

Universidad de Valladolid. — Facultad de Medicina
Cátedra de Fisiología

Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Instituto Español de Fisiología y Bioquímica
Agregación de Valladolid

(Director: Prof. E. Romo Aldama)

Modificaciones histológicas de los islotes pancreáticos en los animales sometidos a choques insulínicos experimentales

por E. Romo Aldama, P. Bosque y F. F. de la Calle

(Recibido para publicar el 14 de noviembre de 1952)

La estructura del páncreas endocrino fué estudiada en el siglo pasado por Diamare y Ssobolew, comprobando estos autores dos tipos de células, que Lane y Bensley designan con las letras A y B, siendo encontradas más tarde por Bloom en el páncreas humano y logrando, por fin, Ferner su clara diferenciación con los métodos histológicos de impregnación argéntica. Efectivamente, tanto en los islotes de Langerhans como en los conductos excretores pancreáticos existe una gran cantidad de células cuyo protoplasma está cargado de granulaciones que se tiñen fácilmente con los citados métodos.

Las células argentófilas pancreáticas fueron descubiertas por el italiano Piazza con el método de Levaditi y posteriormente son estudiadas por W. Burkl, Van Campenhout, Erspammer, Erös, Ferner, Gomori, Kon, etc.

Según Campenhout, Kon y especialmente Ferner, las células argentófilas de los islotes son idénticas a las de granulaciones acidófilas, es decir, a las células alfa, aduciendo como argumento fundamental el comportamiento semejante durante el período embrionario de las células argentófilas y de las llamadas por La-guesse y Hammar «células turbias», que pueden ser consideradas como precursoras de las acidófilas del islote adulto; tanto las células turbias en el feto como las argentófilas en el recién nacido

y en el niño tienen la misma disposición colocándose en la periferia del islote, deduciendo de ello la identidad de ambas estirpes celulares.

Algunos investigadores se oponen a esta identificación de las células argentófilas y turbias, no considerando a estas últimas como las precursoras de las acidófilas o alfa de los islotes adultos, ya que en el páncreas fetal de la rata se encuentran células beta a los diecinueve días de la fecundación, mientras que las células alfa sólo aparecen dos días después del nacimiento. Además, Burkl, realizando estudios con la técnica de Passini (con la que se diferencia clamente las células alfa de las beta) y con la de impregnación argéntica de Gross-Schultze, demuestra que tanto en los islotes del páncreas del caballo como en los humanos no todas las células alfa se dejan teñir con la plata y, además, en condiciones totalmente normales se puede impregnar también algunas de las beta. Este último hecho concuerda, por otra parte, con las propias investigaciones de Creutzfeldt, que encuentra células beta con granulaciones argentófilas en las partes periféricas del protoplasma en animales de experimentación a los que se habían administrado aloxana para provocarles una diabetes. Es decir, no todas las células argentófilas son uniformes desde el punto de vista bioquímico, ya que aunque la mayoría de ellas poseen granulaciones acidófilas, otras están cargadas de sustancias de reacción básica.

A pesar de estas pequeñas diferencias, las células argentófilas constituyen una entidad biológica y son capaces de reaccionar como tales ante las modificaciones metabólicas de los carbohidratos, según demuestran los trabajos de Ferner, Gaede y Kastrup. Todavía Erspamer considera con más amplitud esta entidad, pues en ella comprende no solamente las células argéntoafines de los islotes, sino también la de los conductos excretores del páncreas exocrino y las situadas en la pared intestinal, que también tiene afinidad por las sales de plata, designando a este amplio sistema con el nombre de «elementos enterocromafines», por ser, según este autor, las células precursoras de las propias cromafines (células amarillas) tingibles por el método de Masson que forma el sistema enterocromafín.

El significado fisiológico de las células argentófilas de los islotes parece actualmente aclarado gracias a las investigaciones de Ferner, Gaede y Kastrup, quienes les atribuyen la misión de segregar un principio de acción glucogenolítica sobre el hígado, el denominado por ellos «glucagon» y que tiene acción hipergluceante y, por tanto, antagónica respecto a la insulina. También las experiencias de nuestro compatriota R. Candéla señalaron que las necesidades de insulina en el perro con diabetes aloxánica son superiores a las del mismo animal después de la extirpación del

páncreas, demostrando estos mismos autores en otro trabajo que ello es debido a una acción antiinsulínica de este órgano.

Con arreglo a esta concepción el páncreas segregaría dos hormonas de acción opuesta sobre el nivel del azúcar sanguíneo, la insulina formada en las células beta, de acción hipoglucemiante y el principio glucogenolítico o glucagón fabricado en las alfa, que eleva la glucemia por favorecer la glucogenolisis hepática.

En este trabajo hemos intentado comprobar si existe alguna modificación histológica de las células del páncreas endocrino en la hipoglucemia experimental, en comparación con el animal normal; y como hemos utilizado la técnica de Gross-Schultze, sus conclusiones son más bien aplicables a los elementos argentófilos del islote, que, como hemos visto anteriormente, no se pueden identificar en absoluto con las células alfa.

Material y métodos

Hemos dispuesto dos series de cobayas; en una de ellas cinco conejillos son sometidos a un ayuno de doce horas, al cabo de las cuales son sacrificados, extrayéndose los órganos para su examen histológico. Los de la otra serie, en número de 10, previo ayuno de doce horas son inyectados con dosis progresivas de insulina durante cuatro días seguidos desde 5 a 14 Unidades por 100 gr. de peso, llegándose al coma y procurándose evitar su muerte en caso de necesidad con inyecciones de glucosa. Pasados estos días el animal es inyectado con una dosis de 14 Unidades por 100 gr. de peso, con lo cual se provoca un shock mortal, procediéndose a la extracción de órganos para su examen.

Técnicas histológicas. — Inmediatamente después de la muerte, el material objeto de estudio ha sido fijado en formol al 10 % durante quince días como mínimo.

Para la demostración de los elementos argentófilos hemos empleado la técnica de doble impregnación argéntica de V. Jabonero, que es de resultados más seguros que la de Gross y permite colorear al mismo tiempo una gran cantidad de cortes (en caso necesario pueden ser teñidos hasta 200 cortes en una sola vez) La marcha concreta de la operación es la siguiente:

- 1.º Corte por congelación, lavado abundante en agua destilada.

- 2.º Los cortes se colocan a continuación en un pocillo de cristal que contiene una solución de nitrato de plata al 20 % en agua destilada, permaneciendo en él unos quince minutos aproximadamente.

3.° A continuación se pasa sucesivamente a 5 pocillos llenos de formol al 20 % en agua común, debiendo pasarse todos los cortes juntos a cada pocillo. En los primeros pocillos se forman nubes blanquecinas.

4.° Paso rápido por agua destilada (manejar todos los cortes de una vez).

5.° A continuación se pasa a un pocillo que contenga carbonato de plata amoniacal donde se agitará constantemente, terminando por adquirir un color tabaco claro y entonces se les pasa a un segundo pocillo de carbonato de plata amoniacal, donde permanecerá hasta que tome un color tabaco oscuro (por regla general una hora).

6.° Lavado abundante en agua destilada.

7.° Paso a una placa de Petri que contenga agua acética (5 gotas de ácido acético por centímetro cúbico de agua destilada).

8.° Nuevo lavado en agua destilada.

9.° Dorado de los cortes y montaje en bálsamo.

La parte más delicada de la técnica es la preparación de la solución de carbonato argénticoamoniacal ya que un exceso de álcali perjudica la impregnación de los gránulos argentófilos como ha demostrado Ferner. Basándonos en esto hemos suprimido la adición de amoníaco en los dos pocillos de carbonato argéntico ya preparado, pues esta adición sólo debe hacerse cuando se quiera conseguir impregnaciones perfectas de fibras nerviosas.

La preparación de carbonato se hace de la siguiente forma :

1.° Añadir 50 c.c. de nitrato de plata al 20 %, una cantidad semejante de solución acuosa a saturación de carbonato sódico ; se formará un precipitado amarillento.

2.° Lavar varias veces este precipitado con abundante agua destilada y a continuación disolver el precipitado con amoníaco. El amoníaco hay que añadirle poco a poco y agitando constantemente. Es preciso evitar el exceso de álcali y disolver el precipitado en la cantidad exactamente precisa. De esta solución hemos preparado de una vez 500 c.c. con objeto de teñir todo el material necesario con la misma solución de carbonato argéntico y de este modo igualar las condiciones de la impregnación.

Para la determinación cuantitativa del número de células argentófilas hemos estudiado 100 islotes de páncreas de cobaya hipoglucémicos y otros tantos de la serie normal, elegidos de forma que todos tengan una extensión superficial aproximadamente igual. Para evitar las diferencias del grosor sólo contamos las células de uno de los diferentes planos de enfoque posible, escogiéndolo siempre aquel en que las células son más numerosas. El número total de células contadas lo dividimos por 100 para sacar la cifra media que corresponde a cada islote.

Resultados

Realizado el estudio en las condiciones anteriormente señaladas, resulta evidente que en los estados hipoglucémicos se produce una reacción de las células argentoafines en el sentido de un aumento numérico de las mismas y una mayor capacidad de fijación de las sales de plata. Ambas fases de esta reacción se pueden observar claramente en las microfotografías que acompañan a este trabajo.

En los 100 islotes de cobayas hipoglucémicos hemos contado 3.416 células argentoafines que corresponden por término medio a 34,16 por cada islote. En cambio, en el material normal sólo hemos conseguido contar 1.752, es decir, unos 17,52 células por islote.

No obstante es preciso decir que la imagen histológica no es uniforme, sino que, por ejemplo, en el material normal nos encontramos efectivamente con un gran número de islotes que poseen pocas células argentoafines y junto a ellos otros, desde luego los menos, que las contienen en gran abundancia. Lo mismo ocurre con el material procedente de los animales hipoglucémicos, aunque aquí, como es natural, predominan los islotes cargados con una gran cantidad de elementos argentófilos. Las microfotografías 2, 3, 5, 6, 8, 9 de la serie *a* representan claramente el aspecto de los islotes hipoglucémicos en los que se han producido una intensa reacción argentoafín; especialmente en el islote 6*a* las células argentófilas existen en tan gran cantidad que ocupan casi todo el islote, de modo que apenas dejan entre sí pequeños espacios claros ocupados por las otras células del islote; en cambio, en el islote 4*a* la reacción es mucho menos intensa, de tal modo que en el plano enfocado sólo puede contarse 6 células argentófilas colocadas en la zona central del islote; las microfotografías 1*a* y 7*a* representan una reacción de intensidad media.

La serie *b* de microfotografías corresponde a islotes normales. El representante en 3*b* está casi desprovisto de células argentófilas, ya que sólo puede verse 3 ó 4 de estos elementos. En el resto de los islotes el número es mayor, aunque nunca se llega a las imágenes típicas de la serie *a*. Únicamente en los islotes 1*b* y 2*b* se acerca a las reacciones de tipo medio de la serie *a*.

El segundo aspecto de la reacción, es decir, el grado de argento-filia de las células se manifiesta también claramente en la documentación fotográfica que ofrecemos. En todos los islotes de la serie *b* las células argentoafines resaltan mucho menos del resto del tejido y por eso las microfotografías nos muestran los contrastes claros de la serie *a*, en cuyos islotes las células aparecen

intensamente teñidas y cargadas de granulaciones argentoafines. No hemos observado ningún fenómeno de mitosis.

Discusión

Del estudio histológico de las preparaciones de las dos series de cobayas anteriormente indicadas se deduce, en primer lugar, que en la hipoglucemia se produce un evidente aumento del número de las células argentoafines del islote pancreático, aumento que no tiene lugar por proliferación propiamente dicha, puesto que no se observan fenómenos de mitosis, sino más bien por una transformación química de las granulaciones preexistentes que son capaces de absorber y reducir las sales de plata, o bien de verdadera formación de sustancias especiales.

Esta reacción argentófila traduciría el esfuerzo del páncreas para normalizar la hipoglucemia insulínica, puesto que las células argentófilas producirían una gran cantidad de principio glucogenolítico, que liberaría glucosa a partir del glucógeno hepático, conforme admite Ferner. Este autor ya observó en 1938 un aumento de las células argentófilas en conejillos de India que recibieron durante ocho días seguidos 0,2 c.c. de insulina cada veinticuatro horas, fenómeno también comprobado por Hinteregger, aunque en aquella época se ignoraba el verdadero papel de estas células y, por tanto, no pudo interpretarse en forma satisfactoria el significado de esta reacción proliferante de los elementos argentoafines insulares.

Respecto al mecanismo estimulante de la hiperplasia del grupo celular alfa podría realizarse a través de la hipófisis, como supone Ferner.

En la actualidad nos ocupamos de esclarecer la posibilidad de este mecanismo, aunque empleamos como animal la rata por ser más fácil en ella la técnica de la hipofisectomía que en el cobaya. También en la rata comprobaremos previamente si se verifica la modificación histológica del páncreas que hemos observado en el cobaya y que ha sido objeto del presente trabajo.

Resumen

1.^a Se estudia el comportamiento histológico de las células argentoafines de los islotes pancreáticos en dos series de cobayas; en una los animales son sacrificados después de un ayuno de doce horas, y en la otra, previo ayuno de doce horas, los animales son inyectados con dosis progresivas de insulina durante cuatro días seguidos, provocándose finalmente un shock mortal con una dosis

masiva de 14 Unidades por 100 gr. de peso. Se comprueba un evidente aumento del número de células argentófilas en los animales de la segunda serie, así como también un mayor grado de argentofilia.

2.^a Este aumento en el número de células argentófilas no se verifica por proliferación, sino por una transformación química de las granulaciones preexistentes.

Summary

The histological picture of the argentophile cells of the pancreatic isles in two series of guinea-pigs is studied. The animals of one of the series are killed after a 12 hours past. The animals of the other series after a 12 hours past are injected with progressive doses of insulin for 4 consecutive days, a mortal shock being finally provoked by injection of a massive dosis of 14 unities of insulin per 100 gr. in weight.

In the latter series an evident increase in the number of argentophile cells, as well as a greater degree of argentophilia was observed. This increase in the number of argentophile cells is not due to proliferation but to a chemical transformation of the prexistent granulations.

Bibliografía

- (1) BENSLEY : *Amer. J. Anat.* **12**, (1911-12) (cits. Ferner).
- (2) BURKL, W. : *A. Anatomica*, **12**, 1951.
- (3) CANDELA, J. L. R., GOÑI, CALDEIRO, CARRERAS : *Trabajos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas.* **9**, 1947.
- (4) CANDELA, J. L. R. y CRISTENSEN-KONIG : *Trabajos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas.* **13**, 1950.
- (5) CANDELA, J. L. R. : *Journ. Clin. Endocr. and Metab.* **12**, 245, 1952.
- (6) DIAMARE, V. : *Internat. Mschr. Anat.* **16**, 155, 1899.
- (7) FERNER : *Klin. Wschr.* **481**, 1948.
- (8) FERNER, GAEDE, KASTRUP : *Klin. Wschr.* **388**, 1950.
- (9) LANE : *Amer. J. Anat.* **7**, 1907.
- (10) ROMO ALDAMA y DE LA CALLE, F. : *Medicina*, enero 1952.
- (11) SSOBOLEW : *Virchows Arch.* **168**, 1902.