



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

IZTACALA

**TRANSPLANTE DE CÉLULAS PANCREÁTICAS INSULARES
ELECTROFUSIONADAS CON CÉLULAS DÉRMICAS EN RATAS
DIABÉTICAS POR VÍA HEMÁTICA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE BIÓLOGO

PRESENTA

EDUARDO RAMÍREZ BARRÓN

DIRECTOR DE TESIS: Dr. EDUARDO BARRERA ESCORCIA

COMITÉ TUTORIAL

Dr. EDUARDO BARRERA ESCORCIA

Dr. MARTIN PALOMAR MORALES

Biol. HÉCTOR BARRERA ESCORCIA

Biol. MARTHA MARÍA DE LOURDES FREGOSO PADILLA

Biol. ANTONIO MUÑOZ TORRES



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi madre, por todo el apoyo, confianza, amor incondicional que me brindo para terminar mis estudios. También agradezco tu enorme paciencia que me tuviste durante este tiempo.

A mis profesores y amigos del laboratorio Toño, Martha, Eduardo, Martín, Isable, Toño II y Deysi, que me enseñaron, orientaron y aguantaron durante mucho tiempo, que sin su ayuda nunca se hubiera terminado este proyecto.

Gracias a toda la bandera de la Patera por estar siempre con migo y por pasar tantos momentos buenos y que siempre me ayudaron cuando lo necesite: Luis Enrique, Miguel, Rodolfo, Arturo, Julian, Pato, Tavo, Ferenando Daniel, Jorge y Oliver, también a mis queridas amiguis Cecilia, Diana, Mireya y Valeria.

A toda la banda del súper CCH. Mis amigos Alma, Cinthia, Yganny, Claudia, Mariana, Luz, Cristhian, Temo, Ivan y Alonso; gracias por su amistad, confianza y por todos esos momentos lindos que pasamos.

A toda mi familia y hermanos Fam. Sánchez Barrón; mis tíos hermanos y sobrinos, por estar siempre con migo.

A mis tíos Susana y Navarro a sus hijos Vladimir y Cuauhtémoc, también a toda esa banda chida que siempre está con ellos, porque siempre me ayudaron a que esta meta se cumplirá muchas gracias.

Pues que puedo decir de la banda de la Fes Iztacala, solamente agradecerles eso momentos de trabajo, estrés, desveladas y diversión que serán inolvidables. Gracias: Bere, Rafa, Pulina, Marlenne, lo tucas, Laura, Marce, Kika, Tere, Meztli, Hyrais, Peter, Erika, Nely, Adriana, Anibal, Samara, Isis, Lety, Ulitron, Osvaldo, Sagrario, Priscila, Osiris, Jenifer, Jahir, America, y muchos más, que no por no mencionarlos dejan de ser menos importantes para mí, pero en verdad es mucha la banda desordenada que conozco.

Mis primos Gil, Tita, José, Luis, Memo, Miguel, Juan Antonio y Cesar, les doy las gracia por enseñarme a ser mejor persona.

DEDICATORIAS

A mi mamá que es lo más importante en mi vida y siempre está a mi lado apoyándome a cumplir mis sueños, por su amor y comprensión.

SORVIVORS: Juan Carlos, Ramón, Edsel e Isrrael que siempre estuvieron apoyándome y que me brindaron su amistad, también por todas esas desveladas que no siempre fueron por estudiar..jajaja...por enseñarme el valor de la amistad.

Aurora mi amiguita de cigarros te quiero mucho, a la hermosis de Mariana por compartir sus sueños con migo y a mi carnalis Carolina que comparte mis secretos. Las quiero mucho ojala siempre estén a mi lado.

Alejandro que te puedo decir, eres mi compadre por siempre te quiero condenadote.

Luis Angel, Gabriel, Héctor, Roberto y Gustavo porque cuento con ellos para toda la vida.

A mi abuela por mostrarme el valor, las ganas a la vida, ojala muchas personas fueran como tú y el mundo sería mejor.

A toda la banda borracha si se puede, pero ya párenle, no tienen llenadera.

ÍNDICE

RESUMEN	1
1 INTRODUCCIÓN	
Páncreas de los mamíferos	2
1.1 Estructura del islote pancreático	2
1.2 Célula β pancreática	3
1.3 La molécula de la insulina	4
2 DIABETES MELLITUS	
2.1 Definición	6
2.2 Clasificación	6
2.3 Criterio para el Diagnostico de la Diabetes Mellitus	7
2.4 Manifestaciones Bioquímicas	8
2.5 Epidemiología	9
2.6 Patogenia de la Diabetes Mellitus Tipo 1	10
2.7 Patogenia de la Diabetes Mellitus Tipo 2	10
2.8 Manifestaciones Clínicas	10
2.9 Tratamiento	11
2.10 Complicaciones Agudas	11
2.11 Complicaciones Tardías	12
2.12 Tratamientos Experimentales	12
3 LA FUSIÓN CELULAR	14
4 ANTECEDENTES	16
5 JUSTIFICACIÓN	17

6 HIPÓTESIS	18
7 OBJETIVOS	18
7.1 Objetivo General	18
7.2 Objetivos Particulares	18
8 MATERIAL Y MÉTODOS	19
8.1 Sujetos experimentales	19
8.2 Obtención de células dérmicas	20
8.3 Obtención de células insulares	20
8.4 Electrofusión	20
8.5 Trasplante de células electrofusionadas	21
8.6 Parámetros clínicos y bioquímicos	21
8.7 Análisis estadístico	22
9 RESULTADOS	24
9.1 Parámetros Clínicos	24
.2 Parámetros Bioquímico	28
10 DISCUSIÓN	33
11 CONCLUSIONES	35
12 PERSPECTIVAS	35
13 REFERENCIAS	36

RESUMEN

El presente trabajo se desarrolló con el fin de evaluar una nueva vía de administración para el trasplante de células híbridas, obtenidas por electrofusión de células insulares pancreáticas de un donador sano con células dérmicas del receptor diabético.

Se utilizaron ratas macho *wistar*, las cuales se distribuyeron en cuatro grupos de cuatro sujetos cada uno: Grupo 1, control sano; Grupo 2, control diabético; Grupo 3, animales transplantados con la mezcla celular sin fusionar; Grupo 4, animales transplantados con células fusionadas. Para obtener las células dérmicas, se extrajo un fragmento de piel de la región interescapular, el cual se sometió a una solución de tripsina en frío al 0.25% a 4 °C por 24 hrs. Las células β se realizó por medio de la técnica de Lacy-Kostianovskiy, modificada por Hiriart y Ramírez Meléndez. Para adquirir los híbridos, las células dérmicas y las células β se mezclaron en proporción 1:1 y posteriormente se sometieron a un pulso de corriente alterna de 15 segundos de 10 Volts RMS de 0.5 MHz. La fusión fue realizada con un pulso de corriente de 1 milisegundo de 300 Volts.

Los animales de los grupos 3 y 4 fueron sometidos al trasplante 5 días posteriores de diagnosticada la diabetes, la cual se indujo con aloxan (150 mg/kg) Para su observación se tomaron en cuenta los signos clínicos: (peso, ingesta de alimento, ingesta de agua y diuresis) y los parámetros bioquímicos: (glucemia basal, colesterol, triglicéridos, urea y creatinina). Todos los parámetros se midieron a los 0, 15, 30 y 45 días

Durante el seguimiento, los animales del grupo 1 mantuvieron sus valores dentro de los rangos normales, el grupo 2 mostro un cuadro de diabetes franca durante toda la observación, sin mostrar mejoría en ninguno de los parámetros medidos, con una tendencia a empeorar su estado de salud. Los animales del grupo 3 presentaron una mejoría a los 15 días de haberse realizado el trasplante, manteniendo sus valores entre los dos grupos control, sin embargo estos se deterioran para el día 45 de la observación. El grupo transplantado con híbridos, presentó un comportamiento similar al grupo 3 en la mayoría de los parámetros, mostrando una mejoría en su cuadro clínico y bioquímico a los 15 días del trasplante, mejorando aún más en parámetros como peso corporal, ingesta de alimento, ingesta de agua y diuresis. Mientras que en la secreción de insulina no se presentaron diferencias significativas en los grupos 3 y 4.

Los resultados muestran que es posible mejorar el cuadro diabético a los 15 días de haberse realizado el trasplante en el animal receptor, por vía hématica de células insulares pancreáticas de un donador sano electrofusionadas con células dérmicas del sujeto receptor.

Palabras clave: Diabetes mellitus, trasplante por vía hématica, células híbridas, electrofusión.

INTRODUCCIÓN

1. PÁNCREAS DE LOS MAMÍFEROS

El páncreas es un órgano que todos los vertebrados presentan. En las especies inferiores, su distribución tiende a ser difusa, y en las formas superiores es más compacto (1,2). El páncreas es una glándula mixta de componentes exócrinos y endócrinos que juegan un papel esencial en el rol de la digestión y el metabolismo (3,4).

La porción exócrina está compuesta por el tejido acinar, que participa en de la digestión, ya que secreta enzimas digestivas al duodeno. Los islotes de Langerhans constituyen la porción endócrina que influye en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas mediante la secreción de hormonas (3,5,6,7). La estructura básica del páncreas se esquematiza en la figura 1.

Los islotes, pancreáticos fueron descubiertos por Paul Langerhans en 1869. Comprenden entre el 2 y 3% de la masa total del páncreas y están distribuidos a través de todo el órgano localizándose en mayor cantidad en la cola del mismo. El tamaño y el número de los islotes varía de acuerdo a la especie, en páncreas de rata adulta el tamaño de los islotes va desde 50 a 500 μm y se calcula que en total hay 10,000, cada uno con aproximadamente 3000 células (6).

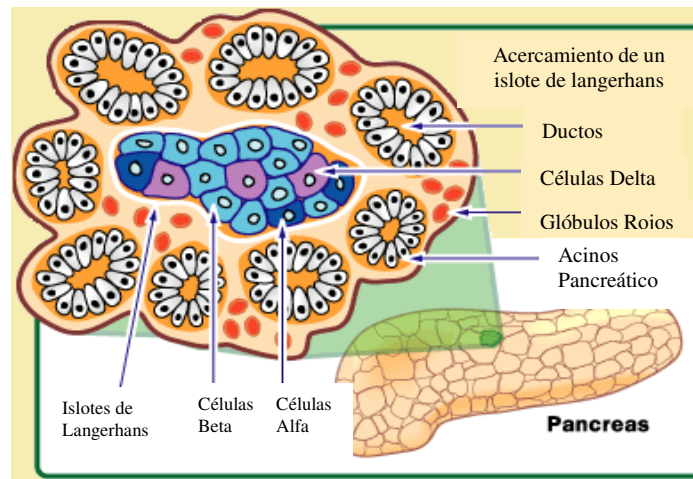


Figura 1: Páncreas

1.1 Estructura del islote Pancreático

Los islotes pancreáticos consisten de cordones anastomosados de células ovoides de 75 x 175 μm aproximadamente cercanos a un estroma prominente de tejido vascular, rodeados de una membrana basal. Esta estructura constituye el típico patrón endócrino en el cual cada célula tiene acceso directo al menos a un capilar, lo que permite la rápida transferencia de las hormonas secretadas hacia el sistema vascular (7). En la figura 2 se observa un islote.

Los islotes contienen tres tipos principales de células, *alfa* (α), *beta* (β) y *delta* (δ), que se distinguen entre sí por sus características morfológicas y por su distribución en el islote. Las células β , que constituyen aproximadamente el 60 a 75% de todas las células, están situadas en el centro de cada islote y secretan insulina. Las células α , aproximadamente el 25% del total, secretan glucagón. Las células δ constituyen alrededor del 10% del total y secretan somatostatina y se localizan en la periferia del islote (3,4,5,6,7). Además, en los islotes existe por lo menos un tipo más de célula, la célula PP, en escasa cantidad, y que secreta una hormona de función incierta denominada polipéptido pancreático (3).

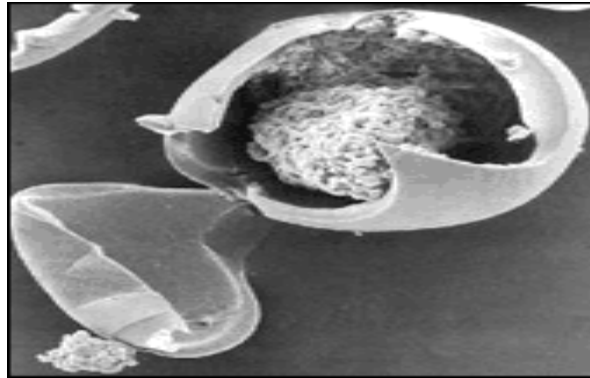


Figura 2: islote pancreático

Se distinguen tres tipos básicos de islotes: a) islote policelular, formado de todas las células endocrinas establecidas; b) islote bicelular conteniendo solo células α y β o células β y δ ; c) islotes monocelulares, constituidos únicamente por células β (8).

1.2 Célula β Pancreática

Las células β de varias especies de mamíferos se caracterizan por la presencia de un núcleo granular paracrystalino, separado por una membrana agranular.

Las células β vecinas pueden intercambiar iones y pequeñas moléculas a través de uniones comunicantes, las cuales están heterogéneamente distribuidas tanto entre células homólogas como heterólogas (9,10). La glucosa, el calcio y el AMPc tienen influencia en la configuración, el número y la permeabilidad de estas uniones comunicantes (10,11). En los sitios donde las células hacen contacto se han encontrado gran cantidad de microvellosidades.

Las células β muestran diferentes signos de polaridad. Al microscopio, la organización celular nos muestra grupos de 8 a 10 células cuyos polos apicales dan hacia el capilar. Los gránulos secretores se encuentran generalmente acumulados hacia el polo secretor y contienen toda la insulina (9, 12).

La ultraestructura de la célula β se conoce por estudios de microscopía electrónica, comparte muchas características propias de las células que secretan un polipéptido, con la característica distintiva de presentar grandes cantidades de gránulos formados por membrana que sirven de reservorio para la insulina (alrededor de 30 pg/cel) (12)

Además de secretar insulina, la célula β contiene alrededor de 100 matrices granulares y proteínas de membrana de distintos tamaños cuyas funciones no se conocen en su totalidad, los componentes que quizá sean más interesantes desde el punto de vista fisiológico son: Amilina, tiene una presencia del 5% en relación a la insulina y se localiza en el núcleo del gránulo de la célula β . Se ha discutido mucho sobre la posible relación en la etiología de la Diabetes Mellitus tipo 2 ya que se ha reportado que inhibe la secreción de insulina dentro de islotes aislados (12).

Betagranina (1-3%) se sugiere que puede estar involucrada en la secreción de las proteínas secretadas dentro de los gránulos. Estos gránulos contienen además enzimas responsables de la conversión de proinsulina a insulina, así como una ATPasa que facilita su funcionamiento (12).

Ácido γ - aminobutírico (GABA) sintetizado a partir de ácido glutámico actúa como un neurotransmisor inhibitorio que abunda en el sistema nervioso central y se ha encontrado que puede o no afectar la secreción de insulina.

Recientemente se ha observado que la célula β sintetiza y secreta factor de crecimiento neuronal (NGF) un polipeptido que estimula la secreción de insulina ya que aumenta la densidad de corrientes de sodio y de calcio (11).

1.3 La Molécula de la Insulina

La insulina fue la primera proteína en que se comprobó la existencia de acción hormonal, la primera proteína cristalizada, la primera en que se determinó la secuencia de aminoácidos, la primera sintetizada por técnicas químicas, la primera en que se demostró que era sintetizada como una molécula precursora más larga y la primera preparada para uso comercial mediante la tecnología de recombinación del ADN (5, 12).

La insulina biológicamente activa es una molécula que pesa 6KDa y consta de dos cadenas de polipéptidos (1): la A (21 aminoácidos) y la cadena B (30 aminoácidos) unidas por dos puentes disulfuro intercatenarios en A-Cys⁷ / B-Cys⁷ y A-Cys²⁰ / B-Cys¹⁹. También hay un puente disulfuro intracatenario en A-Cys⁶ / A-Cys¹¹ (12,13,14). La estructura de la insulina se muestra en la figura3.

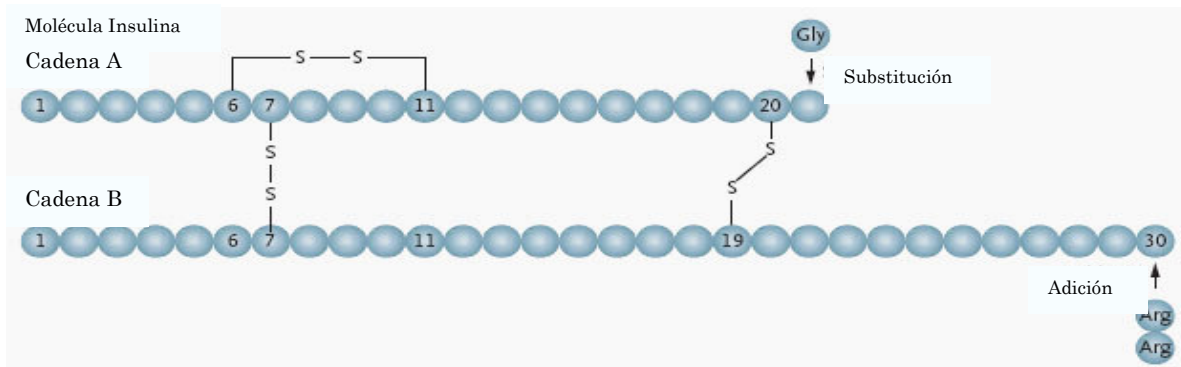


Figura 3: Molécula de insulina.

La molécula de la insulina está altamente conservada en la evolución de los vertebrados superiores; la estructura del gen es similar en muchas especies (9). El gen está formado por 3 exones y 2 intrones. En el exón 1 se hallan péptidos señal. El exón 2 contiene secuencias codificantes como el péptido señal, la cadena B y parte del péptido C, el exón 3 codifica la parte restante del péptido C, la cadena A y la secuencia 3' (12,13).

El producto final de la transcripción del gen de la insulina es un ácido ribonucleico mensajero (mRNA) cuya traducción da lugar a la pre-pro-insulina, que es un polipéptido de 11.5 KDa y es el prototipo de péptidos que se procesan a partir de moléculas precursoras más grandes. La secuencia hidrófoba de 23 aminoácidos pre o secuencia líder, es una señal que permite su descarga al retículo endoplásmico rugoso, donde enzimas proteolíticas segmentan la pre-pro-insulina en pro-insulina y remueven el péptido señal (13).

La pro-insulina es un péptido de 9KDa que contiene la cadena A y B de la insulina (de 21 y 30 residuos de aminoácidos respectivamente) unidas por el péptido C (30-35 aminoácidos). La pro-insulina es transportada por microvesículas al aparato de Golgi donde es empaquetada en vesículas limitadas por membranas que contienen una bomba de protones dependiente de ATP (12,13)

La biosíntesis de la pro-insulina es controlada por múltiples factores, como nutrientes, neurotransmisores, hormonas y actividades de cinasas de proteína. La conversión de pro-insulina en insulina es iniciada en el aparato de Golgi, al llegar a la cisterna *cis* del aparato de Golgi las vesículas provenientes del retículo endoplásmico rugoso se fusionan con la membrana, viajan a la siguiente cisterna y se fusionan con la membrana, este proceso se repite hasta llegar al polo *trans*, en donde la proinsulina será incorporada dentro de los gránulos secretorios en donde se lleva a cabo la conversión a insulina (12). Al menos el 95% de la pro-insulina se convierte en insulina y péptido C antes de entrar al sistema sanguíneo.

Durante la exocitosis los gránulos secretores se mueven hacia la membrana plasmática, por medio de los microtúbulos. La fusión entre la membrana que rodea al gránulo y la membrana celular permite el desarrollo del poro a través del cual la insulina es liberada hacia la sangre (13).

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, que son: hepatocitos, células adiposas y células musculares.

Otras de las funciones de la insulina son:

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

2 DIABETES MELLITUS

2.1 Definición

La diabetes mellitus se puede definir como un grupo de enfermedades metabólicas, que involucran alteraciones de los procesos bioquímicos de los carbohidratos, grasas y proteínas, cuyo factor común es la hiperglucemia, ocasionada por la pérdida parcial o total de la secreción de insulina o falta de acción de ésta. La hiperglucemia crónica ocasionada por la diabetes mellitus provoca a largo plazo daño, disfunción y falla de varios órganos; especialmente ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos (14,15).

Debido a los diferentes criterios diagnósticos y las características socioeconómicas de los pueblos, la diabetes mellitus es difícil de catalogar; sin embargo en muchos países representa la tercera causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares y oncológicas (13,14,15).

El diagnóstico de diabetes mellitus se establece cuando una persona tiene valores elevados de glucosa en la sangre, también cuando se han determinado síntomas como aumento de la sed (polidipsia), incremento en las ganas de orinar (poliuria) o el aumento de hambre (polifagia), o si existen factores de riesgo característico como antecedentes familiares de diabetes, obesidad, infecciones frecuentes o cualquier otra complicación relacionada con la diabetes.

2.2 Clasificación

La clasificación aceptada por los especialistas en este campo es la del Comité de expertos (14). Este comité distingue cuatro grupos principales:

Diabetes Mellitus tipo 1 (Antes diabetes mellitus dependiente de insulina o DMDI), donde ocurre la destrucción autoinmune de las células β por parte de linfocitos T, en la mayoría de los casos.

Diabetes Mellitus tipo 2 (Anteriormente conocida como no insulino dependiente o DMNID). Deficiencia relativa de insulina con resistencia a su acción en diferentes grados.

Otros tipos específicos. Grupo heterogéneo formado por alteraciones diversas.

Diabetes Mellitus Gestacional (DMG). Caracterizada por hiperglucemia en la segunda mitad del embarazo, debida a insuficiencia insulínica temporal.

2.3 Criterios para el Diagnóstico de la Diabetes Mellitus

La Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que en la actualidad hay 171 millones de pacientes diabéticos en el mundo y que este número podría duplicarse para el 2025. Eso se atribuye, además de algunos factores genéticos, al hecho de que los humanos hemos cambiado nuestro estilo de vida (19, 23).

Los criterios para el diagnóstico de diabetes mellitus fueron publicados por el comité de expertos de la organización mundial de la salud (OMS) (14), y son los siguientes:

1. Síntomas de diabetes más una glucemia casual mayor o igual a 200 mg/dL (11.1 mmol/L). Casual es definido como en cualquier momento del día sin respetar el tiempo desde la última ingesta. Los clásicos síntomas de diabetes incluyen poliuria, polidipsia, y pérdida de peso sin razón aparente.
2. Glucosa plasmática en ayuno igual o mayor a 126 mg/dL (7 mmol/L). El ayuno es definido como la no ingesta calórica de por lo menos 8 horas.
3. Glucosa plasmática a las 2 horas mayor o igual a 200 mg/dL (11,1 mmol/L) durante la prueba de tolerancia oral a la glucosa. Este test debe ser realizado como fue descrito por la OMS, usando una carga de glucosa que contenga un equivalente a 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua.

Existe un grupo intermedio de sujetos cuyo nivel de glucemia no reúne los criterios para diabetes pero es muy alto como para considerarlo normal. Este grupo se define de acuerdo a la glucemia de ayuno, en tres categorías:

1. Glucemia en ayuno normal: menor a 110 mg/dL
2. Intolerancia a la glucosa: glucemia en ayuno mayor o igual a 110 mg/dL o menor a 126 mg/dl.
3. Diagnóstico provisional de diabetes: Glucemia en ayuno mayor de 126 mg/dL. (El diagnóstico debe ser confirmado con una curva de tolerancia a la glucosa)

Las categorías correspondientes cuando se usa la prueba de tolerancia a la glucosa vía oral son los siguientes:

1. Tolerancia normal a la glucosa: cuando a las 2 horas posteriores a la carga presenta glucemia < 140 mg/dL (7,8 mmol/L)
2. Intolerancia a la glucosa: cuando a las 2 horas posteriores a la carga presenta glucemia mayor o igual 140 mg/dL (7,8 mmol/L) y menor a 200 mg/dL (11,1 mmol/L)
3. Diagnóstico de diabetes confirmado: cuando a las 2 horas posteriores a la carga presenta glucosa > 200 mg/dL (11,1 mmol/L)

2.4 MANIFESTACIONES BIOQUÍMICAS

Históricamente, la insulina se ha relacionado con el “azúcar de la sangre”, y es cierto que la insulina ejerce poderosos efectos sobre el metabolismo de los hidratos de carbono. Sin embargo, son las alteraciones del metabolismo de las grasas, que provocan trastornos como la acidosis y la arterosclerosis, las que constituyen la causa habitual de muerte del paciente diabético. En pacientes con diabetes prolongada, además se presenta disminución de la capacidad de sintetizar proteínas, emaciación de los tejidos, así como muchos trastornos funcionales celulares. Por tanto, está claro que la insulina afecta al metabolismo de los carbohidratos pero también el de grasas y proteínas.

Efecto de la insulina sobre la regulación de la glucosa

Cuando la concentración de glucosa se eleva en exceso, se secreta insulina; la insulina a su vez hace que la glucemia descienda hacia la normalidad. En condiciones normales es importante que la concentración de glucosa no se eleve en exceso por tres razones: primero, la glucosa ejerce mucha presión osmótica en el líquido extracelular, y si su concentración se eleva en exceso, puede provocar una considerable deshidratación celular. Segundo, una concentración excesiva de glucosa en la sangre hace que se pierda por la orina. Tercero, esto provoca en los riñones una diuresis osmótica, que puede causar reducción de líquidos y electrolitos del organismo.

Efecto de la insulina sobre la regulación de las grasas

Todos los aspectos de la degradación de las grasas y su utilización como fuente de energía están notablemente facilitados por la ausencia de insulina. En los triglicéridos, que son la forma habitual de almacenamiento, el efecto más importante es que la enzima lipasa sensible a hormona se activa energéticamente por la ausencia de insulina, lo que provoca hidrólisis de los triglicéridos almacenados, con lo que se liberan grandes cantidades de ácidos grasos y de glicerol a la sangre circulante. En consecuencia la concentración plasmática de ácidos grasos libres comienza a elevarse. Estos se convierten en el principal sustrato de energía utilizado por casi todos los tejidos del cuerpo a excepción del encéfalo.

El exceso de ácidos grasos en el plasma también promueve la conversión de parte de los ácidos grasos en fosfolípidos y colesterol, lo cual tiene una acción importante en acelerar el desarrollo de enfermedades vasculares (arteriosclerosis) que representa una importante complicación a largo plazo.

Efecto de la insulina sobre la regulación de las proteínas

En general la insulina tiene un efecto anabólico sobre el metabolismo proteínico, pues estimula la síntesis de proteínas y retrasa su degradación. En ausencia de esta hormona el almacenamiento de proteínas se detiene; cuando la insulina no está disponible, el catabolismo proteico aumenta, la síntesis proteica se para, y el plasma es inundado por grandes cantidades de aminoácidos y la mayor parte de este exceso se utiliza directamente para obtener energía o como sustrato para la gluconeogénesis. Esta degradación de aminoácidos también provoca un aumento de la excreción de urea por la orina.

La pérdida de proteínas resultante es uno de los efectos más graves de la diabetes mellitus. Puede determinar una extrema debilidad, así como alteración de muchas funciones de los órganos.

2.5 Epidemiología

En el mundo existen alrededor de 171 millones de diabéticos y se estima que llegarán a 370 millones en 2030. La mayoría vive en países en desarrollo y cerca del 80% de los años de vida perdidos por discapacidad a causa de la diabetes mellitus ocurre en los países pobres. Para el año 2000 se calculó que el número de pacientes diabéticos en América era de 35 millones, cifra que se incrementará a 64 millones en 2025; 52% de los pacientes diabéticos en el continente viven en América Latina y el Caribe, y esa proporción crecerá a 62% en 2025. El problema se magnifica al constatar que al menos un tercio de las personas con diabetes mellitus en América latina desconoce su condición de enfermo (18).

La situación en México es parecida al resto de los países en desarrollo en cuanto a la magnitud del problema, aunque las cifras varían de acuerdo con la fuente, el nivel de atención, la población de referencia, el tipo de diagnóstico, los criterios de clasificación, etcétera.

En la Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas (ENEC-1993) se informó una prevalencia general de 8.2% y 21% en los adultos de 60 a 69 años. La Encuesta Nacional de Salud II (ENSA-II, 1994) indicó una prevalencia de diabetes mellitus de 9% para la población mayores de 60 años, y una tasa de morbilidad percibida de diabetes de dos por cada 1000 habitantes, para ubicarse entre los principales problemas de salud reportados, ya que 2% de las personas la identificó como un problema de salud en los últimos quince días previos a la encuesta. Por otro lado, la Encuesta Nacional de Salud (ENSA-2000) registró una prevalencia general de diabetes mellitus de 7.5% en la población mayor de 20 años.

Como causa de morbilidad, la diabetes mellitus tipo 2 produjo 287 180 casos nuevos en el año 2000, ocupando el duodécimo lugar dentro de las 20 principales causas de enfermedad en el país (23).

La morbilidad por diabetes mellitus en México se elevó de 39 a 49 por cada 100 mil habitantes entre 1985 y el año 2000, y hoy ocupa los primeros lugares como causa de muerte tanto entre hombres como en mujeres, y provoca una cantidad muy importante de años de vida productiva perdidos.

En el Instituto Mexicano del Seguro Social, la diabetes mellitus fue responsable de 5% de las consultas de medicina familiar durante 2002; generó 62 745 egresos de diabéticos lo que representa 3% del total de pacientes y provocó 17 042 defunciones, equivalente a 18% del total de las defunciones en la institución. La diabetes ocupó el primer sitio como causa de muerte en las mujeres y fue responsable de 20% en este grupo, mientras que en los hombres se ubica en el segundo lugar y es responsable del 15% de las defunciones.

2.6 Patogenia de la Diabetes Mellitus Tipo 1

Se define a un paciente con diabetes mellitus tipo uno, cuando la mayoría de las células β se encuentran destruidas; aunque se desconocen bien los detalles, este fenómeno se atribuye a procesos autoinmunitarios (16).

El desarrollo de este tipo de diabetes mellitus se distingue principalmente por cinco eventos: los dos primeros son la susceptibilidad genética a la enfermedad y el factor ambiental (47), otro de los eventos es la respuesta inflamatoria del páncreas (insulinitis), con infiltración de los islotes de Langerhans con monocitos, macrófagos y linfocitos T activados. El cuarto evento, es la alteración de la superficie de la célula β por lo que el sistema inmune ya no la reconoce como propia, lo que genera una respuesta inmunitaria provocando la aparición de anticuerpos citotóxicos. El último evento es la destrucción de la célula β y la aparición de diabetes mellitus (16,20).

2.7 Patógenia de la Diabetes Mellitus Tipo 2

Anteriormente conocida como no insulino dependiente (DMNID), es la forma más común de esta enfermedad, ya que la presentan el 95% de los pacientes con diabetes, se caracteriza por presentarse en personas adultas, con obesidad e hipertensión arterial esencial. Clínicamente presenta los siguientes rasgos: alta frecuencia familiar y aparición clínica relativamente tardía (15). En la DM tipo 2 aun no es posible proponer un esquema unitario que considere todos los hechos conocidos para explicar el desarrollo de la enfermedad.

Los dos hechos fisiopatológicos en este tipo de diabetes se integran en una sola hipótesis, aun cuando sigue sin dilucidarse si aparece primero la resistencia a la insulina o la insuficiencia de su secreción pancreática. La hipótesis predominante sostiene que primero aparece la resistencia a la insulina, tal vez con mediación genética, y que varios de los estados de resistencia a la insulina, como la obesidad y la hipertensión arterial esencial son factores prediabéticos, en los que la hipersecreción pancreática compensa la resistencia a la insulina. Cuando la reserva “pancreática” comienza a agotarse aparece la intolerancia a la glucosa, y cuando las células insulares se vuelven del todo incapaces de satisfacer esta demanda aumentada de insulina aparece la hiperglucemia en ayunas y la diabetes franca (15,16).

2.8 Manifestaciones Clínicas

Los primeros síntomas de la diabetes se relacionan con los efectos directos de la alta concentración de glucosa en sangre. Cuando este valor aumenta por encima de los 160 a 180mg/dL, la glucosa pasa a la orina. Si el valor es aún más alto, los riñones secretan una cantidad adicional de agua para diluir las grandes cantidades de glucosa eliminada. Dado que producen orina excesiva, se eliminan mayores volúmenes de orina (poliuria) y, en consecuencia, aparece una sensación anormal de sed (polidipsia). Asimismo, debido a la incapacidad de la glucosa para entrar a las células, se produce una pérdida de peso y, a modo de compensación, la persona siente a menudo hambre exagerada (polifagia) aunado a otros síntomas que comprenden visión borrosa, somnolencia, náuseas y una disminución de la resistencia durante el ejercicio físico (16,17).

La diabetes mellitus tipo 1 suele comenzar antes de los 40 años, los síntomas se inician de forma súbita, con poliuria, polidipsia, polifagia y pérdida de peso que se desarrolla a lo largo de varios días. La insulina plasmática esta disminuida o ausente y los niveles de glucagón pueden ser elevados pero disminuibles por la administración de insulina (15,16).

La diabetes mellitus tipo 2 se inicia en edades avanzadas o intermedias, generalmente el paciente es obeso y los síntomas pueden no manifestarse durante años o décadas. Cuando la deficiencia insulínica progresa, los síntomas comienzan a manifestarse. Al principio, el aumento de la micción y de la sed son moderados, aunque empeoran gradualmente con el transcurso del tiempo. La cetoacidosis es una afección rara, sin embargo las descompensaciones suelen evolucionar hacia un síndrome de coma no cétosico hiperosmolar (15,16).

2.9 Tratamiento

El objetivo principal del tratamiento de la diabetes es mantener los valores de azúcar en la sangre dentro de los valores normales tanto como sea posible (16).

Existen algunos métodos que pueden llegar a prevenir, la diabetes mellitus ya que hay varios factores asociados con el estilo de vida que modifican de manera importante el riesgo: dieta sana, la cual debe ser balanceada y variada, con porciones pequeñas para favorecer la pérdida de peso y, en la medida de lo posible deben evitar periodos largos de ayuno, ya que estos disminuyen el metabolismo y favorecen la resistencia a la insulina. También es recomendable hacer ejercicio diariamente por lo menos 30 minutos al día, y dejar de fumar.

En la actualidad se cuenta con una gran variedad de medicamentos para controlar los niveles de glucosa en la sangre, estos son: agentes antidiabéticos orales: sulfonilureas, biguanidas, repaglinida, nateglinida, inhibidores de la α -glucosidasa, tiazolidinedionas y las presentaciones combinadas de sulfolinorea/biguanida. Su empleo es necesario cuando la dieta y el ejercicio no son suficientes para alcanzar las metas del tratamiento. El uso de insulina, se requiere para la sobrevivencia de los pacientes con diabetes mellitus tipo 1, ya que tienen una deficiencia absoluta de secreción de esta hormona (16).

2.10 Complicaciones Agudas

Dentro de las complicaciones agudas se encuentran principalmente la cetoacidosis diabética y el síndrome hiperosmolar no cétosico. La primera es una complicación de la diabetes mellitus tipo 1 y la segunda suele ocurrir en la diabetes tipo 2.

La cetoacidosis diabética. Es provocada por la hiperglucemia debido a la ausencia casi absoluta de insulina así como por el incremento de la producción de glucosa en el hígado vía la gluconeogénesis y la glucogenólisis. Durante la cetoacidosis diabética también se producen hipercetonemia, acidosis metabólica y alteraciones hidroeléctricas.

Coma hiperosmolar. El coma diabético no cetósico suele ser una complicación de la diabetes mellitus tipo 2, se trata de un síndrome de deshidratación profunda provocado por la diuresis hiperglucémica mantenida en condiciones en las que el paciente no es capaz de beber suficiente agua para afrontar las pérdidas de líquido por orina.

2.11 Complicaciones Tardías

A medida de que el trastorno se desarrolla, las concentraciones elevadas de azúcar en la sangre lesionan los vasos sanguíneos, los nervios y otras estructuras internas. Sustancias complejas derivadas del azúcar se acumulan en las paredes de los pequeños vasos sanguíneos, provocando su engrosamiento y rotura. Este aumento de grosor es la causa de que los vasos sanguíneos aporten cada vez menos sangre, sobre todo a la piel y a los nervios. La disminución de la circulación sanguínea, tanto por los vasos grandes como por los pequeños, puede provocar alteraciones fisiológicas en el corazón, el cerebro, las piernas, los ojos, los riñones, los nervios y la piel y además en la curación de las lesiones (18).

Estas complicaciones pueden ser desencadenadas por la acción de lipoproteínas de baja densidad oxidada, enzimas responsables de oxidar a las (LDL), provocando una acción aterogénica. La diabetes mellitus acelera este proceso de oxidación en algunas especies como los animales que se utilizan para la experimentación.

2.12 Tratamientos experimentales

La herbolaria es un recurso natural con el que cuenta el hombre para combatir la diabetes mellitus, ya que puede ser un tratamiento viable y económico para tratar esta. Hasta la fecha se habla de que existen más de 100 especies vegetales utilizadas popularmente para tal enfermedad. El inconveniente de este tipo de tratamientos es que carece de apoyo experimental, sin embargo, tal vez en un futuro pueda llegar a ser una alternativa eficaz contra la diabetes mellitus.

Sin embargo la búsqueda de curación de la diabetes, continúa siendo un desafío para la medicina. En los últimos 30 años, el trasplante de páncreas (TP) ha intentado ofrecer una respuesta a estos problemas con resultados no satisfactorios totalmente (22).

El trasplante de páncreas, ya sea total o segmentos de éste, ha curado la diabetes de algunos pacientes, aunque suele realizarse únicamente cuando se precisa el trasplante renal. Si se transplanta simultáneamente un riñón, es necesario un tratamiento inmunosupresor y el páncreas resulta protegido. La duda está en si el mejor control obtenido merece correr el riesgo de inmunosupresión, cuando se transplanta sólo el páncreas (31).

Existe, por tanto, la necesidad de ofrecer alguna alternativa menos restrictiva y sin estas potenciales complicaciones. Y esa alternativa la puede ofrecer el trasplante de los islotes pancreáticos aislados (28,29).

Hasta el año 2000, el trasplante de islotes se realizaba exclusivamente a pacientes diabéticos tipo 1 con insuficiencia renal avanzada. En esas condiciones podía realizarse un trasplante de páncreas (órgano) con sus inconvenientes quirúrgicos y de morbilidad, o uno de islotes con mínima cirugía. A partir de ese año, la situación se vio radicalmente modificada cuando investigadores de la Universidad de Alberta, en Edmonton, Canadá, comenzaron a utilizar un nuevo método para el trasplante de islotes en los diabéticos tipo 1, el ya popularmente denominado protocolo de Edmonton (23).

Con el desarrollo del protocolo Edmonton los científicos han comprobado que se ha conseguido que el 100% de los pacientes diabéticos tipo 1 trasplantados alcance de forma mantenida la independencia de la insulina. El protocolo de Edmonton utiliza enzimas especializadas para extraer los islotes del páncreas del donante muerto (23).

El principal problema de este tipo de tratamientos es que el número de pacientes con diabetes mellitus tipo 1 es mucho mayor al número de donantes, es por ello que en la actualidad se busquen fuentes alternativas de células pancreáticas productoras de insulina.

Una línea promisoriosa es encabezada por el xenotrasplante, mediante inmunomodulación, partiendo de células de islote de páncreas fetal de cerdo. La hipótesis no es la sustitución funcional mediante producción de insulina, sino la estimulación del crecimiento de las células nativas por impulso de un factor estimulante que estaría presente en los islotes fetales (29). El gran problema que plantea esta fuente de células es la posible infección cruzada entre especies que se puede producir por retrovirus porcinos endógenos, es decir, material genético de partículas virales que está integrado en el ADN del cerdo.

Otra alternativa es el páncreas artificial, una combinación de un detector continuo de la glucosa y una bomba de insulina. La bomba suministra insulina dependiendo de las detecciones del sensor. Los prototipos se encuentran en diferentes fases de desarrollo; los primeros sistemas ya se están evaluando en ensayos clínicos. El objetivo de estos esfuerzos de desarrollo es reducir o eliminar por completo la intervención humana en el tratamiento de la diabetes, y lograr un control estricto de la glucemia. Las limitantes a esta alternativa son principalmente la falla mecánica y el rechazo inmunológico (27).

También las células beta están siendo transplantadas. Algunas técnicas usadas para esto incluyen la inyección de las células beta para que se alojen en el hígado, o colocarlas en una burbuja o tubo para protegerlas del rechazo inmunológico. El objetivo final es desarrollar un “envase” que no permita que entren glóbulos blancos para destruir las células, pero que permita la salida de insulina producida por las células beta.

Se está estudiando la posibilidad de usar manipulación genética para convertir células no pancreáticas en células pancreáticas. La más común es la transferencia del gen de la insulina al hígado utilizando un fragmento genético que regule la producción de la hormona en respuesta a la glucosa. Otra manera de intentar tratar esta enfermedad es mediante la introducción de genes en las células del hígado que induzcan que estas células pierdan sus características como tales células del hígado para adquirir propiedades de células de los islotes, productoras de insulina, pero con las características propias de la célula β , lo que implica una óptima capacidad de regulación de la producción de insulina y en

consecuencia, de la regulación metabólica de la glucosa en sangre. Este objetivo es planteado por investigadores del Baylor College of Medicine en Texas U.S.A. su estrategia consiste en la introducción de dos genes *Neurod* y *Btc*, los cuales provocan la transformación que induce la neogénesis de islotes, produciéndose insulina y el resto de las hormonas que se producen en esta estructura pancreática, como son glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático. Además, una proteína considerada un elemento esencial del sistema sensor de glucosa tanto de la célula beta como en el hígado, que es la glucokinasa, modificó sus características propias del hígado y adquirió las de la célula beta, mediante un complejo sistema que implica la expresión de diferentes regiones de su gen (27).

La electrofusión celular es otra técnica que se utiliza para el estudio del trasplante celular obteniendo como resultado una célula híbrida que tenga dos orígenes distintos, que tenga la capacidad de secretar insulina y no sea desconocida por el sistema inmunológico (33,34).

Los trabajos más destacados de esta índole utilizando células β electrofusionadas con líneas celulares tumorales, donde se observa la capacidad secretoria de los híbridos obtenidos. En la última década se realizaron estudios para obtener los parámetros de electrofusión de células β con células dérmicas, obteniendo híbridos que contengan la capacidad de secretar insulina y una alta tasa de proliferación como la de las células dérmicas (33,34).

3 LA FUSIÓN CELULAR.

Una célula híbrida es el producto de la recombinación genética de dos células de diferentes progenitores u orígenes, que manifiesta algunas características morfológicas y fisiológicas de ambas (27,30). En la naturaleza ocurre normalmente la fusión celular, principalmente en procesos reproductivos y entre las membranas adyacentes de diversos tejidos en los organismos. Pero también puede inducirse de manera experimental (27). 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 (31).

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

- a) virus Sendai, el cual permite la mezcla azarosa de membranas cercanas, creando micro-vesículas entre ellas, en varios puntos de interacción.
- b) altas concentraciones de iones, que modifican drásticamente la polaridad de la membrana y su permeabilidad.
- c) agentes aglutinantes como la lisolecitina, o el polietilenglicol.
- d) electrofusión: 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 debido a la formación de dipolos en sus membranas, formando cadenas o “rosarios” de acuerdo al gradiente de corriente. La agregación también se puede lograr por micromanipulación, centrifugación o por cultivos en confluencia. 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.

Esta última presenta las mayores ventajas debido a su alto rendimiento de hibridación, facilidad y mínima manipulación de las células, lo que disminuye importantemente 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.

Los diferentes productos que se obtienen de la electrofusión son: células homodicariontes proveniente de la fusión de dos células del mismo origen, policariontes, de tres o más células fusionadas de origen variado y heterodicariontes, provenientes de la fusión de células de diferente origen (21,31,32); estas últimas tienen una gran importancia para la biomedicina, ya que se utilizan para estudios de potenciales y dinámica de membranas, receptores, transmisores, influencia hormonal, canales iónicos e intercambio de electrolitos. En condiciones óptimas de cultivo, los citoplasmas fusionados se reorganizan y reúnen a los diferentes núcleos para realizar la recombinación y/o la eliminación de algunos cromosomas (45,46,38).

Los parámetros que influyen en el rendimiento de la electrofusión celular son:

- 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 corriente directa;
- 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.

Un procedimiento desarrollado por nuestro grupo, consiste en ajustar las concentraciones celulares a fusionar en órdenes mínimos de 1×10^5 céls/mL y mezclarlas en relación 1:1 en estas condiciones se induce el fenómeno de dielectroforesis con corriente alterna (CA) de baja intensidad y de alta frecuencia, en el rango de radiofrecuencia (RF), de entre 5 y 15 segundos de duración. Acto seguido se aplica un pulso de corriente directa (CD), ya sea de decaimiento exponencial o cuadrado, en el orden de μ seg a mseg, dependiendo de la intensidad, y se restaura la CA durante un minuto, para mantener unidas y estabilizar las membranas fusionadas. 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 (21,33,34).

4 ANTECEDENTES

Los trabajos con células β pancreáticas han sido realizados fundamentalmente con fines de electroporación, sin embargo, se ha realizado electrofusión de células β con líneas celulares tumorales para estudios de función desde la década pasada.

Entre los estudios más destacables están los de Hamid y McClenaghan, sobre las propiedades secretorias de las líneas híbridas obtenidas. El mismo grupo ha estudiado el cultivo de dichas líneas en diferentes medios de cultivo, su comportamiento y sus características bioquímicas y fisiológicas. Rasschaert y McClenaghan han demostrado las características metabólicas de la línea BRINBD 11 obtenida por electrofusión. En 2001 Davies y Abdel-Wahab presentaron los resultados del comportamiento secretor de dicha línea celular después de implantarla 28 días en ratones diabéticos y haciendo el seguimiento de las propiedades de almacenamiento y secreción de insulina en éstas células al resembrarlas; encontrando que la línea celular mejora sustancialmente el almacenamiento y la secreción después de haber permanecido en el animal 28 días.

Barrera *et-al*, determinaron los parámetros de electrofusión para células pancreáticas insulares (31). Posteriormente realizaron el trasplante de la línea celular en conejos

estudiando el cuadro clínico por 18 meses, obteniendo buenos resultados en el control del cuadro diabético aunque no la regresión total (59).

Posteriormente Barrera *et-al*, establecieron los parámetros de electrofusión para células insulares pancreáticas y células dérmicas (31). Para el 2005 trabajaron con el trasplante de estas células en ratas diabéticas, donde demostraron que el trasplante realizado no tuvo problemas de rechazo inmunológico, y los parámetros clínicos y bioquímicos mostraron una mejoría considerable (20,32).

En la misma investigación se adaptó la técnica del ensayo hemolítico inverso (30,33-39), la cual es una técnica desarrollada originalmente para detectar secreción de anticuerpos en linfocitos y posteriormente modificada para adenohipofisis y para insulina (30,31). Mediante este procedimiento se puede identificar una célula en una población mixta por sus secreciones, se basa en la hemólisis mediada por complemento en presencia de complejos antígeno-anticuerpo y se le denomina inverso porque la célula de interés aporta los antígenos. Donde, (con esta técnica) se demostró la secreción de insulina de las células híbridas (21,32).

5 JUSTIFICACIÓN

A principios del siglo XIX destaca la emergencia de la diabetes mellitus como el prototipo de las enfermedades crónicas ligadas al proceso de envejecimiento de la población, al incremento de la obesidad y a la adopción de nuevos patrones de comportamiento, como los cambios en la dieta y la reducción de la actividad física (23).

La diabetes mellitus es una de las enfermedades con mayor morbilidad y mortalidad en el mundo. En México la cifra ha alcanzado al 7.5 % de la población en general y a 3.6 millones de la población económicamente activa, o sea la población entre los 20 y los 60 años de edad. En la actualidad, la diabetes mellitus como causa de muerte se encuentra en tercer lugar después de las enfermedades cardiovasculares y oncológicas.

Debido a que no existe cura para este conjunto de enfermedades metabólicas, existen algunas opciones para controlarla, como dieta, ejercicios, administración de insulina exógena, hipoglucemiantes orales, y los trasplantes, ya sea de páncreas artificial, de la glándula completa, así como de islotes o células β aisladas. Pero estas opciones no han tenido éxito debido al rechazo inmunológico. Una alternativa podría ser el trasplante de una colonia de células híbridas productoras de insulina, resultantes de la fusión de células pancreáticas de un donador sano con células de rápido crecimiento como las dérmicas del receptor.

Ya que el trasplante de células insulares pancreáticas electrofusionadas con células dérmicas mostró una mejoría notable en el cuadro clínico, podría llegar a ser una alternativa viable para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 1. Sin embargo es necesario seguir experimentando con estos trasplantes, para buscar una mejor vía de administración de células híbridas que faciliten el establecimiento de una posible colonia secretora de insulina. Esta podría ser por vía hemática, lo que permitiría que las células ubiquen el mejor nicho para su desarrollo y función.

6. HIPOTESIS

El trasplante de las células híbridas ha demostrado resultados satisfactorios en los trabajos antes realizados, reduciendo el problema del rechazo inmunológico y mejorando notablemente el cuadro clínico de los organismos. Con objeto de buscar una mejoría del desempeño del trasplante y evitar el rechazo inmunológico, es deseable averiguar si la vía hemática facilita a los híbridos trasplantados encontrar un mejor nicho que permita un adecuado desempeño del trasplante.

7 OBJETIVOS

7.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el cuadro clínico y parámetros bioquímicos de los sujetos trasplantados por vía hemática, de células insulares pancreáticas de un donador sano, electrofusionadas con células dérmicas de un receptor diabético, en éste último.

7.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar si las células híbridas, producto de la fusión de células insulares de un donador y células dérmicas del receptor son capaces de permanecer en el organismo, después de ser trasplantadas.
2. Confirmar si las células trasplantadas conservan su función generadora de insulina.
3. Comprobar si el cuadro clínico producido por la diabetes mellitus puede ser revertido por el trasplante de células híbridas.
4. Valorar si los principales parámetros bioquímicos alterados con diabetes mellitus inducida, pueden ser normalizados con el trasplante.
5. Evaluar la eficiencia del trasplante por vía hemática.

8 MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Sujetos experimentales

Se utilizaron 16 ratas macho de la especie *Ratus norvergicus* cepa *Wistar* (250-300 g) proporcionadas por el bioterio de las FES Iztacala UNAM, las cuales se distribuyeron en cuatro grupos de cuatro ratas cada uno:

- Grupo 1. Animales sanos (control sano).
- Grupo 2. Animales diabetizados sin tratamiento (control diabético).
- Grupo 3. Ratas diabetizadas receptoras de transplante, con extracción de células dérmicas, las cuales fueron mezcladas con células insulares pancreáticas de un donador sano (transplante sin fusión).
- Grupo 4. Ratas diabetizadas receptoras de transplante, con extracción de células dérmicas, las cuales fueron electrofusionadas con células pancreáticas insulares de un donador sano (transplante con fusión).

Al inicio del tratamiento (tiempo 0), a los 4 grupos les fue evaluado el cuadro clínico y pruebas de laboratorio para determinar su estado clínico. Una vez comprobada la ausencia de enfermedad, se indujo diabetes a los animales pertenecientes a los grupos 2, 3 y 4, aplicando alloxana (150mg/Kg, en solución salina fisiológica, i.p.), por vía peritoneal (40). Después de la inducción de diabetes, las ratas fueron evaluadas clínicamente de nuevo, así como los parámetros de laboratorio, estableciendo el diagnóstico de diabetes mellitus.

8.2 Obtención de células dérmicas

Los grupos receptores de trasplante celular (3 y 4), fueron sometidos a la extracción de células dérmicas.

Los animales fueron anestesiados previamente con pentobarbital sódico (0.5 mL/Kg i.p.). Posteriormente se extrajo un fragmento de piel en ojal de 3x2 cm, de la región interescapular, separando cuidadosamente el tejido celular subcutáneo. Los fragmentos extraídos se depositaron en una solución fría de tripsina al 0.25% a 4°C por 24 hrs, transcurrido este tiempo, la tripsina fue activada a 37°C durante 20 minutos, para después desprender las células por raspado de la dermis con una hoja de bisturí esteril. Las células obtenidas se lavaron tres veces en solución balanceada de sales Hank's (HBSS) esteril, para eliminar los residuos de tripsina y finalmente se determinó el rendimiento en cámara de Neubauer y viabilidad por exclusión de azul tripano (21,31,32).

8.3 Obtención de células insulares

La obtención de islotes se realizó por medio de la técnica de Lacy-Kostianovski, modificada por Hiriart y Ramírez-Medeles (21,31,32,37).

El páncreas se extrajo de donadores sanos, que fueron anestesiados con pentobarbital sódico (0.5 mL/Kg i.p.). Posteriormente se realizó una incisión abdominal en "V" desde el hipogastrio hasta el borde costal, se identificó el conducto pancreático, se pinzó el duodeno ocluyendo su desembocadura, a través de éste conducto se inyectaron 10 mL de HBSS frío, con el fin de romper el tejido acinar e identificar el páncreas, el cual se disectó cuidadosamente. Una vez que se extrajo el páncreas se corto en pequeños fragmentos, que fueron incluidos en una solución de colagenasa tipo P fracción IV (Roche) en HBSS (3 mg/mL), se mantuvo en agitación constante durante 7 minutos. Ya concluida la digestión se realizaron tres lavados en frío con solución HBSS, para eliminar la colagenasa. Al terminar los lavados, el contenido se vació en cajas Petri. La colecta de los islotes pancreáticos se llevó a cabo con ayuda de un microscopio estereoscópico, en campo estéril.

Los islotes de Langerhans fueron disgregados en una solución de tripsina (2.5 mg/mL) a 37° C durante tres minutos. El rendimiento se determinó en cámara de Neubauer y la viabilidad por exclusión de azul tripano.

8.4 Electrofusión

Ambos grupos celulares fueron ajustados a una concentración de 300, 000 cel/mL en amortiguador de PACE. Las células de una y otra estirpe se mezclaron en proporción 1:1 v/v y se depositaron 0.3 mL de esta mezcla en la cámara de electrofusión.

La electrofusión se realizó con equipo construido con el diseño de Watts modificado por nuestro grupo de investigación y construido en el taller de Equipo y Laboratorio para la enseñanza (TELE) de la UNAM campus Iztacala, por el Biol. José Martínez

La dielectroforesis se realizó generando un campo eléctrico con un pulso de corriente alterna (CA) de tipo sinusoidal en el rango de radiofrecuencia (RF) de 0.5 MHz. de 10 V. RMS (generador Farnell, mod. Sgi 0.1-100 MHz) de 20 seg. de duración. La electrofusión se realizó con un pulso de corriente directa (CD) de 300 V de decaimiento exponencial con una duración de 1 ms. (Fuente de poder TELE 0.0-50 Amperes; 0-500 V de CD). Se permitió un periodo posterior de recuperación de 60 s. en las condiciones de dielectroforesis (21,31,32). El rendimiento de fusión se determinó en cámara de Neubauer por la cuenta de células binucleadas. Las células que contenían más de dos núcleos fueron consideradas polinucleadas y cada tipo de células fue separada de las otras por medio de un gradiente de albúmina sérica de bovino en HBSS conservando solamente las células binucleadas. La viabilidad se determinó por exclusión de azul tripano.

8.5 Trasplante de Células Electrofusionadas.

Los animales de los grupos 3 y 4 fueron anestesiados con pentobarbital sódico (0.5 mL/Kg i.p.), para realizar el trasplante vía hématica por inyección intracardiaca.

Para el grupo 3 el trasplante se realizó con la mezcla de las dos estirpes celulares, en proporción 1:1 (7.0×10^4). En el caso del grupo 4 la combinación de las células fue sometida a la fusión celular, obteniendo 7.5×10^3 híbridos heterodicariontes, para el trasplante.

Para el grupo 4 el número de células híbridas transplantado fue 10 veces menor que para el grupo 3. Esto debido al resultado de la fusión celular.

8.6 Parámetros Clínicos y Bioquímicos

La sangre para la determinación de los parámetros bioquímicos se obtuvo al tiempo 0, a los 15, 30, y 45 días, por corte de la cola. Las ratas de cada uno de los cuatro grupos fueron sometidas a observación durante 45 días para evaluar su evolución clínica.

Parámetros Clínicos:

Estado general diario y cada 15 días diuresis, ingesta de alimento y agua en 24 h y curva ponderal.

Determinaciones bioquímicas:

La glucosa, colesterol, triglicéridos y creatinina, se determinaron con reactivos (SERA PAK PLUS BAYER), la urea con un kit (SPINREACT urea-37). Los cuales permiten cuantificar la concentración de las sustancias mediante el método enzimático colorimétrico ya que oxidan las moléculas y las cambian de color que absorbe entre 495-550 nm La lectura de estos análisis fue realizada con un espectrofotómetro Tuner sp-850. La

concentración de insulina ELISA DSL10-1600), fue determinada por el método de Test inmunoenzimático.
(Active insulina).

8.7 Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados por una prueba de varianza de un factor (parámetro y tiempo, cada 15 días). A las variables con significancia estadística se les aplicó una comparación de medias de LSD (Fisher), con el propósito de determinar qué nivel de factor grupo tuvo mayor significancia ($p < 0.05$).

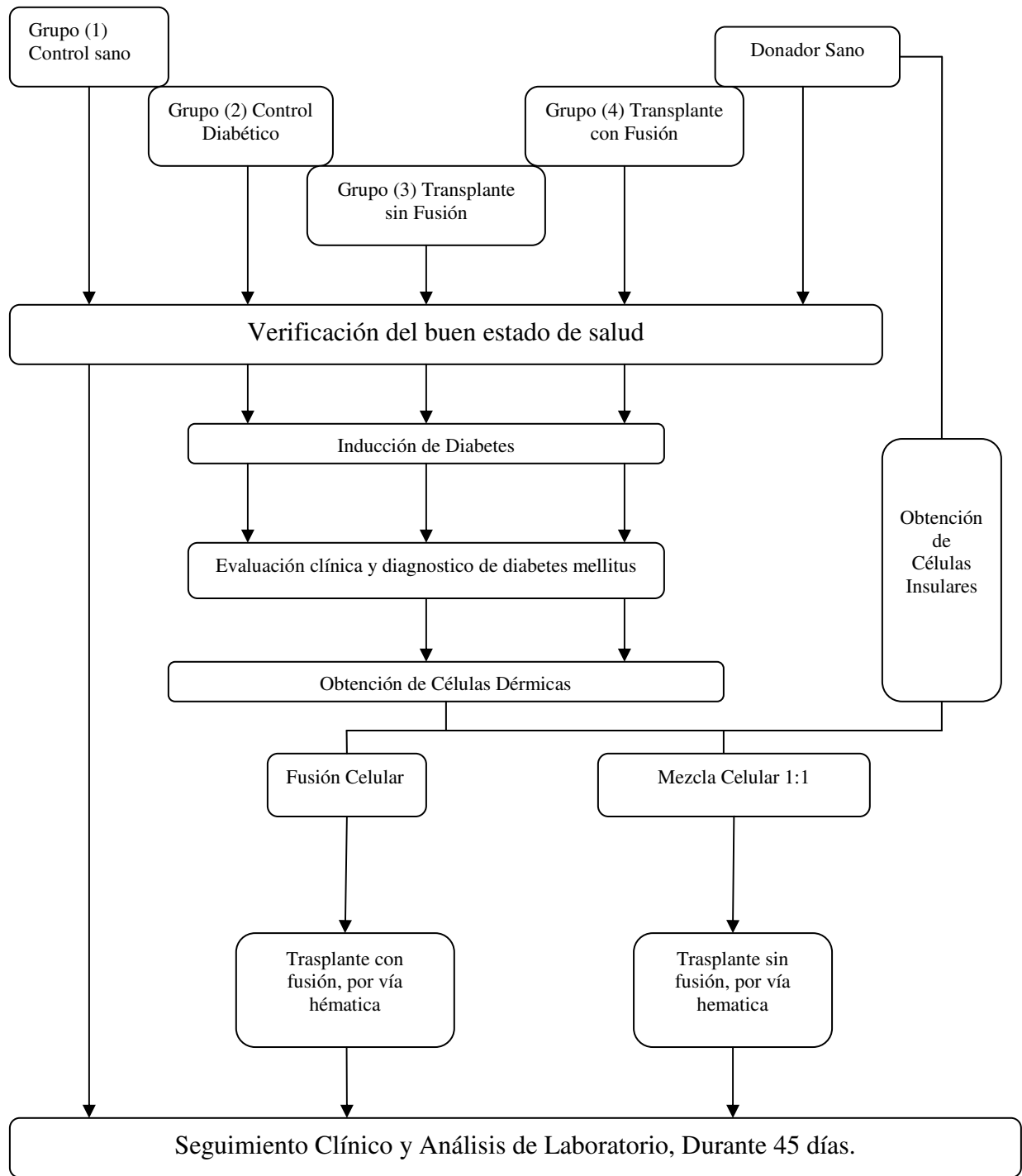


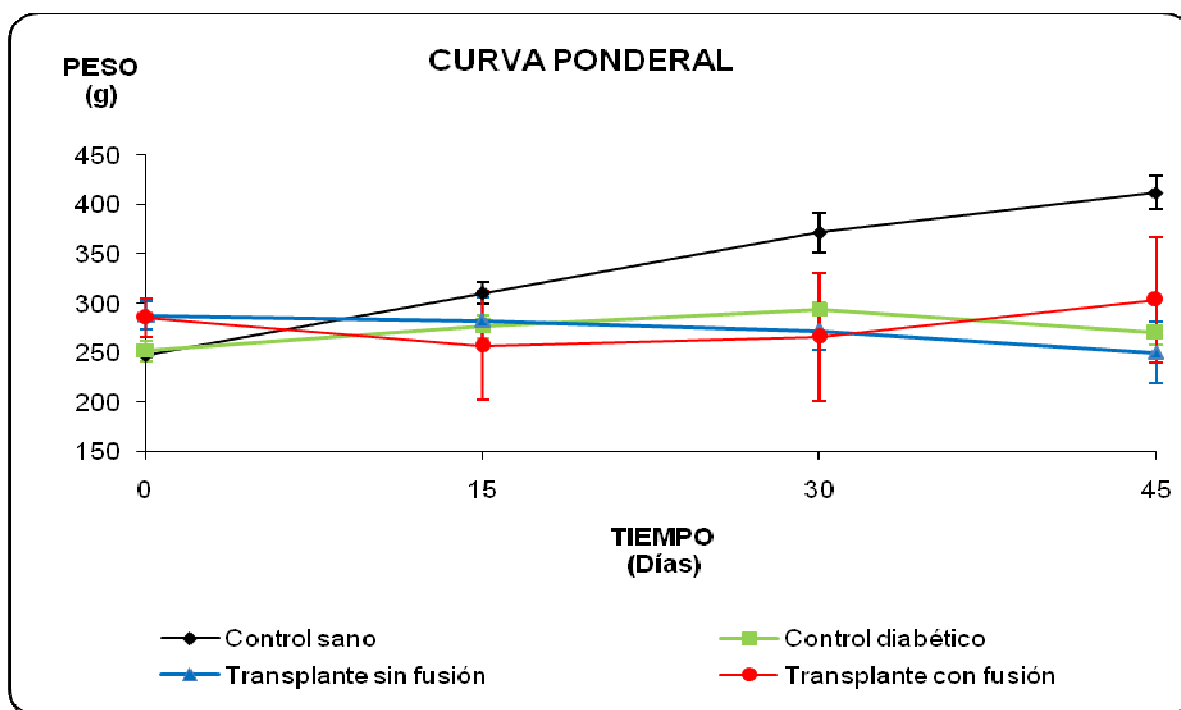
Figura 4. Diagrama del procedimiento experimental para el trasplante de células insulares pancreáticas y dérmicas electrofusionadas en ratas diabéticas

9 RESULTADOS

9.1 PARÁMETROS CLÍNICOS

PESO CORPORAL

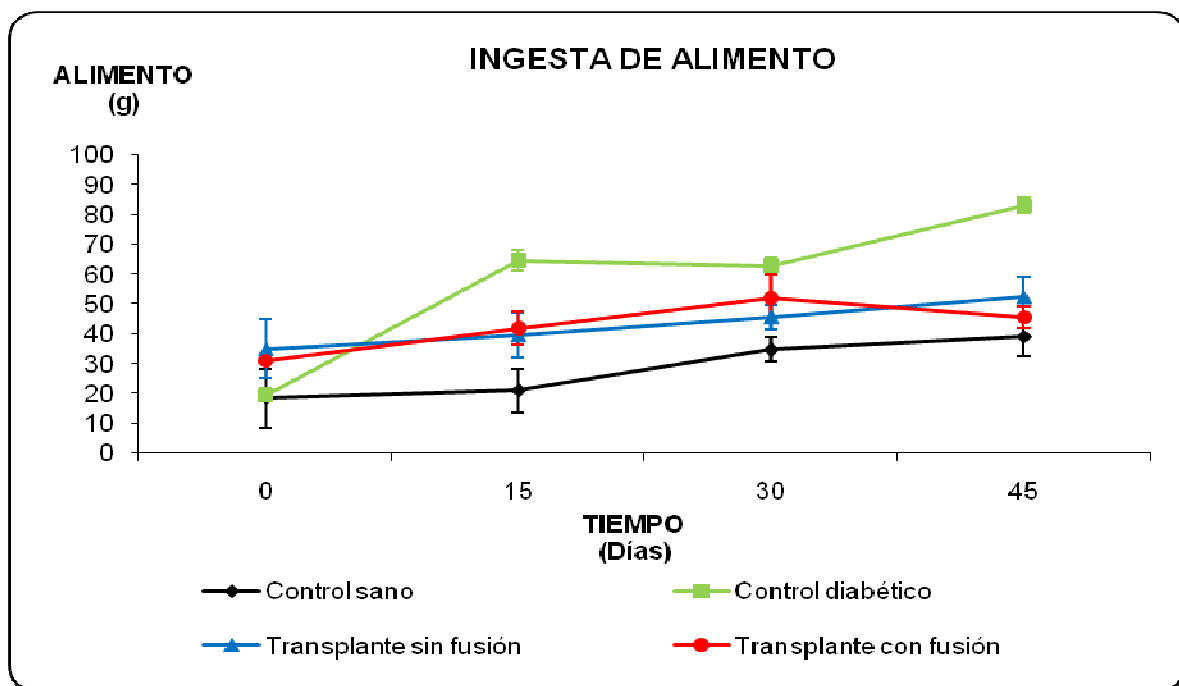
En la gráfica 1 se presentan las curvas ponderales de los cuatro grupos de ratas durante 45 días de experimento, en ellas se aprecia que los animales del grupo control sanos muestran una tendencia a aumentar de peso de acuerdo a su crecimiento y desarrollo natural, puesto que se observó un aumento del 25% cada 15 días, desde el día 0 hasta el día 45. Los animales de los grupos control diabético y transplante sin fusión no presentaron el incremento de los animales control sano, inclusive en el grupo de animales del grupo transplante sin fusión se observó un decremento del 13% al finalizar el ensayo, aun cuando no se aprecia diferencia estadística ($p > 0.05$) entre estos dos grupos, pero sí la hay comparándolos con el grupo control sano. Por otra parte los animales diabéticos que recibieron el transplante de células híbridas con una concentración 10 veces menor, durante los primeros treinta días, mostraron una disminución del peso corporal, no obstante este comportamiento, al finalizar el experimento (día 45) el incremento en la curva ponderal alcanzó los niveles encontrados al inicio del experimento (diferencia no significativa). A pesar de que al grupo 4 se le transplantó una concentración celular 10 veces menor al grupo tres, su recuperación es apreciable, en comparación al grupo 3.



Gráfica 1. Curva ponderal de los grupos experimentales (transplante de células (β -pancreáticas x Dérmicas mezcladas o fusionadas) y sus respectivos controles (Sano y diabético) a los 0, 15, 30 y 45 días. Valores promedio +/- desviación estándar; n = 5.

INGESTA DE ALIMENTO

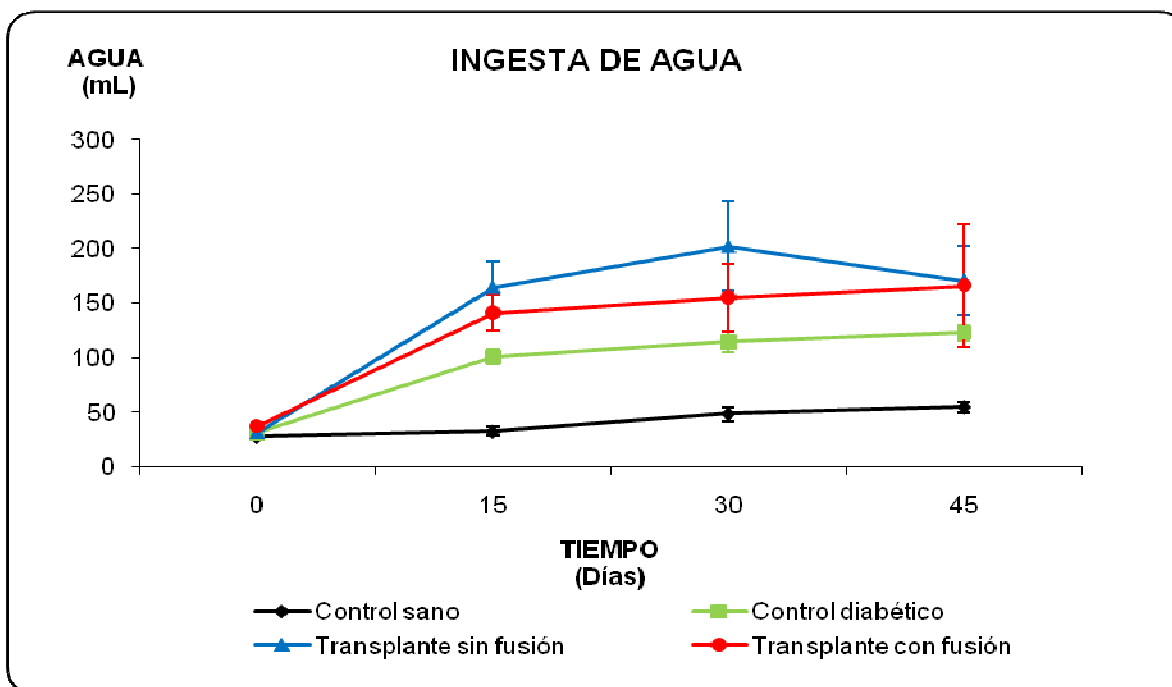
En la grafica 2 se muestra la ingesta de alimento durante 24 horas, medida cada 15 días, en los 4 grupos de animales. Los animales del grupo control sano presentan un consumo constante, que corresponde a su desarrollo, desde el día 0 hasta el día 45, mostrando diferencias significativas, con el grupo control diabético ($p < 0.05$) donde la ingesta de alimento aumenta desde el día 15 hasta finalizar el tratamiento presentando un consumo del 100% (83 g) más alto respecto al grupo control. Los grupos con transplante sin fusión y transplante con fusión muestran un incremento menor (20% aprox.) y no se aprecian diferencias significativas entre ellos ($p > 0.05$), pero si con los grupos control sano y control diabético, ya que sus valores se encuentran entre ambos.



Gráfica 2. Ingesta de alimento durante 24 horas de los grupos experimentales (transplante de células (β -pancreáticas x Dérmicas mezcladas o fusionadas) y sus respectivos controles (Sano y diabético) a los 0, 15, 30 y 45 días. Valores promedio +/- desviación estándar; n = 5.

INGESTA DE AGUA

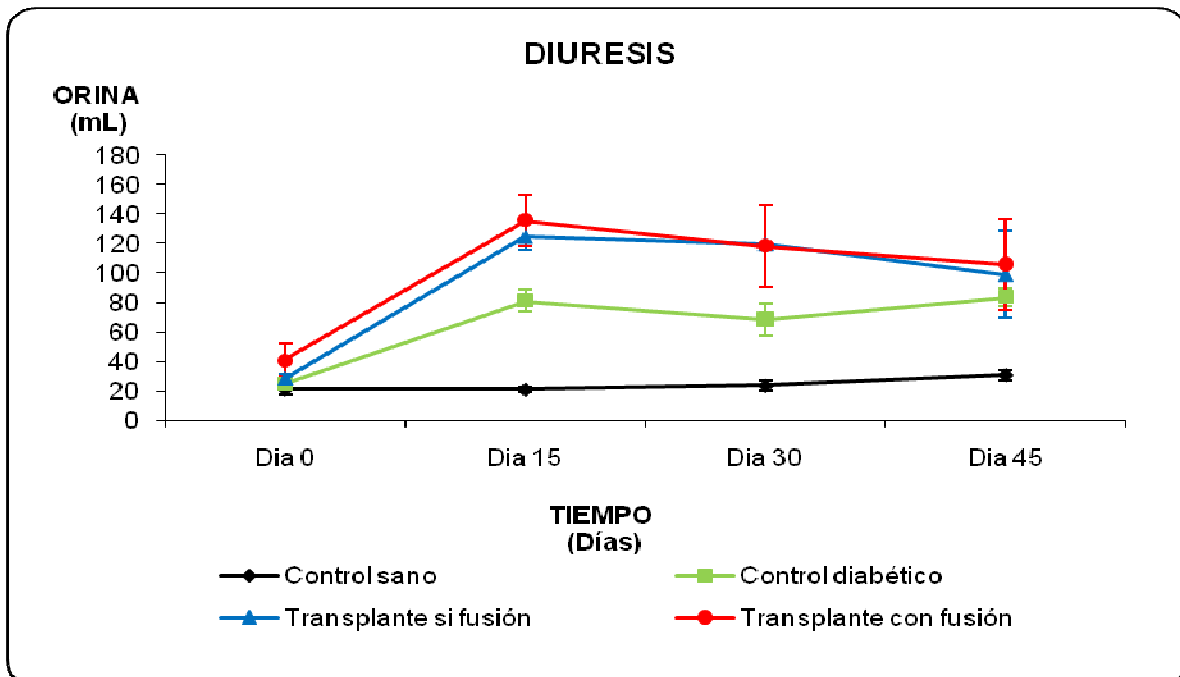
En la grafica 3 se presenta la ingesta de agua durante 24 horas medidas cada 15 días, en los 4 grupos de animales. Se puede observar que los animales transplantados con mezcla celular y con los híbridos, así como el control diabético presentan una polidipsia muy marcada a lo largo de todo el tratamiento, conservando esta tendencia hasta finalizar el ensayo, observando diferencias estadísticas entre ellos ($p < 0.05$), solamente en el día 15. Se observa la ingesta de agua normal en el grupo control sano a lo largo del ensayo mostrando diferencia estadística con los otros tres grupos. ($p < 0.05$).



Gráfica 3. Ingesta de agua durante 24 horas de los grupos experimentales (transplante de células (β -pancreáticas x Dérmicas mezcladas o fusionadas) y sus respectivos controles (Sano y diabético) a los 0, 15, 30 y 45 días. Valores promedio \pm desviación estándar; $n = 5$.

DIURESIS

En la grafica 4 se presenta la diuresis, durante 24 horas por un periodo de 45 días, en los 4 grupos de animales. Los grupos que presentaron un comportamiento similar, sin diferencias estadísticas ($p > 0.05$), a lo largo del ensayo, fueron el que recibió el transplante sin fusión y los que recibieron el transplante con fusión, sin embargo ambos grupos tienden a bajar sus valores para el día 45. Mientras que los animales diabéticos sin tratamiento mantuvieron sus valores altos durante todo el ensayo. Los tres grupos anteriores mostraron diferencia estadística ($p < 0.05$) con el grupo control a partir del día 15.

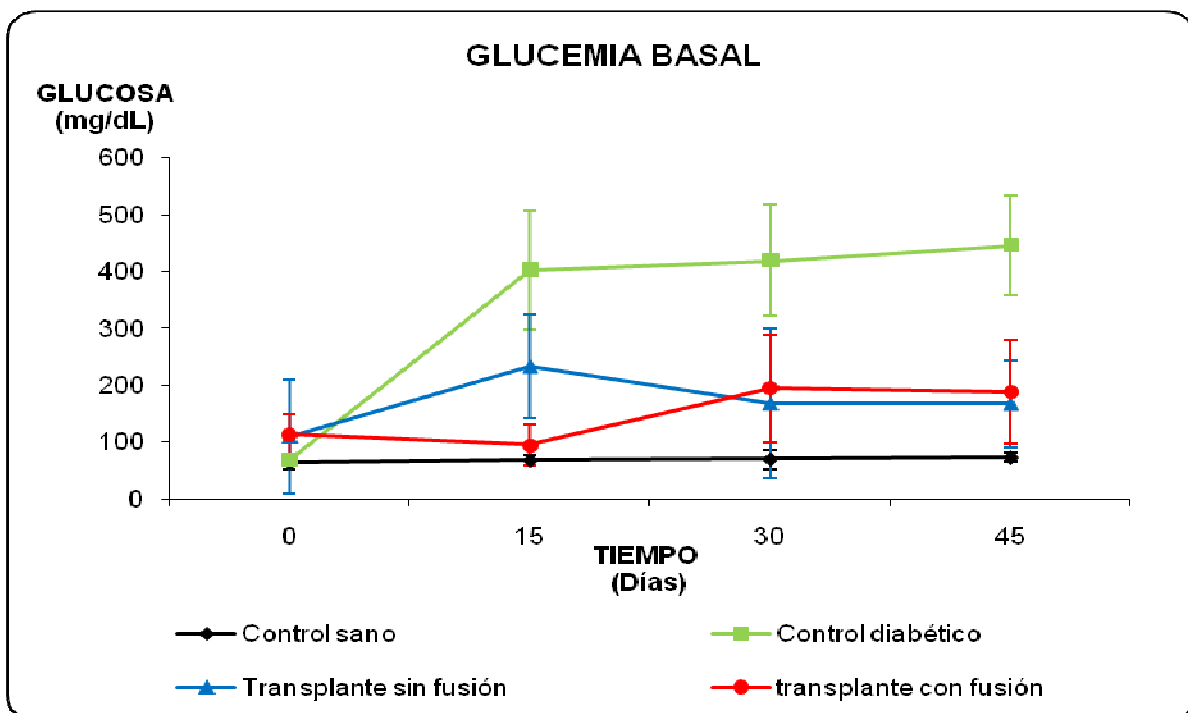


Gráfica 4. Diuresis durante 24 horas de los grupos experimentales (transplante de células β -pancreáticas x Dérmicas mezcladas o fusionadas) y sus respectivos controles (Sano y diabético) a los 0, 15, 30 y 45 días. Valores promedio \pm desviación estándar; $n = 5$.

9.2 PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

GLUCEMIA BASAL

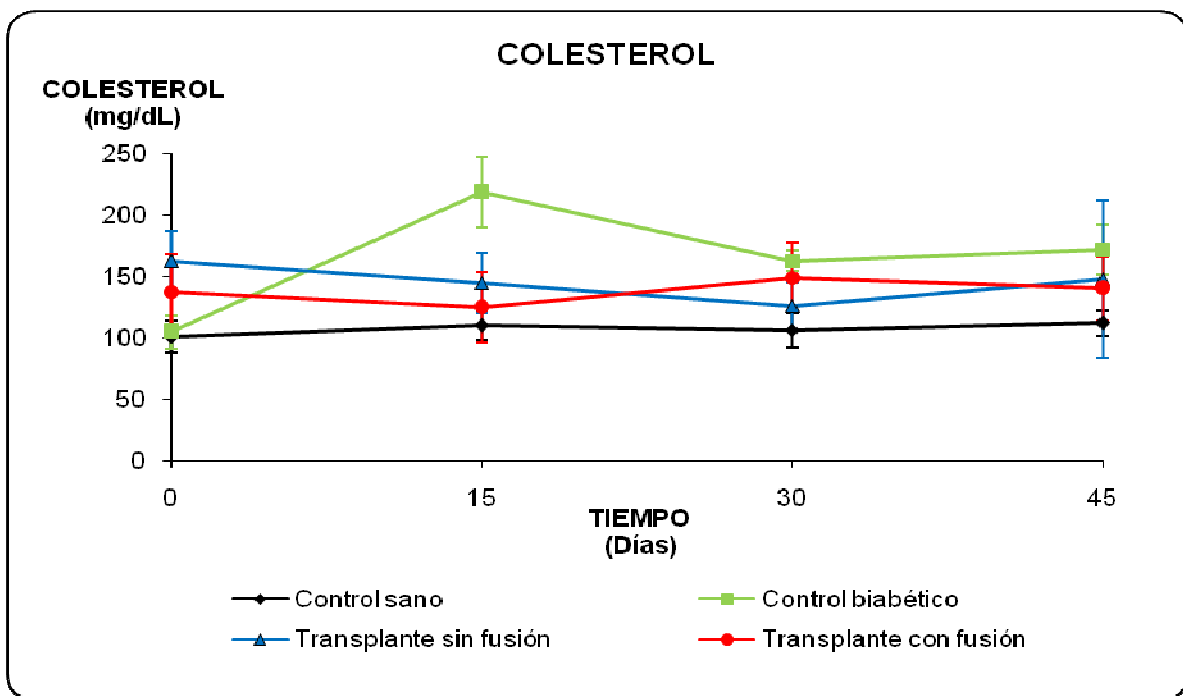
En la grafica 5 se puede observar la glucemia basal, de los 4 grupos de ratas durante 45 días. El grupo control sano mantuvo un comportamiento normal, de acuerdo con su desarrollo, mostrando diferencias estadísticas ($p < 0.05$), con los grupos control diabético y transplante sin fusión desde el día 15, sin embargo no presentó diferencias estadísticas ($p > 0.05$) con el grupo transplante con fusión, durante los primeros 15 días. A pesar de que al grupo transplante sin fusión se le implantó una concentración diez veces mayor de células, que la del grupo transplante con fusión, ambos grupos, presentaron un comportamiento similar, mostrando diferencias estadísticas ($p > 0.05$), solamente en el día 15.



Gráfica 5. Glucemia basal en plasma de los grupos experimentales (transplante de células β -pancreáticas x Dérmicas mezcladas o fusionadas) y sus respectivos controles (Sano y diabético) a los 0, 15, 30 y 45 días. Valores promedio \pm desviación estándar; $n = 5$.

COLESTEROL

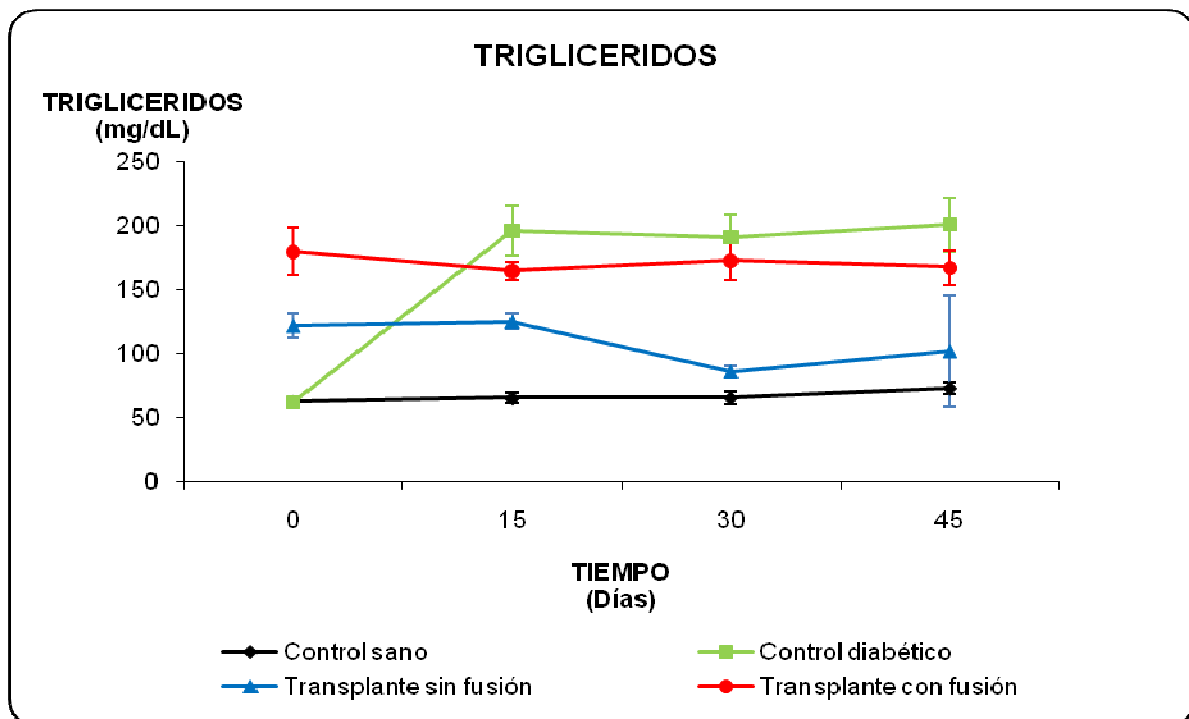
En la gráfica 6 se puede observar la concentración de colesterol en plasma, de los 4 grupos de ratas durante 45 días. Los niveles de colesterol en los grupos control sano, transplante sin fusión y transplante con fusión, no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$). Mientras que los animales del control diabético mostraron diferencias estadísticas ($p < 0.05$) con los demás grupos solamente el día 15 (218 mg/dl).



Gráfica 6 . Colesterol en plasma de los grupos experimentales (transplante de células β -pancreáticas x Dérmicas mezcladas o fusionadas) y sus respectivos controles (Sano y diabético) a los 0, 15, 30 y 45 días. Valores promedio \pm desviación estándar; n = 5.

TRIGLICÉRIDOS

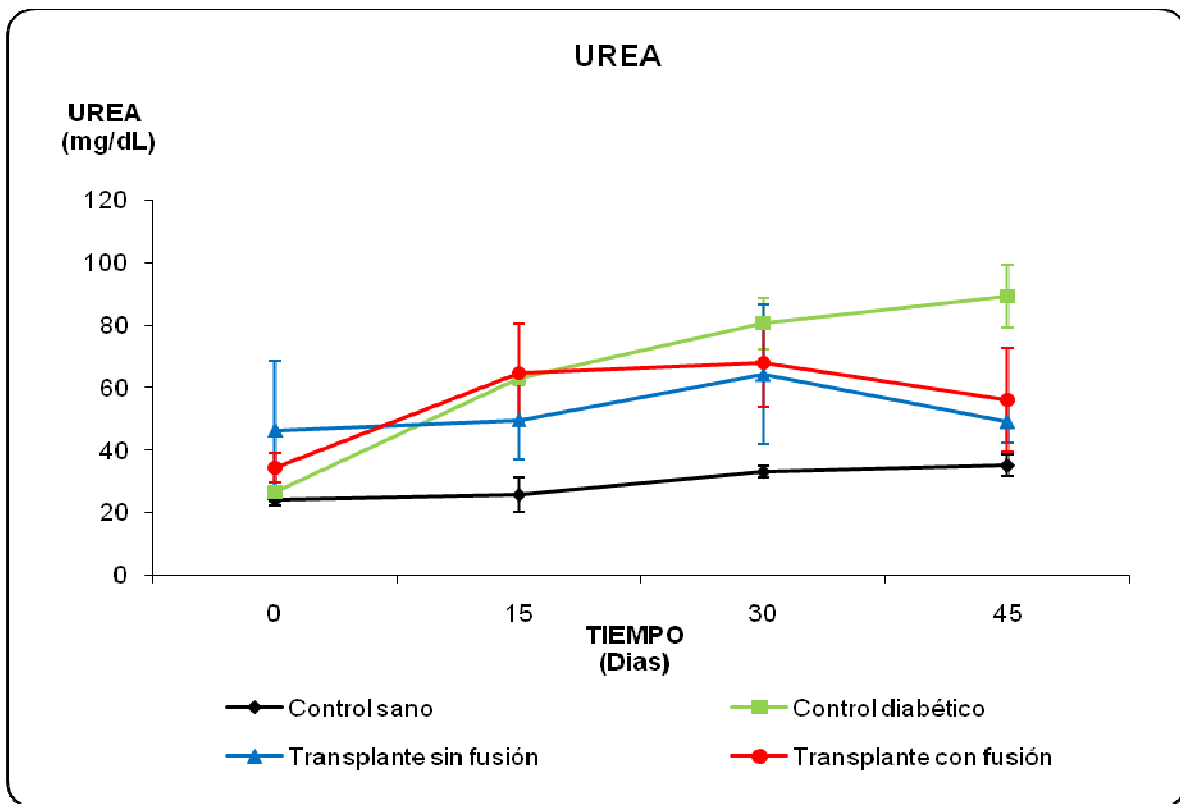
En la grafica 7 se puede observar la concentración plasmática de triglicéridos, de los 4 grupos de ratas durante 45 días. Es notable la diferencia estadística ($p < 0.05$) entre los 4 grupos experimentales desde el día 15, hasta el día 45. Se puede observar que los valores de triglicéridos en el grupo control sano, se encuentran en el rango normal, el grupo control diabético presenta un aumento muy marcado desde el día 15 que persiste hasta el final del experimento, mientras que los grupos transplantados registraron valores intermedios entre ambos controles.



Gráfica 7 . Triglicéridos en plasma de los grupos experimentales (transplante de células (β -pancreáticas x Dérmicas mezcladas o fusionadas) y sus respectivos controles (Sano y diabético) a los 0, 15, 30 y 45 días. Valores promedio +/- desviación estándar; n = 5.

UREA

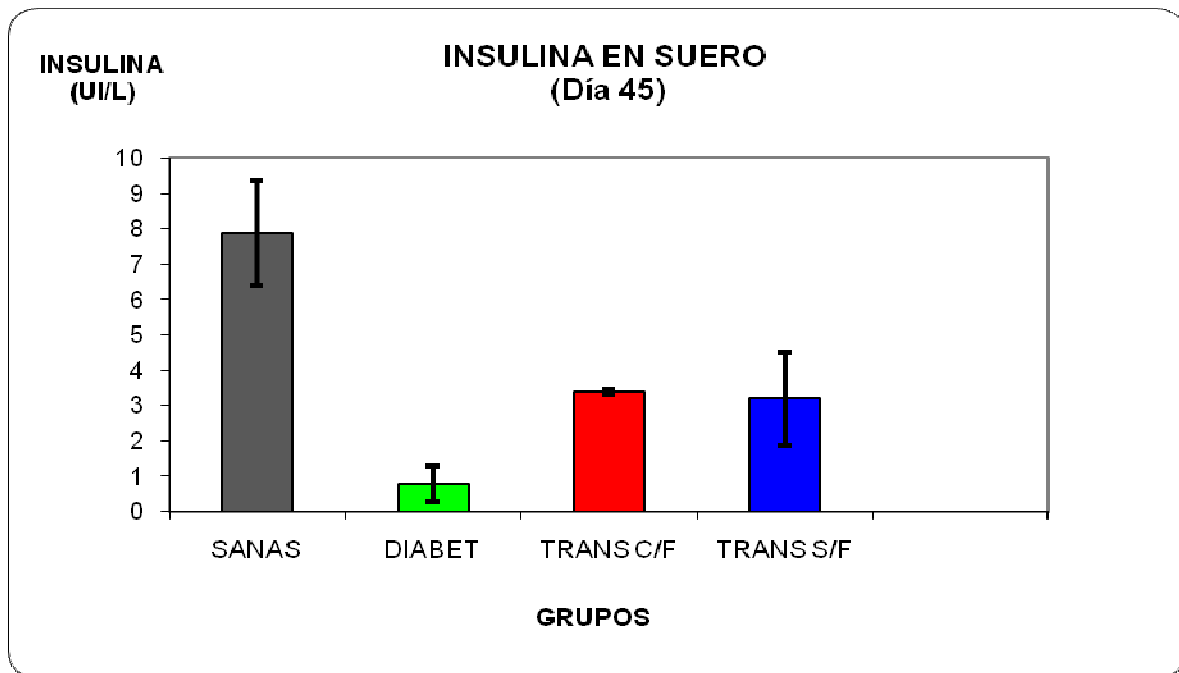
En la grafica 8 se pueden observar los niveles plasmáticos de urea, de los 4 grupos de ratas durante 45 días. En esta variable se puede observar un comportamiento similar en los grupos control diabético, transplante sin fusión y transplante con fusión, con valores altos de urea, sin presentar diferencias estadísticas ($p > 0.05$). Los animales del control sano presentaron diferencias estadísticas ($P < 0.05$) desde el día 15 hasta finalizar el tratamiento con los demás grupos.



Gráfica 8 . Urea en plasmade los grupos experimentales (transplante de células (β -pancreáticas x Dérmicas mezcladas o fusionadas) y sus respectivos controles (Sano y diabético) a los 0, 15, 30 y 45 días. Valores promedio +/- desviación estándar; n = 5.

INSULINA

En la grafica 8 se pueden observar los niveles plasmáticos de insulina, de los 4 grupos de ratas al día 45. La concentración de la insulina en plasma muestra diferencias estadísticas ($p < 0.05$), notables entre los grupos control (sano y diabético) y los grupos trasplantados con mezcla celular y con los híbridos. Los animales que recibieron el trasplante de híbridos, no presentaron diferencias estadísticas ($p > 0.05$), con los animales trasplantados con la mezcla celular. Sin embargo los animales con del grupo 4 tenían una concentración celular diez veces menor que el grupo trasplante sin fusión. Manteniendo los valores entre ambos grupos control.



Gráfica 9 . Insulina plasmática de los grupos experimentales (trasplante de células (β -pancreáticas x Dérmicas mezcladas o fusionadas) y sus respectivos controles (Sano y diabético) a los 0, 15, 30 y 45 días. Valores promedio +/- desviación estándar; n = 5.

10. Discusión

Los resultados arrojados por los organismos del grupo control sano, tanto en los parámetros clínicos como bioquímicos, se mantuvieron dentro de los rangos normales. Estos resultados fueron tomados como referencia.

Los organismos del grupo control diabético, presentaron un cuadro clínico de diabetes franca a los 7 días de haber comenzado el tratamiento, observándose poliuria, polifagia y polidipsia muy altas. En cuanto a los parámetros bioquímicos, registraron valores de glucemia basal por arriba de los 400 mg/dL a los 15 días, presentando una tendencia a elevar esta concentración. En cuanto al colesterol, triglicéridos y urea los valores fueron aumentando desde el día 15 hasta terminar el tratamiento. A pesar del deterioro reflejado en los parámetros, ningún animal murió antes de terminar el tratamiento.

El grupo de animales transplantados sin fusión presentó valores en algunos parámetros clínicos por arriba de los mostrados por el grupo control diabético, como en la ingesta de agua y diuresis, mientras que en peso corporal e ingesta de alimento se mantuvo entre el grupo control sano y control diabético. En todos los parámetros bioquímicos los valores se mantuvieron entre los de los controles sano y diabético, finalizando el ensayo con una ligera elevación en éstos.

Los animales transplantados con células fusionadas presentan un comportamiento parecido al grupo anterior, donde los valores se mantienen entre los del grupo control sano y diabético. Aunque el comportamiento de este grupo fue muy similar al grupo trasplante sin fusión, en lo que se refiere a peso corporal, ingesta de alimento y agua, así como en diuresis, se aprecia una leve diferencia y mejoría al finalizar el ensayo. En referencia a los parámetros bioquímicos colesterol, triglicéridos y urea se mantuvo el mismo comportamiento.

Aunque los resultados entre los grupos transplantados sin fusión celular y con fusión celular fueron muy similares, es de suma importancia resaltar que el número de células inyectadas a cada grupo, fue muy diferente. A los animales del grupo trasplante sin fusión, se les implantaron alrededor de 1.4×10^5 cel/ml entre células dérmicas y células β en proporción 1:1, por lo tanto se injertaron 7×10^4 células β . A los animales con fusión celular se les transplantaron alrededor de 7.5×10^3 híbridos por animal. A pesar de que, la diferencia celular implantada en los dos grupos experimentales favorece a los animales de mezcla celular, la secreción de insulina no mostró diferencias estadísticas entre estos grupos, observándose una clara diferencia en los animales del grupo trasplante con fusión, ya que con casi diez veces menos concentración celular secretaron la misma cantidad de insulina.

Debido a que a los animales del grupo 3 se les transplantó casi 10 veces más la concentración de células β , los resultados mostrados durante los primeros 30 días presentaron valores ligeramente más estables, sin que estos fueran muy diferentes a los del grupo con fusión celular, finalizando el ensayo con una tendencia a aumentar los valores en los diferentes parámetros clínicos y bioquímicos. Una razón pudo ser un posible rechazo inmunológico crónico, ya que este se caracteriza por un deterioro lento, progresivo y gradual de la función del trasplante, cuyo inicio suele ser asintomático en la mayoría de los casos lo cual explicaría el comportamiento de este grupo, ya que al finalizar el ensayo muestra una tendencia a aumentar los valores bioquímicos.

En trabajos anteriores se demostró que los animales transplantados con mezcla celular muestran una tendencia a la declinación de su estado clínico y los animales con trasplante de células híbridas no mostraron rechazo inmunológico bajo las mismas condiciones (21, 33, 34). Es posible que los híbridos transplantados por vía hématica, mantengan una población constante e incluso en aumento, la cual permita una secreción de insulina adecuada. A pesar de que la secreción de insulina mejora el cuadro clínico de los animales, esta no logra restablecer los parámetros normales, lo cual pudiera deberse a que las células β , al no estar en conjunto con los demás componentes del islote de Langerhans, sean sometidas a una regulación diferente (24).

Ya que la diabetes mellitus tipo 1 provoca la destrucción solamente de las células β y por lo tanto no hay secreción de insulina, esto motivaría a las células productoras de glucagón que podrían estar antagonizando el efecto de la insulina producida por los híbridos, perdiendo así su eficiencia (17,24).

Los resultados presentados concuerdan con los resultados obtenidos previamente (21,34). Pues se muestra que los animales transplantados con híbridos por vía subcutánea, mejoran el cuadro clínico de estos, sin embargo no logran la reversión completa de la diabetes franca. En el trabajo mencionado, los animales tratados con el trasplante por vía subcutánea presentan mejorías hasta después del día 60, en donde los diferentes parámetros comienzan a restablecer sus valores. La secreción de insulina fue uno de los parámetros que casi llegaron a la normalidad.

En el presente trabajo, los animales transplantados con híbridos por vía hématica, comenzaron a restablecer sus valores a partir del día 30. Lo que nos puede decir que el torrente sanguíneo colocó a los híbridos rápidamente en un nicho, donde pudieran realizar sus funciones secretoras y con ello restablecer las concentraciones normales de glucemia. Sin embargo es necesario hacer un seguimiento del alojamiento de los híbridos, mediante técnicas de histología en los órganos donde estos pudieran haberse depositado, lo cual pudo haber ocurrido en bazo, riñón e hígado, ya que estos órganos son sensores por donde pasa primero la sangre. Una vez conociendo esto quizá se podría hacer un trasplante directo.

10. CONCLUSIONES

- 1.- El cuadro clínico de la diabetes mellitus y los parámetros bioquímicos de las ratas receptoras del trasplante de las células híbridas son mejoradas parcialmente por este.
- 2.- A lo largo del ensayo, los animales que fueron sujetos al trasplante de células híbridas, no presentan muestras de rechazo.
- 3.- El trasplante de híbridos por vía hématica mostró mejoría a menor tiempo, siendo esta a partir del día 30.
- 4.- Aunque la concentración de células híbridas transplantadas fue 10 veces menor, mostró una secreción de insulina capaz de mejorar el cuadro clínico de los animales.
- 5.- El trasplante de células β electrofusionadas con células dérmicas, podría ser una alternativa viable para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 1

PERSPECTIVAS

1. Es necesario hacer una evaluación a largo plazo con un número mayor de animales experimentales, que incluya un trasplante con mayor número de células híbridas, los cuales permitan revertir el cuadro de diabetes mellitus franca.
2. También es necesario hacer un seguimiento, que nos permita conocer el órgano o tejido donde se alojan los híbridos. Esto podría realizarse mediante técnicas de histología, las cuales nos permitirán analizar bazo, riñón e hígado, debido a que estos son los órganos sensores, por los cuales en dicho orden circula la sangre. Para posteriormente realizar un trasplante directo
3. Seguimiento de secreción de insulina en células híbridas una vez localizado el o los nichos del trasplante.

REFERENCIAS

1. Torrey W. 1983. Morfogénesis de los vertebrados. Limusa México. 1ra, ed. Pp. 187-188.
2. Norris D. 1996. Vertebrate endocrinology. New York. Academic Press. 3ra ed. Pp. 506-520.
3. Guyton A. 1997. Tratado de fisiología medica. Madrid. McGraw- Hill. 9na edición Pp 1063-1076
4. O. Rahilli. 1986. Anatomia. de Garner. Madrid. Mc Graw Hill. 5ª ed. Pp. 468, 469.
5. Daryl K. 1997. Bioquímica de Harper. México. El manual moderno.
6. Lacy, P. E., Greider, M. H. 1972. Ultrastructural organization of mammalian pancreatic islets. in: Handbook of physiology. Ed. Graiger. tomo I (7). pp. 77-90.
7. Ganong. F. 1998. Fisiología Medica. 18a. México. Ed. Manuel Moderno. 373-398.
8. Bendayan M. 1982. Contacts between endocrine and exocrine cells in the pancreas. Cell Tissue Research. 222(1) ; 227-30.
9. Sanchez S. 1994. Analisis de la secreción de insulina por células β pancreáticas en cultivo tratadas con NGF y AMPc. Tesis para obtener el grado de: Doctor en Biomédicas Instituto de fisiología. UNAM. Pp. 10-15
10. Edlund, H. 1998. Transcribing Pancreas. Diabetes. 47: 1817-1823.
11. Kaiser N., Corcos A. P., Tur-Sinal A., Ariav Y., Cerasi E. 1988. Monolayer cultura of adult rat pancreatic islets on extracellular matrix: long term maintenance of differentiated β -cell function. Endocrinology. 123, (2): 834-840.
12. Ashcroft F. M., Ashcroft S. J. H. 1992. Insulin: Molecular Biology to Pathology. Oxford University Press: 33-88.
13. Leroith D., Taylor S. I., Olefski J. M. 2003. Diabetes Mellitus. Fundamentos y clínica. Mc Graw-Hill. 24-58.
14. Expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 2001; 24 (11):2017-8.
15. Islas S., Lifshitz A. 1993. Diabetes Mellitus. McGraw-Hill. Pp 315-329.
16. Foster D. W. 1998. Diabetes mellitus. McGraw-Hill. 14ª Ed. Pp 1-30
17. Lienhard G. E., Slot J. W., James. E. Mueckler M. M. 1992. How cells absorb glucose. Glucose, a critical nutrient, must enter cells with the aid of a special transporter: Recent research elucidates the structure and function of the transporter and how insulin regulates it. Scientific American: 86-91
18. 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. New England Journal of Medicine. 329. (14)
19. Atkinson M. A., Maclaren N. K. 1990. What causes diabetes. For insulin-dependent diabetes, the answer is an autoimmune ambush of the body's insulin-producing cells. Why the attack begins and persists is now becoming clear. Scientific American 262 (2): 62-71.
20. Barrera E. 2005. Transplante de células insulares de páncreas electrofusionadas con células déricas en ratas diabéticas. Tesis para obtener el grado de: Doctor en ciencias Biológicas. Universidad Autónoma Metropolitana *campus* Iztapalapa.
21. American Diabetes Association. 1997. Insulin-Dependent Diabetes. Pp 1-16.

22. Takashi Y. 2002. Regeneration therapy of pancreatic β cells: towards a cure for diabetes. Academic Pres. Biochemical and Biophysical Research Communications 2996: 1039-1043.
23. Vázquez-Martínez, J. L., Gómez-Dantes, H., Fernández-Cantón, S. 2006. Diabetes Mellitus en población adulta del IMSS. Resultado de la Encuesta Nacional de Salud 2000. Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social. 44 (1): 13-26.
24. Franz M. J., MS, RD, CDE. 2001. Carbohidratos y diabetes: ¿ Qué es más importante, la fuente o la cantidad?. Current Diabetes Reports Latin America, 2: 175-184.
25. Chang, D., Chassy, B., Saunders, J. y Sower, A. 1992. Guide to electroporation and electrofusion. Academic Press, U.S.A.: 581 pp.
26. Lanza, P. R., Chick W. L. 1995. Encapsulated cell therapy. Scientific American Science & Medicine. Pp 16-25
27. Ruso L. 1999. Transplante de páncreas. Historia y evolución de las ideas. Conferencia dictada en la Academia Nacional de Medicina.;4:16-21
28. Ringertz, N. y Savage, R. 1976. Cell Hybrids. Academic Press, U.S.A. :366 pp.
29. Neumann, E., Sowers, A. y Jordan, C. 1989. Electroporation and Electrofusion in Cell Biology. Plenum Press, U.S.A.: 436 pp.
30. Salomon D., Meda P. 1986. Heterogeneity and Contact-dependent regulation of hormona secretion by individual β cells. Exp cell Res. 162: 507-520.
31. Barrera E., Vilches F., Fregoso P., Vargas V., Castillo P., Martinez A., Velasco Lezama. 1997. Parametros de electrofusión para células pancreáticas. Bioquímica. 22. (3): 722-726.
32. Barrera E., Vilches F., Fregoso P., Vargas V., Castillo P., Martinez A., Velasco Lezama., Muñoz T., Roman-Ramos R. Betancour-Rule M. 2005. Clinical evolution of diabetic rats alter transplant of electrfused pancreatic islet cells and dermis cells. Biomed Pharmacother. 59: 275-282.
33. Lewis C. E., Clark A., Ashcroft S. J. H., Cooper G. J. S., Morris J. F. 1988. Calcitonin gene-related peptide and somatostatin inhibit insulin release from individual rat β -cells. Molecular and cellular Endocrinology. 57: 41-49.
34. Giordano E., Bosco D., Cirulli V. Meda P. 1991. Repeated glucose stimulation reveals distinct and lasting secretion patterns of individual rat pancreatic β cells. The American Society for Clinical Investigation. 87: 2178-2185.
35. Hiriart M., Ramírez –Melendes C. 1993. Musacarinic modulation of insulin secretion by single pancreatic β -cells. Mol and cell Endocrinol. 93: 63-69.
36. Smith P. F., Luque E. H., Nelly J. D. 1974. Detection and measurement of secretion from individual neuroendocrine cells using a reverse hemolytic plaque assay. 18, 130.
37. Hiriart M., Ramírez M. 1991. Functional Subpopulations of Individual Pancreatic β -Cells in Culture. Endocrinology. 128. (6): 3193-3198.
38. Aguilera M, De la Fuente L, Genis A, Gonzales M, Santos J. Inducción de diabetes experimental con aloxan en ratas integras, como modelo para el estudio de la diabetes mellitus. UNAM. ENEP. Iztacala. Pp 3-14
39. Chiasson B. 1988. Laboratory Anatomy of the White rat. 5a ed. University of Arizona. Pp 65-84.
40. Moller E; Filer S. 1991. Resistencia a la insulina: Mecanismos, sindromes e implicaciones. New Eng Journal Med. 325. (13).

41. Yamamoto M; Kataoka K. 1988. An electron microscope study of the development of the exocrine and endocrine pancreas with special reference to intercellular junctions. *Arch Histol Cytol.* 51 (4): 315-25.
42. Jorns A, Barklage E Grube D. 1988. Heterogeneities of the islets in the rabbit pancreas and the problem of "paracrine" regulation of islet cells. *Anatomy Embriol* 178(4); 297-307.
43. Baetens D, Malaisse-Lagae F, Perrelet A, Oci L. 1979. Endocrine pancreas: three-dimensional reconstruction show two types of islets of Langerhan. *Science.*; (4424): 1323-5.
44. Torres T. Genes que determinan la susceptibilidad a padecer diabetes sacarina insulino dependiente (DSID). UNAM campus Iztacala carrera Médico cirujano.
45. Nick J. London, Stephen P. Lake, James Wilson, Drew Bassett, Paul Toomey, Peter R. F. Bell, and Roger F. L. James. 1990. A simplified method for the release of islets by controlled collagenase digestion of the human pancreas. *Transplantation.* 49: 1109-1113.
46. Hughes T. A., Osama Gaber A., Amiri H. S., Wang X., Elmer D. S., Winsett R. P., Hathaway D: K., Hughes S. M., Ghawji M. 1994. Lipoprotein Composition in insulin- dependent Diabetes Mellitus with chronic renal failure: effect of kidney and pancreas transplantation. *Metabolism.* 43, (3): 333-347.
47. Jorn A., Klemmner J., Steiniger B. 1995. Insulin cells in rat Whole- pancreas isografts display heterogeneous immunoreactivities and ultrastructure. *Pancreas.* 10, (3): 314-324.
48. Méndez D; Ramos G. 1994. Animal Models in Diabetes Research. *Archives of Medical Research.* 25 (4): 367-375.
49. Pace S, Tarvin T, Neighbors S, Pirkle A, Grider H. 1980. Use of a High Voltage Technique to determine the molecular requirements for exocytosis in islet cells. *Diabetes.* 29: 311-18.
50. Poynter, D. V. M; Robertson, M.D. 1996. An integrated view of β -cell dysfunction in type-II diabetes. *Annu. Rev. Med.* 47:69-83.
51. Lanza P., Beyer M., William L. 1994. Xenogeneic humoral responses to islets transplanted in biohybrid diffusion chambers. *Transplantation.* 57 (9): 1371-1375.
52. Yaseen A, Pedley C, Howell L. 1982. Regulation of insulin secretion from islets of Langerhans rendered permeable by electric discharge. *Biochemistry.* 206: 81-87.
53. Bonner W. Like A. 1980. A dual population of islets of Langerhans in bovine pancreas. *Cell Tissue Res.* 206: 158-170.
54. Sorenson L, Garry G, Clark T. 1991. Structural and functional considerations of GABA in islets of Langerhans β -cells and Nerves. *Persp Diab.* 40: 1365-1374.
55. Ricordi C., Lacy P., Finke H., Olack J., Scharp W. 1988. Automated method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes.* 37: 413-420.
56. Barrera E., Vilches A., Fregoso M., Vargas A., Castillo I., Martínez J., Velasco R. 1996. Transplante de células pancreática totales electrofusionadas: Cuadro clínico y análisis histopatológico en conejo a los 18 meses. UNAM *campus* Iztacala. Departamento de histopatológica INC.