



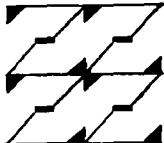
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

TRASPLANTE SINGENICO DE ISLOTES PANCREATICOS EN RATAS CON DIABETES INDUCIDA Y NEFROPATIA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
ALEJANDRO ORDONEZ AGUILLON

UNAM FES ZARAGOZA



LO HUMANO EJE DE NUESTRA REFLEXION

Director Externo: Dr. José Francisco Arreola Ortiz

Director Interno: Dr. Rubén Marroquín Segura

México, D. F.

2002

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



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.

ESTA TESIS FUE REALIZADA EN LA SECCIÓN DE ENDOCRINOLOGÍA DEL LABORATORIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS DEL HOSPITAL GENERAL CENTRO MÉDICO "LA RAZA".

DIRECTOR EXTERNO:
Dr. JOSÉ FRANCISCO ARREOLA ORTÍZ
INVESTIGADOR BIOMÉDICO.

DIRECTOR INTERNO:
Dr. RUBÉN MARROQUÍN SEGURA
JEFE DEL LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A MI PADRE FRANCISCO Y A MI MADRE SILVESTRE
QUE CON SU APOYO Y CONFIANZA ME FUE POSIBLE
CULMINAR CON ÉXITO MI FORMACIÓN PROFESIONAL.

A MIS HERMANOS, FRANCISCO, JORGE, RAÚL, MA. CONCEPCIÓN
MA. DEL ROSARIO, ALMA LILIA, PATRICIA Y ADOLFO POR SU APOYO
QUE ME HAN BRINDADO EN MIS ESTUDIOS Y EN TODO AQUELLO
QUE HE NECESITADO.

A MI ESPOSA ELIZABETH QUE CON SU APOYO Y CONFIANZA
PROVOCÓ TERMINAR ESTE TRABAJO.

A MIS SOBRINOS, ESPERANDO QUE ESTE TRABAJO SEA
UN ESTIMULO PARA QUE ALCANZEN TODAS SUS METAS
ANHELADAS.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

JURADO

**DR. RUBÉN MARROQUÍN SEGURA
DR. JOSÉ FRANCISCO ARREOLA ORTÍZ
Q.F.B. ROSALINDA ESCALANTE PLIEGO
Q.F.I. ESTELA VALENCIA PLATA
Q.F.B. YOLANDA FLORES CABRERA**

**PRESIDENTE
VOCAL
SECRETARIO
SUPLENTE
SUPLENTE**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

AGRADEZCO LA COLABORACIÓN DE:

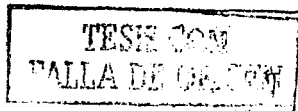
M. en C. GUADALUPE PARTIDA HERNÁNDEZ
Q.F.B. ELISA JUNCO GUADARRAMA
Q.F.B. LOURDES MONDRAGÓN ROSALES

POR SU APOYO EN LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

C O N T E N I D O

1	RESÚMEN	1
2	ANTECEDENTES	2
3	MARCO TEÓRICO	4
3.1.	CLASIFICACIÓN DE LA DIABETES MELLITUS	4
3.2.	MODELOS EXPERIMENTALES	
3.3.	FÁRMACOS EMPLEADOS EN LA INDUCCIÓN DE LA DIABETES	6
3.4.	PÁNCREAS	7
3.4.1.	CARACTERÍSTICAS GENERALES	7
3.4.2.	PÁNCREAS EXÓCRINO	7
3.4.3.	PÁNCREAS ENDÓCRINO	8
3.4.4.	INSULINA	9
3.4.4.1.	ACCIÓN METABÓLICA DE LA INSULINA	11
3.5.	TRASPLANTE DE ISLOTES PANCREÁTICOS	11
3.5.1.	GENERALIDADES	11
3.5.2.	TIPOS DE TRASPLANTE DE ISLOTES PANCREÁTICOS	12
3.5.3.	SITIOS DE ADMINISTRACIÓN DEL TRASPLANTE DE ISLOTES	13
3.6.	ASPECTOS INMUNOLÓGICOS DEL TRASPLANTE	13
3.6.1.	GENERALIDADES	13
3.6.2.	CARÁCTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS Y GENÉTICAS DEL HLA	15
3.6.3.	INMUNOSUPRESIÓN	16
3.6.3.1.	MEDICAMENTOS CITOTÓXICOS E INMUNOSUPRESIÓN INDUCIDA POR HORMONAS	16
3.7.	NEFROPATÍA DIABÉTICA	19



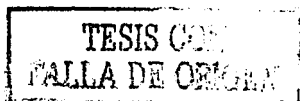
3.7.1.	GENERALIDADES	19
3.7.2.	ESTADÍOS DE LA NEFROPATÍA DIABÉTICA	20
3.7.3.	EFEECTO DEL TRASPLANTE DE ISLOTES PANCREÁTICOS SOBRE LA NEFROPATÍA	20
4	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
5	FUNDAMENTACIÓN DEL PROYECTO	23
6	HIPÓTESIS	24
7	OBJETIVOS	25
8	MÉTODOS	26
8.1.	OBTENCIÓN DEL TEJIDO PANCREÁTICO	26
8.2.	AISLAMIENTO DE ISLOTES PANCREÁTICOS	26
8.3.	PURIFICACIÓN DE ISLOTES PANCREÁTICOS	26
8.4.	CULTIVO DE ISLOTES PANCREÁTICOS	26
8.5.	INDUCCIÓN DE LA DIABETES MELLITUS	26
8.6.	TRASPLANTE DE ISLOTES PANCREÁTICOS	27
8.7.	NEFROPATÍA DIABÉTICA Y TRASPLANTE DE ISLOTES	27
8.8.	DIAGRAMA DE FLUJO	28
9	RESULTADOS	29
9.1.	OBTENCIÓN, AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE ISLOTES PANCREÁTICOS	29
9.2.	INDUCCIÓN DE LA DIABETES MELLITUS	29
9.3.	TRASPLANTE DE ISLOTES PANCREÁTICOS	29
9.4.	NEFROPATÍA DIABÉTICA	29
10	DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	43
11	CONCLUSIONES	45
12	REFERENCIAS	46

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1. RESUMEN.

Debido a que la Diabetes mellitus insulino-dependiente ha tenido un incremento considerable en los índices de morbilidad (1.8/10000 diabéticos a 4.1/10000 diabéticos) y mortalidad (30% al 60%) en los últimos 7 años en nuestro país (1), y que sus complicaciones tardías como la nefropatía representen la causa principal de muertes en los pacientes insulino-dependientes (20-40%), se realizó el trasplante de islotes pancreáticos en ratas con diabetes inducida y nefropatía como una alternativa importante en su tratamiento y control, desarrollándose la metodología apropiada para la obtención de los islotes pancreáticos así como la elección del sitio adecuado para la perfusión de los mismos (vía Porta), en aquellas ratas a las cuales se les indujo la diabetes farmacológicamente (Aloxana), y que presentaron cifras de glucosa que indicaron una diabetes franca por más de 20 días consecutivos. Además, se dejaron evolucionar sin terapia insulínica a ratas con diabetes inducida para observar las lesiones que produce en riñón y la posibilidad de revertirlas mediante el trasplante de islotes pancreáticos.

Así, se obtuvo un grupo de ratas con diabetes a las 72 horas de administrada la aloxana, a las cuales se les trasplantó por vía porta los islotes pancreáticos cultivados, observándose una disminución de los niveles de glucosa sanguínea a partir del 3er. día del trasplante hasta normalizarse y permanecer euglucémicas durante 120 días sin daño renal alguno, utilizando la ciclosporina A como inmunosupresor. Para la nefropatía se lograron identificar los estadios característicos a través de las cifras albúmina y proteínas en orina así como por el estudio histopatológico.



2. ANTECEDENTES

Debido a que Diabetes Mellitus insulino-dependiente y sus complicaciones tardías no han sido controladas eficazmente con el uso de la insulina en sus distintos esquemas y presentaciones farmacológicas, ni con los regímenes dietéticos e hipoglucemiantes orales, entonces se debe abordar de una forma diferente el tratamiento y control de la enfermedad mediante el trasplante de islotes pancreáticos. Así, en 1964, Hellestrom reporta el primer método de disección manual de islotes pancreáticos de ratas obesas e hiperglucémicas para estudios enzimáticos, tres años después Lacy y colaboradores aislan islotes intactos del páncreas normal de ratas mediante un método de disrupción acinar o desorganización del parénquima acinar (2). Yunoszai y asociados, en 1969 reportan por primera vez el trasplante de islotes aislados a ratas diabéticas por vía intraperitoneal con mejora parcial del estado diabético (3). En 1970, Strautz logra revertir algunas complicaciones tardías de la diabetes mellitus al trasplantar islotes pancreáticos en ratones ob/ob (4). Posteriormente, Lacy y Ballinger demuestran que para mejorar el estado diabético inducido con estreptozotocina en ratas isogénicas se requiere de 400 a 600 islotes (5). Reckar y Baker en 1973 "curan" la diabetes mediante el trasplante intraperitoneal de islotes pancreáticos isólogos, en el mismo año, Lacy aísla islotes de ratas adultas y Kemp experimenta nuevas rutas de trasplante de islotes (6). En 1980, Lim realiza la microencapsulación de los islotes pancreáticos utilizando Alginato de sodio y poli-L-lisina logrando con esto la aceptación del tejido pancreático trasplantado además, su método es empleado para la microencapsulación de eritrocitos y otros tejidos (7). Es hasta 1987, cuando se empiezan a reportar los primeros casos de trasplante de islotes en humano, en la URSS Shumakov y colaboradores observan una disminución considerable en los niveles de glucosa y un retraso en la evolución de los daños secundarios que la diabetes origina (8). Sin embargo en la mayoría de los estudios y trasplantes realizados, los pacientes siguen necesitando la administración de la insulina para evitar las complicaciones secundarias, de tal manera que las investigaciones han continuado para lograr un mejor tratamiento de la enfermedad haciendo incapie principalmente en la microencapsulación y en la obtención y purificación de los islotes pancreáticos. En 1993, Clayton y James publican que los estudios realizados en la microencapsulación de los islotes han resultado ser excelentes in Vitro pero, al realizar los trasplantes con ellos a nivel experimental los resultados son variables que van desde una larga funcionalidad del tejido trasplantado hasta el fracaso debido a la fibrosis pericapsular (9).

En enero de 1993 durante el Segundo Simposio Internacional de Trasplante de Islotes se informó que hasta esta fecha se habían realizado 178 trasplantes de islotes en el mundo, de los cuales el 11% de los pacientes han logrado la insulino-independencia, el 20% de los pacientes solo la logró por 2 años, el 20% mantiene la funcionalidad de los islotes, la cual es determinada por la medición del peptido C en la circulación; sin embargo, el 65% sólo tuvo una funcionalidad del tejido trasplantado por 2 años requiriendo estos pacientes la administración de insulina exógena (10).

Sin embargo, el hecho más importante hasta el momento ha sido reportado en el protocolo "Edmonton" (año 2000), en el cual 7 pacientes con diabetes insulino-dependiente recibieron islotes pancreáticos en 2 trasplantes diferentes (800 a 900 mil islotes en cada trasplante) y en donde el primer paciente hasta los primeros 14 meses no ha recibido insulina y los restantes 6 llevaban 12 meses sin recibirla y en ambos casos no se ha rechazado el tejido trasplantado (11).

El trasplante de islotes normaliza los niveles de glucosa además de prevenir y revertir las complicaciones derivadas de la diabetes; también es posible evitar el rechazo de los islotes trasplantados con la microencapsulación sin una inmunosupresión continua, pero en la actualidad es necesario continuar con las investigaciones en la obtención y aislamiento de los islotes, así como en el sitio adecuado del trasplante de los mismos para tratar y curar la enfermedad ya que las complicaciones en los pacientes con diabetes son muy devastadoras aún con la administración de la insulina

3. MARCO TEÓRICO

3.1. CLASIFICACIÓN DE LA DIABETES MELLITUS

La Diabetes mellitus se caracteriza por hiperglucemias prolongadas (mayores de 140 mg/dL) o niveles altos de glucosa en plasma durante la prueba de tolerancia a la glucosa.

La Diabetes mellitus de acuerdo con el criterio de la American Diabetes Association (ADA) y la Organización Mundial de Salud (OMS) se clasifica en (12):

I. Diabetes Mellitus tipo 1

i. Diabetes mediada por procesos autoinmunes

Esta causada por un proceso autoinmune que destruye las células beta pancreáticas .

Se puede detectar anticuerpos en el 85-90% de los pacientes en los que se detecta hiperglucemia por primera vez.

ii. Diabetes idiopática

Forma de la enfermedad cuya causa es desconocida.

II. Diabetes Mellitus tipo 2

Puede presentarse por una resistencia a la insulina acompañada de una deficiencia relativa en su producción pancreática

III. Diabetes Gestacional

IV. Otros tipos específicos de diabetes

i. Defectos genéticos de la función de la célula beta:

- Cromosoma 12, HNF-1 alfa (antes MODY 3)
- Cromosoma 7 , glucocinasa (antes MODY 2)
- Cromosoma 20, HNF-4 alfa (antes MODY 1)
- DNA mitocondrial

ii. Defectos genéticos en la acción de la insulina

- Resistencia insulínica tipo A
- Leprechaunismo
- Síndrome de Rabson- Mendenhall
- Diabetes lipotrófica

iii. Enfermedades del páncreas Exócrino:

- Pancreatitis
- Traumatismo/pancreatectomía
- Neoplasia
- Fibrosis quística
- Hemocromatosis
- Pancreatopatía Fibrocalculosa

iv. Endocrinopatías:

- Acromegalia
- Síndrome de Cushing
- Glucagonoma
- Hipertiroidismo
- Somatostatina
- Aldosteronoma
- Feocromocitoma

v. Inducida por químicos o drogas:

- Vacor
- Pentamidina
- Ácido nicotínico
- Glucocorticoides
- Hormonas Tiroideas
- Diazóxido
- Agonistas beta-adrenérgicos
- Tiazidas
- Dilantin
- Alfa-interferón

vi. Infecciones:

- Rubéola congénita
- Citomegalovirus

vii. Formas no comunes de diabetes mediada por fenómenos inmunes:

- Síndrome de "stiff-man"
- Anticuerpos anti-receptor de insulina

viii. Otros síndromes genéticos asociados a veces con diabetes:

- Síndrome de Down
- Síndrome de Klinefelter
- Síndrome de Turner
- Síndrome de Wolframs
- Ataxia de Friedreich

3.2. MODELOS EXPERIMENTALES

Para el estudio de la diabetes insulino-dependiente se han diseñado diversos modelos experimentales que permiten establecer las condiciones óptimas para controlar y prevenir las complicaciones de esta enfermedad. Dentro de estos modelos tenemos:

Quirúrgico. Mediante la pancreatectomía, que causa numerosos cambios nutricionales y metabólicos los cuales no presenta el paciente diabético, dificultando así el estudio de la diabetes mellitus en los animales.

Animales de experimentación. El hamster chino y las ratas B/B se emplean para este fin. El hamster chino desarrolla una diabetes muy leve sin llegar a presentar complicaciones secundarias, esto limita el estudio de la enfermedad. Las ratas B/B ofrecen un buen modelo para el estudio de la diabetes mellitus ya que estos animales desarrollan las complicaciones tardías de la enfermedad, sin embargo desde el punto de vista de trasplante tiene el inconveniente de que los autoanticuerpos destruyen las células trasplantadas.

Viral. Virus como el coxsakie B4 y algunos picornavirus se emplean para la destrucción de los islotes pancreáticos e inducción del estado diabético sin embargo la degranulación de los islotes no es completa y produce una diabetes muy leve.

Farmacológico. Es el método que ha dado mejor resultado para la inducción de la diabetes mellitus insulino-dependiente, ya que los fármacos actúan directamente sobre los islotes pancreáticos produciendo la diabetes e incluso el desarrollo de sus manifestaciones tardías (13).

3.3. FÁRMACOS EMPLEADOS EN LA INDUCCIÓN DE DIABETES.

Entre los fármacos que se han utilizado para la inducción de la diabetes mellitus en animales tenemos la Aloxana y la Estreptozotocina.

La aloxana es un derivado de la pirimidina, es citotóxica, bloquea la liberación de insulina, inhibe el ciclo de Krebs al disminuir la oxidación de la glucosa y de la manosa (a nivel de transporte de electrones $\langle H \rangle$) así como la oxidación del succinato).

La estreptozotocina, es una 2-desoxi-D-glucosa con una cadena lateral N-nitrosometilurea (figura 1), inhibe la oxidación de la glucosa y la liberación de la insulina, con disminución del NAD^+ en las células del islote y causa por tanto, la muerte de la célula beta (14).

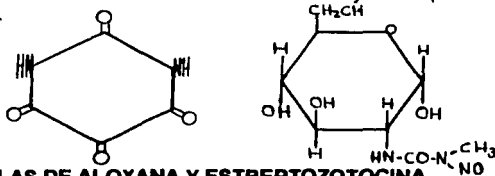


FIGURA 1. MOLÉCULAS DE ALOXANA Y ESTREPTOZOTOCINA.

FUENTE: Agarwal MK. Streptozotocin, mechanism of action. North Holland Biomedical Press 1980; 120(1):1-3

Estos fármacos impiden la oxidación de la glucosa (a nivel del transporte de electrones) provocando la muerte celular y un aumento de la glucosa plasmática en los animales de estudio, ocasionando así la diabetes mellitus insulino-dependiente.

3.4. PÁNCREAS

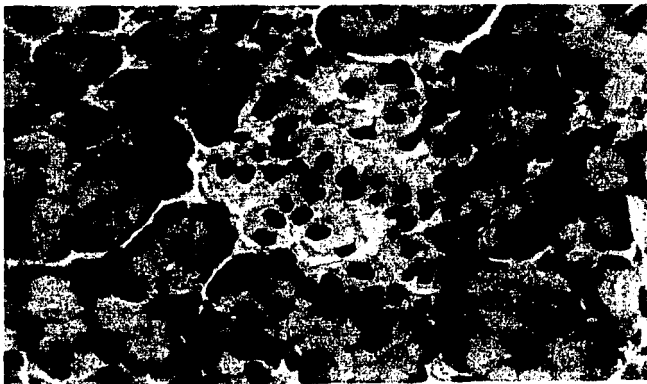
3.4.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

El páncreas es una glándula de secreción exocrina y endocrino que se localiza en el abdomen por detrás del estómago a nivel de la 1a. y 2a. vértebras lumbares, ocupa el espacio comprendido entre el duodeno y el íleon en el humano. En el páncreas se diferencian tres porciones: cabeza, cuerpo y cola, la cabeza se sitúa en la flexión del duodeno, la cara anterior del cuerpo de páncreas esta dirigida hacia la pared posterior del estómago, la cara posterior limita con el tejido retroperitoneal, con el polo superior del riñón izquierdo y la suprarenal, la cara inferior con el intestino delgado, la cola se localiza en el espacio retroperitoneal y llega hasta el íleon (15).

La mayor parte de la parénquima pancreática está compuesto por el aparato de secreción externa, que produce los distintos componentes del jugo pancreático. El 1-2% aproximadamente de la masa del páncreas, esta constituida por tejido endocrino, los islotes de Langerhans cuya vascularización es más rica que la de las porciones restantes, grupos de aglomeraciones de células especiales (foto 1). En el grosor del tejido del páncreas a través de toda su longitud cruza el conducto pancreático, el cual junto con el colédoco desemboca en el duodeno, mientras la irrigación sanguínea del páncreas se efectúa por la arteria pancreático duodenal y las ramas de la arteria lineal, las venas del páncreas desembocan en la vena porta o llegan a ésta por la mesentérica superior. La inervación del páncreas se realiza por ramas del vago simpático.

3.4.2. PÁNCREAS EXÓCRINO

El páncreas exócrino, esta formado por unidades secretoras de acinos pancreáticos; cada uno de ellos contiene cierto número de células glandulares dispuestas de modo que sus secreciones se viertan en conductos intercalares los que se unen para formar los conductos intralobulares que son ramas laterales del conducto pancreático o de Wirsung, que se emerge por la cola del páncreas y se dirige hacia la derecha, entra en relación con el colédoco con el que desemboca en la segunda porción del duodeno, en la papila mayor.



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

FOTO 1. PÁNCREAS EN RATA NORMAL (CELULAS ACINARES E ISLOTES DE LANGERHANS). TINCIÓN CON HEMATOXILINA-EOSINA, AMPLIACIÓN 100X

La porción exócrina del páncreas, comprende aproximadamente el 98-99% del peso total de la glándula, produce el jugo pancreático, cuya secreción se regula por mecanismos humorales y nerviosos (parasimpáticos). El jugo pancreático esta formado por una gran variedad de enzimas como la tripsina, quimiotripsina, carboxipeptidasa, ribonucleasa y desoxirribonucleasa (proteolíticas) así como, amilasa y lipasa pancreáticas para la digestión de carbohidratos y lípidos.

3.4.3. PANCREAS ENDOCRINO

La porción endócrina del páncreas, esta formada de células pequeñas, que en su conjunto representan del 1-2% del peso total del órgano. Estas pequeñas células son los llamados islotes de Langerhans y se encuentran distribuidos en todo el páncreas. El páncreas del individuo adulto contiene de: 208, 000 a 1,760,000 islotes, la mayor parte de ellos se localiza en la cola y el cuerpo(16); cada islote esta abundantemente irrigado por capilares, en los cuales, vierten su contenido. En estos islotes, se encuentran diferentes tipos de células, cada una de ellas tiene una función importante dentro del organismo, así encontramos las células alfa (cerca de la periferia del islote) que constituyen más del 50% de todas las células y producen glucagon; las células beta que producen la insulina y que constituyen del 1 al 2% del total de las células; las células delta constituyen del 2 al 8% del total de las células, producen somatostatina. También se encuentran células productoras del péptido intestinal vaso activo (VIP) o células delta 1; células que producen el polipéptido pancreático (PP), así como grupos de células heterogéneas denominadas EC (enterocromafines), productoras de péptidos como la sustancia P, motilina y encefalina(17).

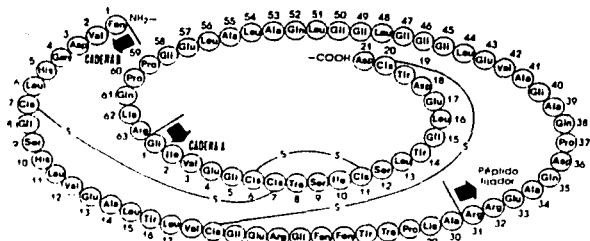


FIGURA 3. ESTRUCTURA DE LA PROINSULINA (SEGUN STEINER)

FUENTE: Kahn CR. The molecular mechanism of insulin action.

Ann Rev Med 1985;36:429-451

TRANS CON
 PALTA DE ORIGEN

La actividad biológica de la proinsulina es aproximadamente el 5% de la actividad de la insulina. Se considera que el lugar de síntesis de la proinsulina es la fracción microsómica de las células beta de los islotes de Langerhans. La transformación de la proinsulina en insulina se realiza en el Aparato de Golgi y en los gránulos secretores (18).

La proinsulina circula en la sangre en pequeñas cantidades. La acción específica de la insulina se relaciona con el aminoácido Cisteína, cuya actividad depende de los grupos disulfuro (-S-S-). En el hombre, en condiciones normales las necesidades diarias de insulina son de 50 U, aproximadamente, y el contenido en el páncreas de un individuo adulto sano es de 150 a 250 U. El nivel sérico de la insulina inmunoreactiva, en las personas sanas es de 19.8 ± 1.01 mU./ml.

La insulina llega al hígado a través de la vena porta; se inactiva casi el 50% bajo la acción de la insulinasas, parte de la insulina no destruida en el hígado se une a las proteínas y la otra queda en estado libre. Del hígado la insulina pasa a la sangre donde circula en forma libre y unida a proteínas. La proporción entre estas dos formas de insulina se determina por el nivel de glucemia; cuando existe hipoglucemia, predomina la fracción unida a proteínas y en caso de hiperglucemia predomina la forma libre. La insulina libre actúa sobre todos los tejidos insulinosensibles; la fracción unida influye sobre el tejido adiposo, pues en este hay peptidasas que liberan la insulina de las proteínas. El periodo de la semidesintegración de la insulina es de 30 minutos. Además del hígado y el tejido adiposo, la insulina se inactiva en los músculos, los riñones y la placenta.

La insulina se secreta mediante un proceso llamado merocitosis, se inicia cuando los gránulos beta se mueven hacia la membrana plasmática de la célula y la membrana superficial se fusiona con la membrana celular que al romperse libera el contenido granular al espacio pericapilar.

Entre los mecanismos que favorecen la secreción de la insulina tenemos:

- a) La absorción de nutrientes y su paso a la circulación sistemática (niveles elevados de ciertos aminoácidos).
- b) Liberación de hormonas gastrointestinales (fundamentalmente el péptido inhibidor de gastrina).
- c) Señales neurogenéticas por la ingestión de alimentos que ha permitido integrar el eje entero insular.

El calcio desempeña un papel importante en la liberación de la insulina la cual se secreta junto con el péptido C (a partir de la fragmentación de la proinsulina a insulina activa) y una pequeña cantidad de proinsulina libre.

3.4.4.1. ACCIÓN METABÓLICA DE LA INSULINA

Las células blanco en donde la insulina ejerce su efecto, poseen receptores específicos, cuyo sitio activo se encuentra en la membrana externa, de esta manera, las células del tejido adiposo y del muscular, contienen receptores de gran afinidad y especificidad para la insulina; a diferencia de otras hormonas polipeptídicas, la insulina al parecer se une al ácido guanosin-3',5'-fosfórico cíclico (GMPc), que actuaría como el segundo mensajero de la activación de la respuesta hormona-receptor, ya que en las células adiposas se observan incrementos en la concentración del GMPc y disminución en la concentración de AMPc. Por otra parte, la insulina aumenta la biosíntesis de triglicéridos a partir de glucosa y disminuye la hidrólisis enzimática de lípidos, induce la conversión de la forma inactiva de la glucogeno sintetasa a su forma activa, intensifica la glucoquinasa y la fosfofructoquinasa, suprime la formación de ciertas enzimas de la glucogénesis (piruvato carboxilasa y la fructosa difosfatasa), favorece la síntesis proteica y ejerce una acción sobre la membrana plasmática de sus células blanco, lo que permite la entrada no solo de glucosa, sino también de aminoácidos, lípidos y potasio, así como la biosíntesis de productos protoplasmáticos y de almacenamiento. El efecto aparente de la insulina cuando se administra a un mamífero, es una reducción rápida del nivel de glucosa en sangre, lo cual se debe, a un aumento del transporte de glucosa desde la sangre a través del membrana plasmática de sus células blancas, hasta el espacio intracelular (20).

3.5. TRASPLANTE DE ISLOTES PANCREÁTICOS.

3.5.1. GENERALIDADES.

La necesidad de corregir el trastorno en el metabolismo de los carbohidratos, causa directa de las lesiones tardías de la diabetes mellitus, sin recurrir al empleo de hipoglucemiantes orales y/o a la administración de insulina exógena, ha motivado el desarrollo del trasplante de páncreas y de islotes pancreáticos. Mediante el trasplante completo de páncreas los resultados obtenidos se aproximan al concepto de curación: normalmente se alcanza la independencia insulínica, es decir el paciente no necesita suministro externo de hormona, normalización de los niveles de hemoglobina A1c, y ausencia de hipoglucemias.

Sin embargo, con independencia de la técnica quirúrgica utilizada, el trasplante completo de páncreas tiene altas tasas de complicaciones o incluso mortalidad. Por estos motivos la mayoría de los pacientes con Diabetes tipo 1 no son candidatos a someterse a un trasplante de páncreas, actualmente se acepta que el trasplante de páncreas es una opción razonable para personas con diabetes y una afectación orgánica severa y progresiva (fallo renal) o inestabilidad metabólica muy grave (repetidas hipoglucemias severas inadvertidas).

Como vía alterna se ha considerado conveniente obtener, aislar y en algunos casos purificar los islotes pancreáticos de individuos sanos para trasplantarlos posteriormente al paciente diabético y así curar la diabetes insulino dependiente (trasplante de islotes pancreáticos), pero es importante utilizar un inmunosupresor que disminuya en gran medida la posibilidad del rechazo (21).

Las técnicas para la obtención, aislamiento, purificación y cultivo de islotes pancreáticos, se desarrollaron a partir de 1965 (Moskalewky), se perfeccionaron con Lacy (1967) y culminaron con el primer trasplante de islotes pancreáticos en 1970 por Yunozai. Posteriormente (1980-1984) y para disminuir el potencial inmunológico (causa de rechazo) el Dr. A. Sun, microencapsuló los islotes pancreáticos, abriéndose así una nueva panorámica para el tratamiento de las diabetes mellitus y/o sus manifestaciones tardías en el hombre (22).

3.5.2. TIPOS DE TRASPLANTE DE ISLOTES PANCREÁTICOS.

- a) Trasplante de islotes aislados de adulto, se basa en la desorganización del, parénquima pancreático por la introducción de solución salina balanceada seguida de fragmentación del tejido pancreático y con digestión enzimática posterior, para separar los islotes de Langerhans del tejido exócrino y purificarlos mediante un gradiente de densidad. Esta técnica a pesar de no tener los inconvenientes que se presentan en el trasplante de páncreas total o segmentario, requiere un alto rendimiento de islotes puros lo cual, hasta nuestros días no ha podido lograrse por cualquiera de los métodos existentes para la purificación de los islotes y en especial de las células beta secretoras de insulina.
- b) Trasplante de islotes intactos con pobre secreción exócrina (páncreas fetal o neonatal), mediante esta técnica se obtienen islotes de páncreas con bajo contenido de enzimas proteolíticas y mayor cantidad de tejido acinar que en el adulto. No se requiere aislar el tejido exócrino del endocrino. La desventaja radica en su potencial inmunológico, aunque la experiencia ha demostrado que cuando se utilizan tejidos de neonatos o de fetos la diferenciación de estos es muy baja, de tal manera, que, la expresión de sus antígenos de histocompatibilidad no están lo suficientemente desarrollados, permitiendo a los receptores reconocerlos como propios y no como extraños, manteniéndose viable el trasplante con ayuda de una terapia inmunosupresora mínima.
- c) Trasplante de páncreas disperso, se obtiene de donadores a los que se les induce la atrofia exócrina o al trasplantar páncreas en sitios con mayor resistencia a la introducción de enzimas pancreáticas.

- d) Trasplante de islotes microencapsulados, la obtención de los islotes es como se describe en el inciso (a), pero tiene la particularidad de que los islotes una vez purificados son microencapsulados en una membrana permeable a la glucosa y a la insulina e impermeable a los anticuerpos, esta membrana no ocasiona reacción alguna con el organismo receptor, lo que mejora los problemas que ocasionan las reacciones de inmunidad del receptor hacia la partícula extraña además, debido a que la membrana es impermeable a los anticuerpos podrían en un momento dado utilizarse islotes de diferentes donadores que tuviesen un diferente HLA, siendo esto de gran provecho no solo para tratar la diabetes sino otras enfermedades en la que están involucrado el efectuar un trasplante (23).

3.5.3. SITIOS DE ADMINISTRACIÓN DEL TRASPLANTE DE ISLOTES.

Una vez elegida la técnica adecuada para la obtención, aislamientos y purificación, es importante seleccionar el medio de cultivo para los islotes pancreáticos ya que de él dependerá obtener con bajo potencial inmunológico a dichos islotes y poder ser trasplantados a los organismos receptores sin problemas de rechazo. Por tal motivo se han probado diversos medios de cultivo y se ha encontrado que el medio adecuado para los islotes pancreáticos es el RPMI-1640 complementado con suero fetal de ternera (0.6 mL), 9 mg. de glucosa, mezcla de antibióticos (estreptomicina-kanamicina) e incubación a 24° C bajo una atmósfera de 95% aire y 5% de CO₂ durante 7 días, obteniéndose así los islotes para ser trasplantados. También, es importante determinar el sitio del implante de estas células, ya que es de suma importancia para una correcta secreción de insulina en estados de hiperglucemia. Los sitios que se han empleado para el trasplante de islotes pancreáticos son:

1. Intraperitoneal.
2. Cavidad torácica.
3. Subcutánea.
4. Subcapsulares.
5. Intramuscular.
6. Esplécnica.
7. Intratesticular.
8. Sistema porta.

De todos estos sitios se ha demostrado que el sistema porta resulta ser el más adecuado para llevar a cabo el implante de islotes ya que se ha observado en estudios histológicos la presencia de los islotes en el hígado, los cuales son funcional y estructuralmente normales, sin signos de congestión, fibrosis u oclusión capilar, además las células beta trasplantadas y los hepatocitos se observaron en yuxtaposición formando complejos intercelulares, lo cual indica que el sistema porta es realmente un lugar excelente para la implantación de los islotes pancreáticos (24).

3.6. ASPECTOS INMUNOLÓGICOS DEL TRASPLANTE.

3.6.1. GENERALIDADES.

Los órganos y tejidos poseen antígenos en su membrana que los diferencia unos a otros, pero se ha encontrado que diversos órganos poseen antígenos comunes, estos

antígenos están fuertemente ligados a los leucocitos y son determinantes de histocompatibilidad, que junto con los antígenos sanguíneos A y B se denominan antígenos de trasplante (25).

El descubrimiento del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MCH) humano data de mediados del decenio de 1950 (26), cuando se encontraron por primera vez los anticuerpos leucoaglutinantes en los sueros de pacientes politransfundidos así como en los sueros de 20-30% de las mujeres multíparas. Estos antígenos participan en la aceptación de los trasplantes de tejido y órganos asociándose con enfermedades específicas en una elevada proporción de casos.

La introducción de los antígenos HLA (Antígenos Leucocitarios Humanos) dentro de los receptores de diferentes grupos de tejidos, induce una respuesta tanto humoral como celular. También denominados Antígenos de Tejidos, los de histocompatibilidad se conocen en otras especies como, H-2 en el ratón, RIH-1 ó Ag-B en la rata, el locus B del pollo, RL-A en el conejo, DL-A o sistema del perro y ChL-a en el chimpancé, etcétera.

Las enfermedades asociadas con los antígenos HLA tienen diversas características dentro de las cuales destacan:

- a) Son de causa y mecanismos fisiopatológicos desconocidos, con un patrón hereditario en cuanto a su distribución pero de penetración débil.
- b) Están asociados con anomalías inmunológicas, y
- c) Tienen o no poco efecto sobre la reproducción.

La región del HLA se encuentra en el brazo corto del cromosoma 6 en el hombre y se divide en 3 subregiones o clases: Clase I que incluye los loci A, C y B; Clase II que incluye los loci DP, DQ y DR clase III que incluye los genes del complemento (27).

Estos genes normalmente se heredan en bloque y se denominan haplotipos HLA, los productos de dos genes HLA varían de un individuo a otro y son determinantes primarios, mediante los cuales los injertos extraños se reconocen y rechazan. Los antígenos HLA-A y HLA-B, se localizan sobre la mayor parte de las células del organismo y son inespecíficos para cualquier clase de tejido individual, dichos antígenos se pierden constantemente y se renuevan en las células nucleadas, en la figura se esquematiza la región de HLA en el brazo corto del cromosoma 6 (28).

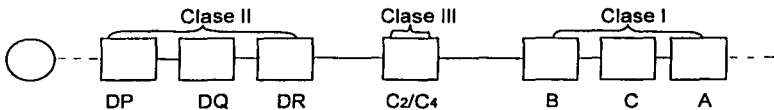


FIGURA 4. REGIÓN DEL HLA EN EL BRAZO CORTO DEL CROMOSOMA 6.

FUENTE: Francesco Cucca, et al. The HLA- DPB1- Associated Component of the IDDM1 and its relationship to the major loci HLA-DQB1, DQA1, and DRB1. Diabetes 2001(50): 1200- 1205.

TESIS CON
FOLIO DE ORIGEN

3.6.2. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS Y GENÉTICAS DEL HLA.

Los antígenos HLA son moléculas protéicas que se adhieren firmemente a la superficie de casi todas las células, parte de la membrana del antígeno se halla embebida en la membrana externa de la célula o la atraviesa.

Estos antígenos son glucoproteínas que se detectan y se clasifican por su capacidad para unirse a anticuerpos específicos, que se forman al inyectar células alogénicas a un animal para inducir las síntesis de anticuerpos específicos dirigidos contra las propias moléculas (29).

El sistema HLA es muy complejo por su gran polimorfismo genético, esto debido a que los genes del sistema se heredan a la manera mendeliana y se comportan como alelos, únicamente un gene está presente en cada locus esto es, tres en cada cromosoma; así, un par de cromosomas contiene seis genes HLA y cada individuo tiene seis antígenos, dos de A, dos de B y dos de C (series SD). Se conocen aproximadamente 60 antígenos de las 3 regiones del conjunto y cada serie puede contener al menos un antígeno no conocido o denominado "blanco", esto se comprueba con el número posible de fenotipos que asciende a millones.

La búsqueda de los genes de la respuesta inmunológica en humanos (Ir) fue estimulada por el reconocimiento de la homología global del complejo HLA con el complejo principal de histocompatibilidad en animales y por el hallazgo de que los equivalentes de la región HLA-D/DR en animales son los sitios donde se ubican los genes Ir en humanos. Una evidencia adicional para la existencia de genes Ir en humanos procede de la susceptibilidad genética a las enfermedades ligadas al HLA (30).

La tipificación de los HLA se emplea primariamente para determinar la compatibilidad HLA antes de un trasplante, para pruebas de paternidad, para estudios antropológicos y para asociar los HLA con diversas enfermedades. Inicialmente se utilizó para identificar a donadores y receptores HLA compatibles o parcialmente compatibles para el trasplante de órganos (31).

Existen enfermedades que pueden asociarse con antígenos HLA así, en la diabetes mellitus insulino-dependiente su asociación original descrita en 1974 fue con la Clase I alelos HLA-B8 y B-15, sin embargo, la mejor asociación definida serológicamente con la diabetes a pesar de que un haplotipo que posea a dichos genes incremento el riesgo de desarrollar la enfermedad, recientemente se ha descrito que la subregión DQ es el sitio primario de influencia genética en la predisposición de la diabetes insulino-dependiente (32).

En nuestro país, se ha encontrado que los haplotipos más comunes ligados con la enfermedad son los siguientes: DSR-B8, C4-A+Q0, DS3-B18, C4-B+Q0, DR4-BW62, C4-A3, C4B3, DR4-B44, teniendo como gen de protección al DR2 y al DQ-W3 como al que aumenta la probabilidad de padecer la enfermedad (33).

3.6.3. INMUNOSUPRESIÓN.

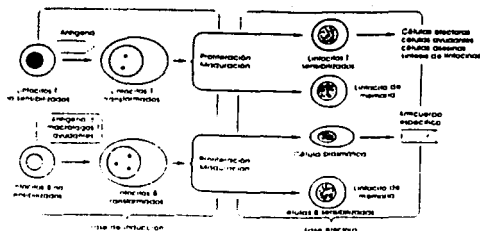
A pesar de que en los trasplantes de órganos tanto al receptor como el donador coincidan en algunos HLA de cualquier clase, se han utilizado inmunosupresores que permiten prolongar la vida media o funcionalidad del órgano trasplantado para contrarrestar la enfermedad.

Para el estudio de la inmunosupresión se han limitado 3 aspectos importantes que por si solos representan los tipos de inmunosupresión existentes:

- a) Falta de respuesta inmunitaria natural o tolerancia, en donde el mecanismo de inducción es la tolerancia al auto-antígeno inducida durante la ontogenia.
- b) Falta de respuesta inmunitaria inducida por enfermedad, en donde la enfermedad por inmunodeficiencia da por resultado intensificación del desarrollo tumoral y con frecuencia infecciones virales, micóticas y bacterianas.
- c) Falta de respuesta inmunitaria artificialmente inducida, el mecanismo de inducción es la parálisis por el antígeno, uso de anticuerpos específicos (suero antilinfocítico, anti-Ig, Tí-I), exceso de anticuerpos para antígenos específicos, tratamiento quirúrgico además de la terapia hormonal, irradiación y el empleo de medicamentos citotóxicos, siendo estos últimos los que más empleo y aceptación están teniendo en los últimos años (34).

3.6.3.1. MEDICAMENTOS CITOTÓXICOS E INMUNOSUPRESIÓN INDUCIDA POR HORMONAS.

Las propiedades inmunosupresoras de los agentes citotóxicos y de los corticoesteroides se han definido de estudios en animales, estos agentes son eficaces en la inhibición de las respuestas humoral y celular contra toda gama de antígenos de prueba sin embargo, no inhibe todas las respuestas inmunitarias en igual forma. Diversos factores se combinan para determinar su potencia con relación a una respuesta inmunitaria seleccionada, así tenemos que una respuesta inmunitaria primaria se inhibe con mayor facilidad que una reacción secundaria o anamnésica. Los medicamentos efectivos en la supresión de una respuesta inmunitaria en un animal no sensibilizado por lo general muestran poca o nula actividad, dicho objeto también se ha observado en los enfermos. Por otra parte las etapas de una respuesta inmunitaria difieren en su susceptibilidad ante los inmunosupresores. Los eventos celulares asociados con un desafío antígeno pueden subdividirse en dos fases: inducción y efectora o fase establecida (figura 5).



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

FIGURA 5. DESARROLLO DE UNA RESPUESTA INMUNITARIA.

FUENTE: Stites DP, Stobo JD, Fudenberg HH, Wells JV. Inmunología clínica. 2a edición. México: Editorial El manual moderno 1981:181-190.

La fase de inducción está dada por el intervalo entre la sensibilización y la generación de los efectores inmunizantes finales; se caracteriza por la rápida expansión proliferativa de las células precursoras, una vez que se han formado los efectores finales, la reacción se considera que ha entrado o penetrado a la fase establecida. La mayoría de los agentes inmunosupresores son efectivos si se emplean inmediatamente antes del antígeno o durante la fase de inducción; son mucho menos activos una vez que la reacción ha penetrado la fase establecida, además una vez que se ha generado una población de linfocitos de memoria, es casi imposible borrar la memoria inmunológica (34).

La efectividad de los agentes inmunosupresores en una respuesta primaria depende de la sincronización relativa al desafío antigénico inicial, basándose en su intervalo efectivo los agentes inmunosupresores se dividen en 3 grupos:

Grupo I: Los agentes que tienen la máxima actividad inmunosupresora solo si administran antes del antígeno, son considerablemente menos efectivos si se emplean después del desafío inmunológico. Se incluyen en este grupo: los corticoesteroides, la radiación y el agente alquilante mecloretamina.

- a) Corticoesteroides.- Las hormonas adrenocorticales se emplean para el tratamiento de la inmunidad aberrante. Las células linfocíticas en el ratón, rata y conejo son susceptibles a estas hormonas y la administración del medicamento conduce a una destrucción celular pronunciada, como contraste los linfocitos normales de los caballos y humanos son resistentes a los corticoesteroides y la terapéutica no provoca linfólisis masiva. El tratamiento con corticoesteroides a largo plazo es inocuo. En muchos casos la administración de dosis altas durante tiempo prolongado causa mayor morbilidad que la misma enfermedad subyacente.
- b) Radiación. - En los modelos animales de experimentación la radiación con rayos X, ha sido usada desde hace tiempo para suprimir las respuestas inmunitarias o para el estudio de las células linfocíticas requeridas para el desarrollo de las

respuestas inmunitarias. La suma de estas evidencias indica que la mayor parte de los linfocitos son sensibles a los rayos X. La radiación induce linfocitopenia profunda en los órganos linfoides y en la circulación general y suprime la mayor parte de las funciones generalizadas en la respuesta inmunitaria.

- c) **Mecloretamina.**- Es un agente alquilante que va a ocasionar una destrucción celular pronunciada en el periodo inmediato a su administración, provoca efectos colaterales graves como son lesión a la médula ósea, al epitelio del sistema digestivo y las células germinales de las gónadas.

Grupo II: Agentes que ejercen propiedades inmunosupresoras sólo si se administran en el periodo inmediatamente después del desafío inmunológico. Estos compuestos no bloquean las reacciones si se emplean antes del antígeno. Los agentes de grupo incluyen los metabolitos citotóxicos como la mercaptopurina (6-MP) y su derivado la Azatioprina, los cuales actúan mediante inhibición competitiva de la enzima para bloquear la síntesis del ácido inosínico, el precursor de los compuestos púricos, ácido adenilico y ácido guanidílico. Estos efectos se manifiestan principalmente por una disminución en la velocidad de replicación celular. La combinación de Azatioprina con los corticosteroides constituye la mejor asociación de medicamentos que inhiben el rechazo de trasplante de órganos, esto sin considerar a la actualidad es el medicamento inmunosupresor de primera elección para el trasplante de órganos.

Grupo III.- Agentes que muestran actividad inhibitorio si se administran antes o después de la estimulación antigénica. Estos medicamentos ejercen su mayor efecto inmunosupresor después del desafío. La ciclofosfamida es el medicamento principal en este grupo, es citotóxico y su empleo esta muy extendido en inmunosupresión, tiene una actividad muy prolongada para las respuestas de anticuerpos humorales, ejerce su mayor efecto sobre la actividad de los linfocitos B además, es específico del ciclo mitótico. La ciclofosfamida no es muy eficaz para prevenir las reacciones del rechazo a los trasplantes por lo tanto, no se emplea para este proceso.

En la actualidad el uso de los agentes inmunosupresores ha alcanzado gran auge e importancia en el trasplante de órganos, por tal motivo se ha tenido que buscar y desarrollar un agente inmunosupresor que evite los efectos colaterales y el rechazo de los trasplantes de órganos que además, mantengan funcional y estructuralmente los órganos trasplantados. Así, a partir de 1978 con la introducción de la ciclosporina A se han disminuido considerablemente los efectos que los agentes, inmunosupresores convencionales provocaban (disminución en el sistema inmune drásticamente), considerando también que este fármaco no es citotóxico y que no tiene actividad antimitótica ha recibido gran atención e importancia siendo ya, el agente inmunosupresor de primera elección a utilizar en el caso de los trasplantes.

La ciclosporina A es un producto extraído de dos especies de hongos que son: *Cylindrocarpum lacidum* y *Tolypocladium inflatum*, con un potente efecto inmunosupresor su empleo se inicio con el trasplante renal utilizando tejidos de cadáveres con resultados impresionantes ya que los tejidos se mantuvieron en los receptores en buenas condiciones y sin evidencia de rechazo durante largo tiempo lo que hizo de la ciclosporina A el medicamento adecuado para los trasplantes (36).

El trasplante de tejidos es una reacción compleja que involucra la producción de la Interleucina I por parte de los macrófagos que estimula a los Linfocitos T cooperadores, estos linfocitos a su vez producen la Interleucina II que permite el desarrollo de los

productores de anticuerpos. Los macrófagos y los Linfocitos T citotóxicos actúan sobre las células trasplantadas para rechazarlas junto con factores humorales como el Interferón. La ciclosporina A inhibe la producción de los Linfocitos T cooperadores y la producción de Interleucina II, bloqueando la secuencia total del rechazo (figura 6).

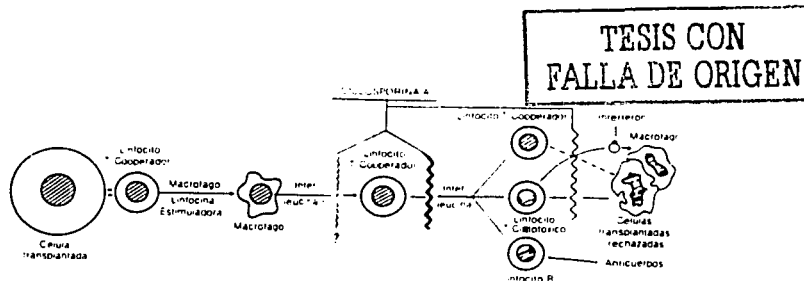


FIGURA 6. SITIOS PROBABLES DE ACCION DE LA CICLOSPORINA A.

FUENTE: Nogueira HJ. Cyclosporine: Development and clinical pharmacology. *Dialysis and Transplantation* 1985; 14(9):539-540.

En la actualidad se ha observado, que la aceptación de aloinjertos es mayor en animales y humanos si se administra en forma continua la Ciclosporina A (36). En contraste con otros agentes inmunosupresores, la Ciclosporina A produce inhibición reversible y selectiva sin suprimir la hematopoyesis.

La ciclosporina A es una droga que tiene varios inconvenientes para su uso ya que es nefrotóxica en mayor proporción que los demás inmunosupresores usados sin embargo, si se emplean cantidades mínimas adecuadas que permitan tener inmunosupresión no se produce daño alguno; también, la hepatotoxicidad es un signo característico cuando se emplean dosis altas de la ciclosporina así como también la hipertrofia de encías, temblor, hiperestesia, susceptibilidad al linfoma e hirsutismo; a pesar de ello, es el fármaco que se emplea para mantener funcional y estructuralmente óptimos los tejidos trasplantados (37).

3.7. NEFROPATÍA DIABÉTICA.

3.7.1. GENERALIDADES.

La nefropatía diabética es una entidad patológica multifacética que va desde cambios continuos hipertróficos renales hasta estados de avanzada distorsión estructural del glomérulo, vasculatura renal, intersticios y túbulos, lo que se traduce clínicamente en proteinuria, hipertensión y disminución de la velocidad de filtración glomerular. La nefropatía representa una glomerulopatía muy avanzada con expansión mesangial que restringe la filtración capilar glomerular superficial y el volumen luminal, estimulado mecanismos análogos

glomerular superficial y el volumen luminal, estimulados por mecanismos análogos que dan por resultado una reducción compensatoria en el número de nefronas sin embargo, estos mecanismos compensatorios inducen alteraciones en la hemodinámica glomerular que mantiene la filtración glomerular y como consecuencia produce el daño renal que es específico de la diabetes mellitus (39)

3.7.2. ESTADIOS DE LA NEFROPATÍA DIABÉTICA.

En la diabetes mellitus los daños estructurales y funcionales del riñón se han dividido en cinco estadios a saber:

- a) Estadio 1. Se caracteriza por hiperfunción e hipertrofia del riñón, estos cambios se establecen desde el diagnóstico de la enfermedad y progresan con la evolución de la diabetes. Es característico de este estadio la excreción urinaria de albúmina que se agrava durante el ejercicio físico. Estos cambios son reversibles con el buen control de la enfermedad.
- b) Estadio 2. Se desarrolla silenciosamente durante muchos años y se caracteriza por lesiones morfológicas sin signos de enfermedad. Sin embargo, pruebas de funcionamiento renal y cortes histológicos la ponen de manifiesto. Durante un buen control de la diabetes, la excreción de la orina es normal, pero el ejercicio físico desenmascara esta anomalía. Un número considerablemente bajo permanece en este estadio durante toda su vida.
- c) Estadio 3. Se denomina de nefropatía incipiente o prenefropatía ya que es el comienzo de la nefropatía diabética. Existen manifestaciones claras de daño renal como son la cantidad en la excreción de albúmina en orina, hipertensión arterial y aumento de la filtración glomerular. El tratamiento hipertensivo en esta fase es bajo observación usando la prueba del ejercicio físico.
- d) Estadio 4. Se manifiesta por proteinuria persistente (0.5 g. / 24 h.), cuando se asocia además un aumento en la presión sanguínea es prácticamente incurable; la función renal es prácticamente nula. El tratamiento antihipertensivo reduce la caída de la velocidad de filtración glomerular en un 60% y pospone la uremia.
- e) Estadio 5. Es el estado final de la nefropatía diabética con uremia franca, se presenta en aproximadamente el 90% de los pacientes insulino-dependientes y es causa de muerte del paciente.

3.7.3. EFECTO DEL TRASPLANTE DE ISLOTES PANCREÁTICOS SOBRE LA NEFROPATÍA.

Al inducir la diabetes mellitus en ratas, éstas desarrollan la glomerulosclerosis nodosa intracapilar características de la nefropatía diabética (síndrome de Kimmelstiel-Wilson). El trasplante de islotes pancreáticos previenen e incluso revierte (en estadios tempranos) las lesiones de la nefropatía lo cual se demuestra por estudios histopatológicos y de laboratorio. El trasplante de islotes pancreáticos en el cuarto estadiode la enfermedad puede revertir y/o prevenir el desarrollo de la misma a la etapa final, lo cual conlleva a la disminución en las tasas de mortalidad y proporciona al paciente diabético nefrótico un mejor nivel de vida.

Para el quinto estadio el trasplante de islotes pancreáticos prácticamente no tiene efecto ya que el riñón ha perdido su función recomendándose en este caso, el trasplante renal y el de islotes.

En la actualidad, se ha microencapsulado los islotes pancreáticos como una alternativa para evitar el rechazo y disminuir a la vez el índice de mortalidad. Es recomendable por otra parte, realizar el trasplante de islotes en estadios tempranos de nefropatía para revertir y evitar que progrese el daño renal.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En virtud de que la diabetes mellitus es un padecimiento de etiología múltiple cuya prevalencia y número de casos se incremento año con año y debido a que el empleo de la insulina no ha resultado ser efectivo en su tratamiento, permitiendo el incremento de las tasa de morbilidad y mortalidad así como las complicaciones secundarias a la misma en nuestro país, nos hemos motivado a implementar y desarrollar a nivel experimental el trasplante de islotes pancreáticos en modelo de ratas síngénicas, de forma tal, que nos permita familiarizarnos con la metodología, obtener un mejor conocimiento de la diabetes mellitus, la nefropatía diabética y del efecto del trasplante de islotes pancreáticos en dichas entidades.

5. FUNDAMENTACIÓN DEL PROYECTO.

Debido a que la diabetes mellitus insulino-dependiente es una enfermedad autoinmune que se caracteriza por la producción de autoanticuerpos que destruyen las células beta del páncreas secretoras de insulina que ha ocasionado en nuestro país, un incremento considerable en los índices de morbilidad y mortalidad representando el 1.5% de los pacientes diabéticos, y que además la insulina administrada por vía exógena no ha sido eficaz para el tratamiento de la diabetes y para la prevención de sus complicaciones tardías, nos proponemos en este estudio el corregir el trastorno en el metabolismo de los carbohidratos sin recurrir al empleo de hipoglucemiantes orales y/o a la administración de insulina exógena así como a prevenir las complicaciones tardías de la enfermedad mediante el trasplante de islotes pancreáticos, de tal manera que estableciendo la metodología y sitios adecuados para efectuar el trasplante se resolverá en este modelo experimental, el trastorno en el metabolismo de los carbohidratos, así como prevenir y en su caso revertir las complicaciones secundarias de la enfermedad como lo es la nefropatía, encontrando así una ruta alterna que nos ayudará a otorgar un tratamiento y control efectivo de la enfermedad.

6. HIPÓTESIS.

El trasplante singénico por vía intraportal de islotes pancreáticos en ratas con diabetes inducida normaliza la glucemia y consecuentemente previene y revierte las lesiones renales secundarias al descontrol metabólico.

7. OBJETIVOS.

- 1. Implementar la metodología del trasplante de islotes pancreáticos mediante un modelo experimental en ratas.**
- 2. Revertir el estado diabético inducido farmacológicamente en ratas, mediante el trasplante de islotes pancreáticos.**
- 3. Demostrar y evitar las lesiones renales secundarias a la diabetes mellitus y el efecto que el trasplante de islotes pancreáticos ejerce sobre ellas.**

8. MÉTODOS.

8.1. OBTENCIÓN DEL TEJIDO PANCREÁTICO.

Para esta etapa se requirieron 40 ratas Sprague-Dawley de 2 meses de edad, singénicas, machos y peso aproximado a 200 g. Se sacrificaron en una cámara de cloroformo las ratas Sprague Dawley singénicas, se disecó por planos la pared abdominal hasta exponer el conducto biliar común, cerca del ileo hepático, para obturar el extremo distal de dicho conducto cerca de su desembocadura en el duodeno, en el extremo proximal del conducto, se realizó una incisión pequeña por donde se perfundieron a través de un catéter 20 mL de solución de Hanks fría para distender el tejido pancreático exócrino; el páncreas distendido se removió y se depositó en una caja petri con solución de Hanks fría lavándose en 3 ocasiones para posteriormente fragmentarlo con tijeras en trozos de 1 a 2 mm.

8.2. AISLAMIENTO DE ISLOTES PANCREÁTICOS.

El páncreas fragmentado se colocó en tubos de vidrio con tapa de baquelita estériles en presencia de Colagenasa tipo IV (Sigma) a una concentración de 1000 U/mL y un volumen equivalente a la mitad del ocupado por el tejido pancreático; se agitó durante 6 minutos en baño maría a 37° C, enseguida se agregaron 8 mL de solución de Hanks fría para detener la acción enzimática procediendo a retirar los tubos del baño maría, se separaron los islotes por sedimentación y se colocaron en tubos de vidrio con tapón de vidrio estériles en hielo, este procedimiento se repite 2 veces más con el sedimento de la primera digestión, variando las concentraciones de colagenasa a 500 U/mL y 250 U/mL con agitación e incubación de 1 minuto.

8.3. PURIFICACIÓN DE ISLOTES PANCREÁTICOS.

El paquete con los islotes obtenidos por digestión enzimática se pasó por un gradiente de densidad (Ficoll-Hypaque) con una densidad de 1.075 g/mL contrifugándose a 800 g durante 10 minutos tiempo al cual, se separó la banda de islotes ya purificados (aproximadamente 400 islotes por rata).

8.4. CULTIVO DE ISLOTES PANCREÁTICOS.

Los islotes ya purificados se cultivaron en medio RPMI-1640, complementado con 0.6 mL de suero fetal de ternera, una mezcla de antibióticos (Estreptomicina-Kanamicina) y 9 mL de glucosa, incubando a 24° C bajo una atmósfera de 95% aire y 5% de CO₂ durante 7 días, con el objeto de disminuir el potencial inmunológico (40) de los islotes pancreáticos (leucocitos-viajeros). La viabilidad de los islotes se verificó mediante microscopia de luz y prueba de permeabilidad con azul de tripano.

8.5. INDUCCIÓN DE LA DIABETES MELLITUS.

Para esta etapa se requirieron 30 ratas Sprague-Dawley de 2 meses de edad, singénicas, machos y peso aproximado de 200 g.

A cada una de las ratas Sprague-Dawley singénicas se les administró previa determinación de glucosa en ayuno de 18 horas, 2 dosis de aloxana siendo cada una de ellas, el 75% de la dosis total reportada por el Dr. Lacy et al (41),

que es de 43.5 mg/kg de peso, aplicándose la segunda dosis 3 días después de la primera vía intravenosa (vena del pene) además de administrar por vía intraperitoneal 2 mL de glucosa al 30%. La confirmación de la diabetes se realizó, mediante las cifras de glucosa determinadas durante 20 días, también se descartó la existencia de daño renal por la búsqueda de la lesión glomerular en biopsias teñidas con Hematoxilina-Eosina y P.A.S. (Ácido Peryódico-Schiff). Se seleccionaron como candidatos a trasplante de islotes aquellas ratas sin evidencia de daño renal y cuyos valores de glucosa fueron mayores o iguales a 400 mg/dL (Glucometer II y/o con tira reactiva Dextrostix II-Ames), también fueron eliminadas del estudio aquellas ratas que murieron a causa de la misma diabetes, por infecciones ó infestaciones.

8.6. TRASPLANTE DE ISLOTES PANCREÁTICOS.

Cada rata diabética y sin evidencia de lesión renal se anestesió con cloroformo, se incidió la pared abdominal por planos hasta exponer la vena porta a través de la cual, se perfundieron los islotes pancreáticos (aproximadamente 800), al final se suturó la pared abdominal por planos, se le administro ciclosporina A como inmunosupresor por vía intraperitoneal (5mg/Kg. de peso), y 2 mL de Penicilina G procaína por vía intramuscular, colocando a cada una de las ratas trasplantadas en jaulas metabólicas para su evaluación posterior.

El éxito o rechazo del trasplante se evaluó mediante la determinación de glucosa en sangre, considerándolo exitoso, cuando los valores de glucosa sanguínea descendieron a valores normales. Las ratas trasplantadas se dejaron evolucionar en forma espontánea y se realizaron biopsias renales cada mes durante 4 meses para valorar el efecto del trasplante de islotes pancreáticos sobre la prevención del desarrollo de la nefropatía diabética.

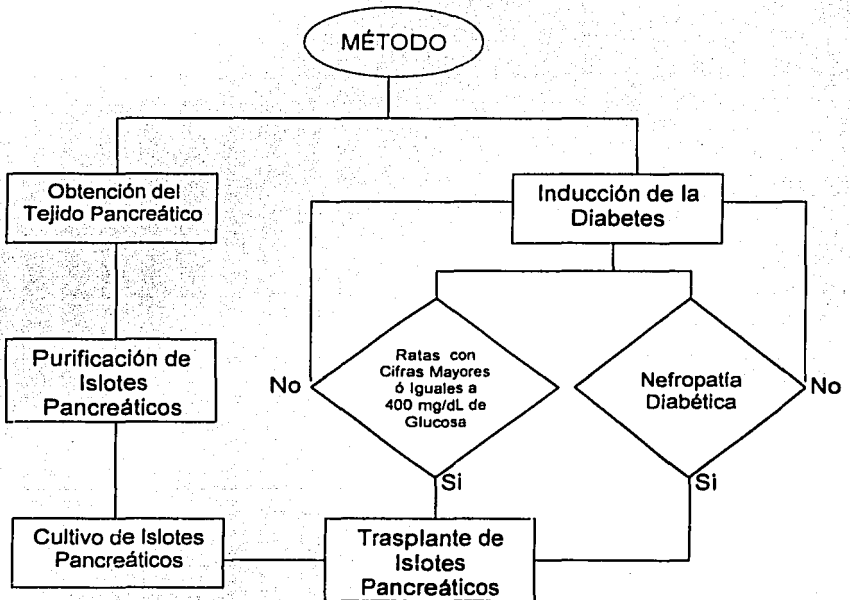
8.7. NEFROPATÍA DIABÉTICA Y TRASPLANTE DE ISLOTES.

Para esta etapa se requirieron 20 ratas Sprague-Dawley de 2 meses de edad, síngénicos. machos y peso aproximado a 200 g.

A cada una de las ratas se les indujo la diabetes como se indica en el punto 8.5., dejándolas evolucionar hasta tener evidencia de la nefropatía por proteinuria e identificación de las lesiones glomerulares por microscopio de luz. Se realizaron tinciones con Hematoxilina-Eosina para evaluar las lesiones glomerulares y tinciones con P.A.S. para evaluar el mesangio y las membranas basales del ovillo glomerular. La obtención de este material fue por biopsia renal a cielo abierto.

8.8. DIAGRAMA DE FLUJO

TRASPLANTE SINGÉNICO DE ISLOTES PANCREÁTICOS EN RATAS CON DIABETES INDUCIDA Y NEFROPATÍA



9. RESULTADOS.

9.1. OBTENCIÓN, AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN y CULTIVO DE ISLOTES PANCREÁTICOS.

Los islotes pancreáticos se obtuvieron, aislaron, purificaron y cultivaron mediante los métodos ya descritos, obteniéndose un rendimiento aproximado de 400 islotes por rata. La viabilidad se verificó mediante microscopía de luz y tinción con hematoxilina-eosina (observándose a los islotes pancreáticos con gránulos de color azul solubles en alcohol) fotos 2 y 3, así como por permeabilidad con azul de tripano

9.2. INDUCCIÓN DE LA DIABETES MELLITUS.

La inducción del estado diabético se realizó farmacológicamente utilizando aloxana de acuerdo al método descrito.

Las ratas presentaron hiperglucemia a las 72 horas de administrada la segunda dosis de aloxana, el estado diabético se mantuvo durante 20 días con cifras semicuantitativas mayores o iguales a 400 mg/dL de glucosa (comprobación contra grupo control, grafica 1 y 2) y se mantuvo mediante la administración de 3u de insulina intermedia cada 24 horas hasta que se efectuó el trasplante el daño renal se descartó mediante biopsias teñidas con hematoxilina-eosina y P.A.S. (fotos 4 y 5)

9.3. TRASPLANTE DE ISLOTES PANCREÁTICOS.

El trasplante de islotes pancreáticos obtenidos, aislados, purificados y cultivados (800 aproximadamente por rata receptor), se realizó por vía porta (ver método), en aquellas ratas que presentaron cifras de glucosa semicuantitativas mayores ó iguales a 400, mg/dL durante 20 días consecutivos, observándose (gráfica 3 y 4) disminución paulatina de la glucosa sanguínea a partir del tercer día de trasplante hasta normalizarse y permanecer euglucémicas durante 120 días (valores normales de glucosa sanguínea en ratas Sprague-Dawley 95-117 mg/dL de glucosa). El daño renal post-trasplante se descartó a los 2 y 4 meses mediante biopsias teñidas con hematoxilina-eosina y P.A.S. (fotos 6 y 7). En la gráfica 5 se resume todo el proceso de la inducción, mantenimiento del estado diabético, trasplante de islotes pancreáticos y la normalización de los niveles de glucosa sanguínea.

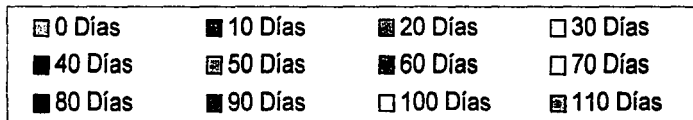
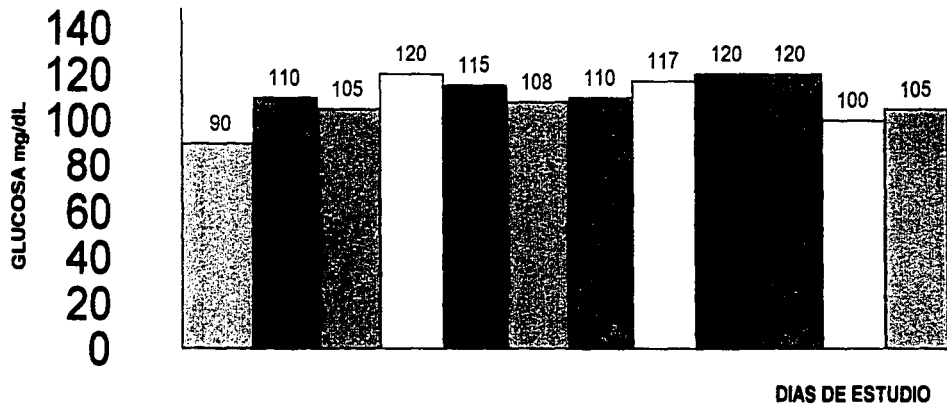
9.4. NEFROPATIA DIABÉTICA.

La nefropatía diabética se obtuvo al dejar evolucionar espontáneamente (durante 6 meses) la diabetes mellitus inducida con aloxana en 20 ratas Sprague-Dawley machos de 2 meses de edad, y peso aproximado a 200 g, realizando determinaciones de glucosa en sangre (alrededor de 400 mg/dL semicuantitativo), proteinúria a los 3 meses con cifras de 220 mg/24 horas (normal 9.0 mg/24 horas), y posteriormente a los 5 meses con cifras de 450 mg/24 horas, los niveles de albúmina en orina fueron de 120 mg/24 horas a los 3 meses (normal 4.0 mg/24 horas) y 260 mg/24 a los 5 meses, datos que nos muestran una nefropatía franca, además de que se realizó el estudio

histopatológico en 2 ratas sacrificadas a los 3 meses de evolución espontánea de la diabetes inducida, encontrándose lesiones compatibles con la nefropatía incipiente (estadios 1 a 3 de clasificación de Mogensen, et al.) (48), donde además se aprecia la expansión mesangial y alteraciones en las membranas basales así como lesiones glomerulares en las tinciones con P.A.S. y hematoxilina-eosina (fotos 8 y 9); a los 4 y medio meses se sacrificaron nuevamente 2 ratas encontrando lesiones características de los estadios 3 y 4 en los cuales la congestión renal se acentúa en mayor proporción (fotos 10 y 11) y finalmente, a los 6 meses se sacrificaron 2 ratas que presentaron lesiones correspondientes al estadio 5, observándose la autólisis del riñón y la producción de glomerulonefritis, sin embargo, no se ha visto como en el hombre la glomerulosclerosis típica de la nefropatía (fotos 12, 13, y 14).

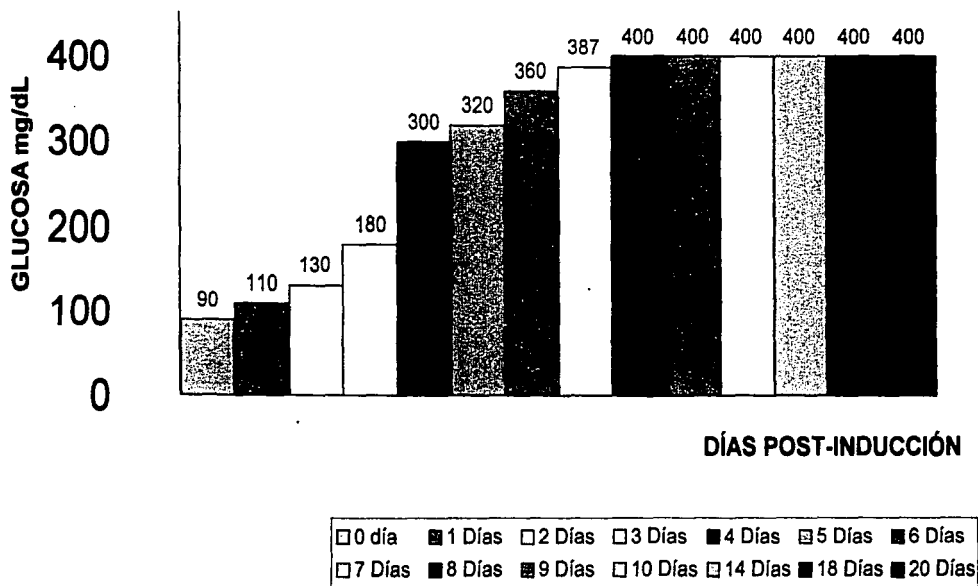
Desafortunadamente no se realizó el trasplante de islotes en ratas con nefropatía debido a las malas condiciones del bioterio, en el que era difícil mantener las ratas libres de infecciones e infestaciones.

NIVELES DE GLUCOSA EN RATAS SPRAGUE-DAWLEY (GPO. CONTROL)
GRAFICA 1



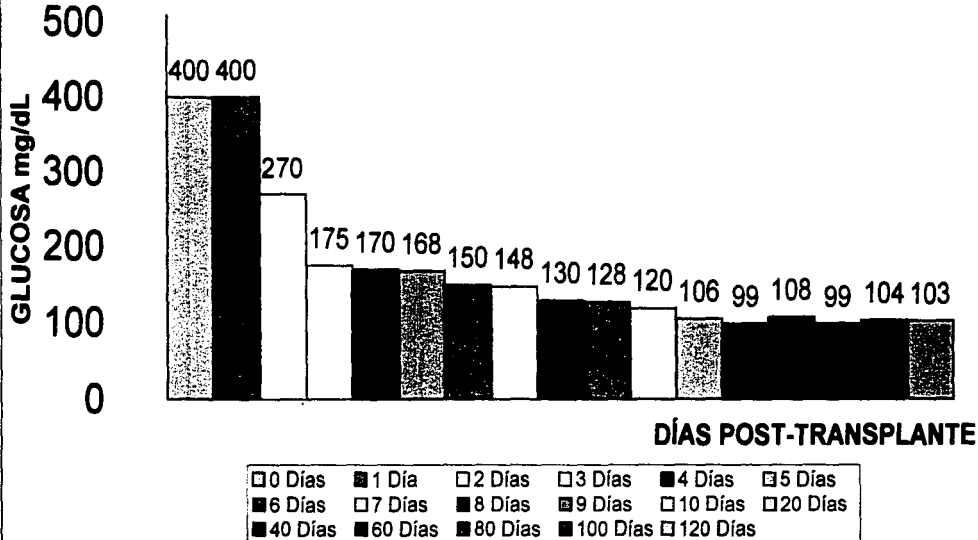
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA SANGUÍNEA EN RATAS CON DIABETES MELLITUS INDUCIDA CON ALOXANA (32 mg/Kg) GRAFICA 2.



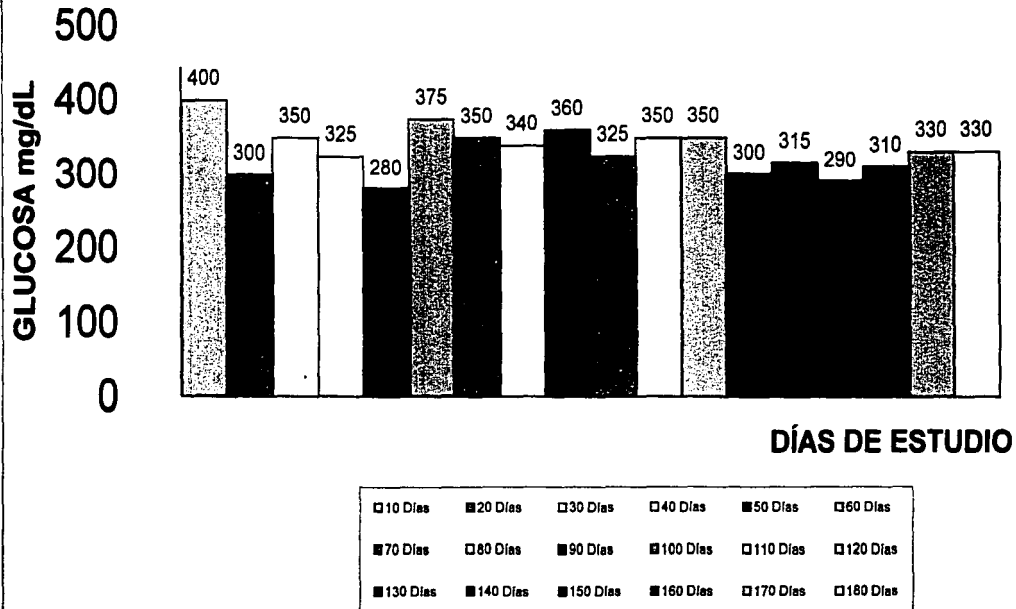
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA SANGUÍNEA EN RATAS CON DIABETES INDUCIDA POR ALOXANA POST-TRANSPLANTE DE ISLOTES PANCREÁTICOS (800 ISLOTES/RATA) GRAFICA 3



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

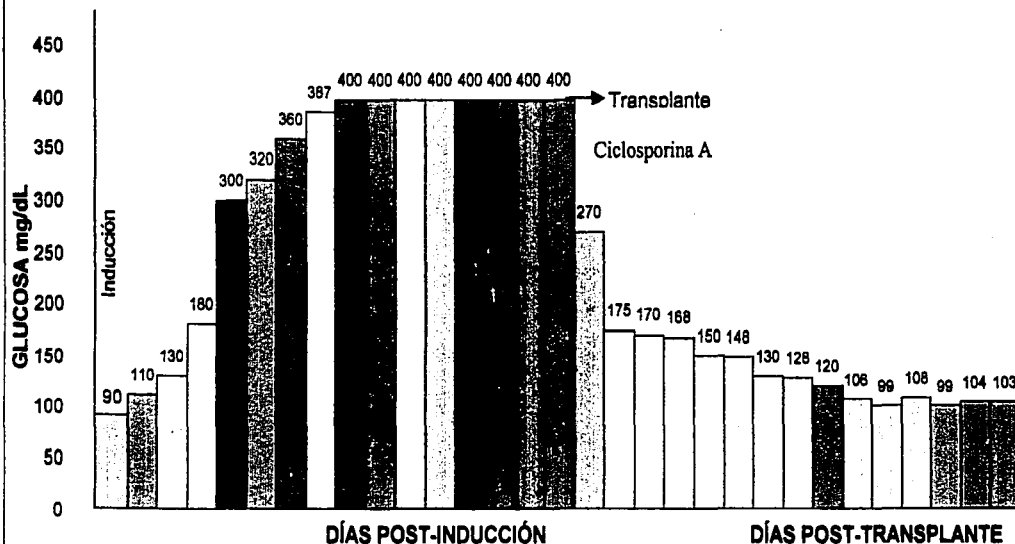
**NIVELES DE GLUCOSA EN RATAS SPRAGUE DAWLEY
HIPERGLUCEMICAS NO TRANSPLANTADAS (GPO. CONTROL)
GRAFICA 4**



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

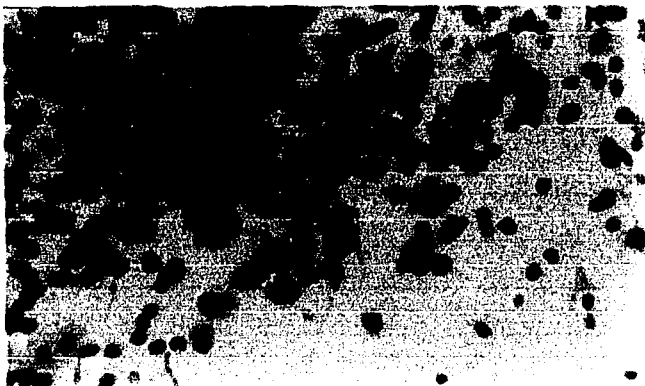
INDUCCIÓN DE LA DIABETES MELLITUS CON ALOXANA Y TRANSPLANTE SINGENICO DE ISLOTES PANCREATICOS EN RATAS SPRAGUE-DAWLEY.

GRAFICA 5



□ 0 Día	▨ 1 Día	▩ 2 Día	▧ 3 Día	▦ 4 Día	▥ 5 Día	▤ 6 Día	▣ 7 Día
▢ 8 Día	□ 9 Día	■ 10 Día	▟ 14 Día	▞ 18 Día	▝ 20 Día	▜ 21 Día	▛ 22 Día
▚ 23 Día	▙ 24 Día	▘ 25 Día	▗ 26 Día	▖ 27 Día	▕ 28 Día	▔ 29 Día	▓ 30 Día
▒ 40 Día	░ 50 Día	▐ 60 Día	▏ 70 Día	▎ 80 Día	▍ 90 Día	▌ 100 Día	

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



**FOTO 2. ISLOTES PANCREÁTICOS CULTIVADOS (HEMATOXILINA-EOSINA)
AUMENTO 100X. RATAS SPRAGUE-DAWLEY**



**FOTO 3. ISLOTES PANCREÁTICOS CULTIVADOS (HEMATOXILINA-EOSINA)
AUMENTO 100X. RATAS SPRAGUE-DAWLEY**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



FOTO 4. CORTE HISTOLÓGICO DE RIÑÓN SIN ALTERACIÓN EN RATAS SPRAGUE-DAWLEY CON DIABETES INDUCIDA (HEMATOXILINA-EOSINA) AUMENTO 100X.



FOTO 5. CORTE HISTOLÓGICO DE RIÑÓN SIN ALTERACIÓN EN RATAS SPRAGUE-DAWLEY CON DIABETES INDUCIDA (ÁCIDO PERYÓDICO-SCHIFF) AUMENTO 100X.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



FOTO 6. CORTE HISTOLÓGICO EN RIÑÓN SIN ALTERACIÓN EN RATAS SPRAGUE-DAWLEY CON DIABETES INDUCIDA POST-TRASPLANTADA (HEMATOXILINA-EOSINA) AUMENTO 100X.



FOTO 7. CORTE HISTOLÓGICO DE RIÑÓN SIN ALTERACIÓN EN RATAS SPRAGUE-DAWLEY CON DIABETES INDUCIDA POST-TRASPLANTADA (ÁCIDO PERYÓDICO-SHIFF) AUMENTO 100X.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



FOTO 8. CORTE HISTOLÓGICO DE RIÑÓN, EXPANSIÓN MESANGIAL Y ALTERACIÓN EN MEMBRANAS BASEALES EN RATAS SPRAGUE-DAWLEY CON DIABETES INDUCIDA DE 3 MESES DE EVOLUCIÓN ESPONTÁNEA (ÁCIDO PERYÓDICO-SHIFF) AUMENTO 100X.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FOTO 9. CORTE HISTOLÓGICO DE RIÑÓN, EXPANSIÓN MESANGIAL Y ALTERACIÓN EN MEMBRANAS BASEALES EN RATAS SPRAGUE-DAWLEY CON DIABETES INDUCIDA DE 3 MESES DE EVOLUCIÓN ESPONTÁNEA (HEMATOXILINA-EOSINA) AUMENTO 100X.



FOTO 10. CORTE HISTOLÓGICO DE RIÑÓN CON CONGESTIÓN RENAL EN RATAS SPRAGUE-DAWLEY CON DIABETES INDUCIDA DE 4 Y MEDIO MESES DE EVOLUCIÓN ESPONTÁNEA (ÁCIDO PERYÓDICO-SCHIFF) AUMENTO 100X.

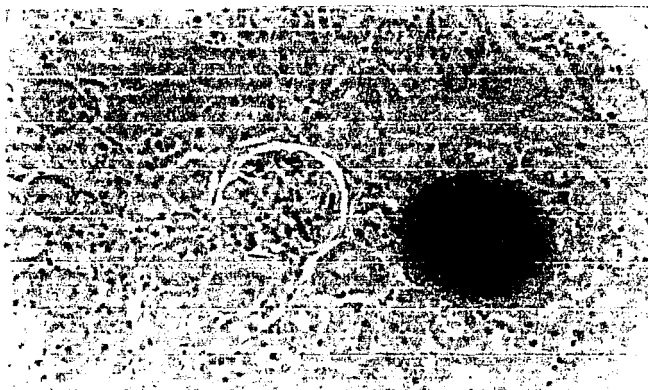


FOTO 11. CORTE HISTOLÓGICO DE RIÑÓN CON CONGESTIÓN RENAL EN RATAS SPRAGUE-DAWLEY CON DIABETES INDUCIDA DE 4 Y MEDIO MESES DE EVOLUCIÓN ESPONTÁNEA (HEMATOXILINA-EOSINA) AUMENTO 100 X.

TESTE CON
FALLA DE ORIGEN

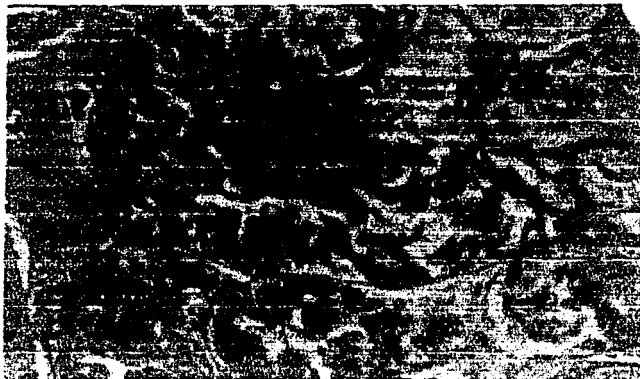


FOTO 12. CORTE HISTOLÓGICO DE RIÑÓN CON AUTOLISIS EN RATAS SPRAGUE-DAWLEY CON DIABETES INDUCIDA DE 6 MESES DE EVOLUCIÓN ESPONTÁNEA (HEMATOXILINA-EOSINA) AUMENTO 100X.



FOTO 13. CORTE HISTOLÓGICO DE RIÑÓN CON AUTOLISIS EN RATAS SPRAGUE-DAWLEY CON DIABETES INDUCIDA DE 6 MESES DE EVOLUCIÓN ESPONTÁNEA (HEMATOXILINA-EOSINA) AUMENTO 100X.

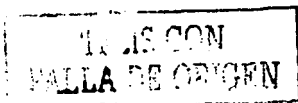
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

42



FIGURA 14. CORTE HISTOLÓGICO DE RIÑÓN CON GLOMERULOESCLEROSIS EN RATAS SPRAGUE-DAWLEY CON DIABETES INDUCIDA DE 6 MESES DE EVOLUCIÓN ESPONTÁNEA (HEMATOXILINA-EOSINA) AUMENTO 100X.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



10. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.

El modelo farmacológico de la diabetes mellitus insulino dependiente con aloxana en rata Sprague-Dawley nos permitió valorar efecto que tiene el trasplante de islotes pancreáticos sobre dicha enfermedad.

Así tenemos que, la obtención de los islotes pancreáticos fue posible a pesar de no lograr aislarlos en forma pura por medio de gradiente de densidad con el Ficoll-Hypaque ya que se obtiene además, tejido exócrino y tejido conectivo sin digerir por la colagenasa tipo IV. Actualmente no se han obtenido los islotes pancreáticos totalmente puros con las técnicas existentes sin embargo han servido bajo terapia irrimunosupresora. Dentro de las técnicas de cultivo se encontró que la atmósfera de 95% aire y 5% CO₂ para los islotes pancreáticos constituía la mayor forma de disminuir los leucocitos viajeros (leucocitos K) y poder trasplantar los islotes pancreáticos sin problema alguno.

La inducción del estado diabético farmacológicamente en ratas fue posible mediante la administración de dos dosis de aloxana cada tercer día siendo cada una de éstas el 75% de la dosis reportada por la literatura (43.5 mg/kg peso). El estado diabético se mantuvo bajo terapia insulínica (3U carla 24 horas) evitando así la muerte de los animales por cetoácidosis, permitiéndonos de esta forma obtener y establecer el modelo de diabetes en ratas para llevar a cabo el trasplante de islotes pancreáticos.

Una vez que obtuvimos los islotes pancreáticos cultivados y viables, así como los animales de estudio con cifras de glucosa que nos indicaron una diabetes franca, efectuamos los trasplantes de islotes pancreáticos midiendo el efecto regulatorio que ejerce sobre los niveles de glucosa sanguínea y el establecimiento inmediato de un estado de euglucemia al cuarto día, lo que demuestra que el trasplante de islotes pancreáticos normaliza la glucosa sanguínea en las ratas con diabetes mellitus inducida farmacológicamente además, de que previene el desarrollo de las complicaciones renales tal como lo demostró el estudio histopatológico.

Cabe señalar que se administro ciclosporina A como irrimunosupresor durante los primeros días post-trasplante con el objeto de evitar cualquier signo de rechazo (a pesar de ser un trasplante singénico) suspendiéndose esta terapia 5 días después del trasplante sin ocurrir rechazo posterior.

En cuanto a la nefropatía diabética desafortunadamente nos fue imposible valorar el efecto que el trasplante de islotes pancreáticos ejerce sobre dicha patología, ya que no conseguimos obtener un número considerable de ratas con esta enfermedad sin embargo, con algunos animales nos fue posible el identificar las lesiones características de la nefropatía, así tenemos evidencias mediante cortes histológicos teñidos con Hematoxilina-Eosina y P.A.S. de los estadios 1, 2, 3, 4 y 5 pero, es difícil mantener a los animales entre los estadios 4 y 5 aun bajo terapia insulínica (insulina intermedia y rápida) ya que los animales mueren, probablemente debido a las malas condiciones del bioterio que propiciaron el desarrollo de las infecciones respiratorias que se vieron disminuidas al administrar antibióticos (Kanamicina) al agua sin embargo, la sobrevida de los animales no aumentó considerablemente.

Estos resultados nos muestran que las ratas con diabetes mellitus inducida farmacológicamente y con evolución espontánea a nefropatía, presentan los mismos signos característicos que el hombre, lo que permitirá valorar con gran significancia el efecto que tiene el trasplante de islotes pancreáticos sobre la nefropatía en sus diferentes estadios, ya que al menos se demostró que tiene un efecto preventivo pero aún no en estadios en que el daño renal es reversible.

11. CONCLUSIONES.

- 11.1. Es posible obtener los islotes pancreáticos de las ratas para ser cultivados y disminuir así su potencial inmunológico para trasplantarlos.
- 11.2. El estado diabético se logró mediante la administración de aloxana en 2 dosis, siendo cada una de ellas de 32.62 mg/kg de peso, administrándose la segunda dosis tres días después de la primera, manifestándose en las ratas cifras de glucosa mayores ó iguales a 400 mg/dL de glucosa
- 11.3. Es necesario mantener a las ratas con cifras de glucosa mayores ó iguales a 400 mg/dL para evitar su muerte por cetoacidosis, esto se logró administrando insulina intermedia (3U) cada 24 horas.
- 11.4. Al realizar el trasplante de islotes pancreáticos a las ratas con diabetes mellitus inducida con aloxana, se logró revertir este estado manteniendo la euglucemia y previniendo así el desarrollo de las complicaciones tardías de la nefropatía (Estadios 1,2,3,4 y 5).
- 11.5. El empleo de Ciclosporina A favorece la aceptación de los islotes pancreáticos trasplantados evitando los fenómenos de rechazo a pesar de solo administrarla por 5 días post-trasplante.
- 11.6. En este modelo singénico, la nefropatía desarrollada en ratas con diabetes mellitus inducida farmacológicamente produce las mismas lesiones que en el hombre pero, su evolución es más rápida, lo que favorece un alto porcentaje de mortalidad, resultando imposible valorar el efecto que ejerce el trasplante de islotes pancreáticos sobre esta patología. Sin embargo, se identificaron y evaluaron los estadios característicos de la enfermedad, logrando así tener un conocimiento más amplio de éstos.
- 11.7. Una vez que en este modelo se mantenga la sobrevivida de las ratas con las lesiones características de la nefropatía, se propone llevar a cabo el trasplante de islotes pancreáticos para evaluar el efecto que tiene (revisión y control) sobre las mismas.

12. REFERENCIAS.

1. "Incidence of childhood type I diabetes worldwide" (2000). Diabetes Mondiale (Dia Mond) Project Group. Diabetes Care 23:1516-1620.
2. Lacy PE, Kostianovsky M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. Diabetes 1967;16:35-39.
3. Younoszai R, Sorensen R. Homotransplantation of isolated islets. Diabetes 1970;19(1):406.
4. Strauts RL. Studies of hereditary-obese (ob/ob) after implantation of pancreatic islets in Millipore filter capsules. Diabetologia 1970;6:306.
5. Ballinger WF, Lacy PE. Transplantation of intact pancreatic islets in rat. Surgery 1972;72:175-186.
6. Kemp CB, Knight MJ. Effect of transplantation site on results of pancreatic islets isografts in diabetic rats. Diabetologia 1973;9:489.
7. Lim F, Sun A. Microencapsulated islets as bioartificial endocrino pancreas. Science 1980;210:908-910.
8. Shimakov VI, Bljumkin VN, Ignatenko SN, Skaletsky NN, Slovesnova TA, Babikova RA. The principal results of pancreatic islet cell culture transplantation in diabetes mellitus patients. Transplant Procedure 1987;19:2372.
9. Clayton HA, James RF. Islets microencapsulation: a review. Acta Diabetologia 1993;30(4):181-189.
10. Brunicardi FC, Mullen Y. Issues in clinical islet transplantation. Pancreas 1994;9(3):281-290.
11. Islets Transplantation in seven patients with type 1 Diabetes Mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. New England Journal of Medicine 2000;343:230-238.
12. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care 2000;23:S4-S19.
13. Mauer SM. Pancreatic islets transplantation. Diabetes 1974;23(9):748-753.
14. Agarwal MK. Streptozotocin; mechanism of action. North Holland Biomedical Press 1980;120(1):1-3.
15. Potiomkin VV. Endocrinología. 5ª. Edición. Moscú URSS; Editorial Mir 1984:560-570.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

16. Langford GA, et al. In vivo análisis of porcine endogenous retrovirus statement in transgenic pigs (2000). *Transplantation* 72:1996-2000.
17. Greenspan FS, Strewler GL. *Endocrinología Básica y Clínica*. 4ª. Edición. México. Editorial El Manual Moderno 1998 677-683
18. Georgiou HM. Pancreatic islet transplantation across partial major histocompatibility complex barriers. *Transplant Procedures* 1985;17(2):1723-7.
19. Kahn CR. The molecular mechanism of insulin action. *Ann Rev Med* 1985;36:429-451.
20. Mercado R. Insulina al alcance de todos. *Información Científica y Tecnológica* 1984;6(96):38.
21. Lacy PE, Kostianovsky M. Method for isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. 1967;16:35-39.
22. Stevens, RD, et al. Islet transplantation analitic therapy for the treatment of type 1 diabetes in the near future? (2001), *Clinical Diabetes* 19:51-60.
23. Amammo WA. Transplantation of islets cells. *Diabetes* 1984;7:786-789.
24. Lim F, Sun a. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* 1980;210:989.
25. Rappaport FT. The immunobiology of transplantation. *Surgical Clinics of North America* 1978;58(2):221-243.
26. Bach FH. The major histocompatibility complex. *The New England Journal of Medicine* 1976;29:806-812.
27. Berkos AS. Distribution of histocompatibility antigens and their combinations in patients with type I diabetes mellitus. *Vestn Akad Medd Navk* 1988;7(7):28-31.
28. De berandis P. The majority of the activated T cell in the blood of insulin-dependent diabetes mellitus. *Clinical Immunology* 1988;73(2):225-259.
29. Sutton M. HLA A,B,C, and DR association with insulin-dependent diabetes. *Metabolism* 1988;37(11):1005-1007.
30. Moncada E. Immunoregulation in juvenile diabetes. *Revista Clinica Española* 1988;183(2):61-66.
31. Thomsen M. The susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. *Immunogenetics* 1988;28(5):320-327.
32. Nepone GT and Kwort VVV. Molecular Basis for HLA-DQ associations with IDDM. *Diabetes* 1998 (47):1777-1784.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

33. Memorias de la II Reunión de Diabetes Mellitus Insulino-dependiente. México 1989:4.
34. De berandis p Immunoregulation. Lance 1988 2 823-824
35. Stites DP, Stobo, JD, Fudendergh RH, Wells JV. Inmunología Clínica 2ª Edición. México Editorial El Manual Moderno 1981 181-190
36. Dos Reis G. Cyclosporin A. The Journal of Immunology 1982 129(6) 2360-2366
37. Nogueira HJ. Cyclosporine. Development and clinical pharmacology. Dialysis and Transplantation 1985, 14(9) 539-540
38. Beveridge T. Cyclosporine Nephrotoxicity. Annal of International Medicine 1983;99(6):851-854
39. Mogensen CE, Christensen CK, Vittinghus E. The stages in diabetic renal disease. Diabetes 1983;(2) 64-77.
40. Lafferty KJ. Immunobiology of tissue transplantation: a return to the passenger leucocyte concept. Annal review Immunology 1983;1:147.
41. Lacy PE. Perifusion of isolated rat islets in vitro. Diabetes 1972;21(10):987-998.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN