt, S.K. y Flatt, P.R. (1996). Characterization of a novel glucose-responsive insulin-secreting cell line, BRIN-BD11, produced by electrofusion. *Diabetes*; **45** (8): 1132-1140.
- 62.- Barrera, E., Vilches, A., Fregoso, M., Vargas, A., Castillo, I., Martínez, J. y Velasco, R. (1997). Parámetros de electrofusión en células pancreáticas. *Bioquímica*; **22** (3), 88: 722-726.
- 63.- McLaughlin, C. A. y Chiasson, R.B. (1979). Laboratory anatomy of the Rabbit. Segunda Edición. Dubeque, Iowa: Wm. C. Brown: 68 p.
- 64.- Jöms, A., Klempnauer, J. y Steiniger, B. (1995). Insulin cells in rat whole-pancreas isografts display heterogeneous immunoreactivities and Ultrastructure. *Pancreas*; **10**, 3: 314-324.

- 65.- Nak Hooda, A., Like, A., Chappel, C., Murray, F. y Marliiss, E. (1993). The espontaneous diabetic wistar rat. Metabolic and morfologic studies. *Diabetes*; 43: 612-624.
- 66.- Lacy, P. y Kostianovsky, M. (1967). Method for isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes*; 16: 35-39.
- 67.- Vidal Tamayo, R. (1994). Efectos del factor de crecimiento neural y del AMP cíclico sobre la diferenciación morfológica de células beta pancreáticas. Tesis de Licenciatura en Investigación Biomédica Básica, I.I.B. - U.N.A.M.
- 68.- Scow.R.O. (1957). "Total" pancreatectomy in the rat. Operation effects and post operative care. *Endocrinology*; 60: 359-367.
- 69.- Lake, S., Anderson, J., Chamberlain, J., Gardner, S., Bell, P. y James, R. (1987). Bovine serum albumin density gradient isolation of rat pancreatic islets. *Transplantation*; 43 (6): 805-808.
- 70.- Watt, J.W. y King, J.M. (1984). A simple method for large scale electrofusion and culture of plant protoplast. *Bioscience*; 4: 335-342.
- 71.- Pitwat, H.P. y Zimmermann, U. (1981). Giant culture cell by electric field-induced fusion. *FEBS Letters*; 133: 169-174.
- 72.- Barrera, E., Velazco, R., Muñoz, A., Ortiz, V., Sandoval, A., Fregoso, M., Castillo, I., Martínez, J. y Vargas, A. (1996). Determinación de los parámetros experimentales para la electrofusión de células hematopoyéticas. *Bioquímica*; 21 (2), 83: 471-476.
- 73.- Jaroszeski, M.J., Gilbert, R. y Heller, R. (1994). Detection and quantitation of cell-cell electrofusion products by flow cytometry. *Anal. Biochem.*; 216: 271-275.
- 74.- Vilches, A., Barrera, E., Fregoso, M., Castillo, I., Martínez, J. y Vargas, A. (1998). Aislamiento de células pancreáticas insulares híbridas de rata wistar. Memorias del XVII Coloquio de Investigación. México: U.N.A.M. Iztacala. En prensa.
- 75.- Corbett, J., Kwon, G., Misko, T., Rodi, C., y McDaniel, M. (1994). Tyrosine kinase involvement in IL-1 $\beta$ -induced expression of iNOS by  $\beta$ -cells purified from islets of Langerhans. *Am. J. Physiol.*; 267 (Cell Physiol. 36): C48-54.
- 76.- Wang, J., Corbett, J., Marshall, C., y McDaniel, M. (1993). Glucose-induced insulin secretion from purified  $\beta$ -cells. *J. Biol. Chem.*; 268, 11: 7785-7791.
- 77.- Fujioka, T., Terasaki, P., Heintz, R., Merideth, N., Lanza, R., Zheng, T., y Soon-Shiong P. (1990). Rapid purification of islets using magnetic microspheres coated with anti-acinar cell monoclonal antibodies. *Transplantation*; 49, 2: 404-407.
- 78.- Nandigala, P., Chen, T., Yang, C., Hsu, W., y Heath, C. (1997). Immunomagnetic isolation of islets from the rat pancreas. *Biotechnol Prog*; 13, 6: 844-848.
- 79.- Mendez, D., y Ramos, H. (1994). Animal models in Diabetes reserch. *Arch. Med. Res.*; 25, 4: 367-375.