



1977 7/14
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"

EFFECTO DEL SUERO EN LA SOBREVIDA DE
ALOINJERTOS DE PANCREAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A I

MARIA ANGELA BARRERA CORTEZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

I N D I C E

INTRODUCCION Y ANTECEDENTES DEL TEMA	1
FUNDAMENTOS DE LA ELECCION DEL TEMA	31
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	32
OBJETIVOS	33
hipóTESIS	34
MATERIAL Y METODOS	
Material	35
Equipo	37
Reactivos	38
material biológico	39
Preparación de soluciones	40
métodos	41
RESULTADOS	48
GRAFICAS	54
DISCUSION DE RESULTADOS	63
CONCLUSIONES	71
BIBLIOGRAFIA	72

INTRODUCCION

HISTORIA DE LA LIMNOLOGIA

ANTECEDENTES HISTORICOS.

La inmunología constituye una rama relativamente joven en la ciencia de la medicina. El término inmune deriva del latín *immunis*, esto es exento de "cargos". Sin embargo durante casi un siglo, el término inmunidad ha denotado la resistencia al posible ataque por algún agente agente infeccioso. La resistencia a segundos ataques de ciertas enfermedades ya había sido observada, aun en la antigüedad. (10).

Se sabe desde tiempos inmemorables que muchas enfermedades que hoy conocemos como transmisibles, entre otras, las virales de la infancia como el sarampión, la varicela y la parotiditis, no reaparecen en aquellos individuos que ya la han padecido. (11)

Los intentos para proteger contra la viruela fueron hechos en China antes de nuestra era, y en Asia Occidental mediante la inoculación (variolización), empleando líquido vesicular de personas que habían padecido la enfermedad en formas leves. (10)

En el siglo XVIII Voltaire menciona la costumbre practicada por los turcos de inocular a sus niñas el pus de pacientes de viruela -- así como los relatos de algunos viajeros procedentes de China que relataban la costumbre de aquel pueblo de proteger a los individuos contra la viruela por inhalación de costras variolosas. (11)

Lady Mary Wortley Montagu introdujo en Inglaterra el proceso de variolización con virus no modificado de viruela. Este método llegó a ser el conocimiento de Edwar Jenner, junto con el relato de las ordeñadoras de Gloucestershire eran inmunes a la viruela.

El primer trabajo de inmunología data del 14 de Mayo de 1796, con el famoso experimento en el que Jenner inoculó la "materia" tomada de la pústula de la ordeñadora Sarah Nelmes en el cazo de un mozalbete llamada James Phipps. (11)

Sin embargo, el primer inmunólogo experimental fue Luis Pasteur, quien inició sus estudios con el cólera. Él se percató que un cultivo de *V. cholerae* abandonado, se atenuaba, es decir, que al inocularlo en animales de experimentación, se producía una versión disminuida de la enfermedad, con síntomas muy ligeros. Los animales así tratados quedaban inmunes a posteriores reinoculaciones de la bacteria.

En 1885 Joseph Meister fue mordido por un perro rabioso. Pasteur preparó una vacuna empleando los cordones secos de la médula espinal de animales muertos por rabia.

Paul Ehrlich, hablaba ya de receptores de membrana y planteó la teoría de formación de anticuerpos.

En 1888, Roux y Yersin descubrieron la toxina diftérica y prepararon en animales un anticuerpo que neutralizaba sus efectos tóxicos.

La descripción del complemento sérico fue realizada por Buchner, quien lo llamó alexina y destacó sus propiedades líticas sobre ciertas bacterias. Un año más tarde, Bordet demostró que las propiedades citolíticas de un suero inmune dependía de dos factores: uno termoestable, que corresponde a la presencia de anticuerpos específicos y otro termolábil presente tanto en sueros normales como inmunes. (11)

A principios del siglo, Karl Landstiner caracterizó los grupos sanguíneos A, B y O. Sus célebres estudios han hecho posible las transfusiones de sangre y los partajes sobre paternidad.

Elie Metchnikoff fue el pionero de la inmunidad celular, estudió la fagocitosis y acuñó el término "macrófago".

Roberto Koch, descubrió el fenómeno que ahora lleva su nombre: -- al inyectar micobacterias a un conejo sano entre 10 y 14 días aparece en el sitio de la inyección un nódulo que se ulcera y tarda en cicatrizar. Si el mismo conejo es reinfectado con micobacterias, vuelve a desarrollarse la úlcera que ahora cicatriza en unos cuantos días. Chase y Landstainer continuaron tales estudios y demostraron que este tipo de inmunidad podía ser transferido a otro individuo por medio de células.

Bennet y David descubrieron el factor obtenido de extracto de leucocitos humanos, que ha sido llamado de transferencia porque al ser inyectado a individuos con diferencias de inmunidad celular, les restituye la capacidad de responder en este sentido.(11)

Los fenómenos de hipersensibilidad humoral fueron descritos inicialmente por Portier y Michel en 1902. La alergia a la penicilina, a la insulina y el fenómeno de Arthus. Von Bering estudió la enfermedad del suero mediante el empleo de sueros heterólogos contra la toxina -- diftérica, los individuos inyectados con la antitoxina desarrollaban una reacción con la producción de anticuerpos dirigidos contra el suero del conejo que les produce daño renal y vascular. Entre las sustancias

que participan en este tipo de hipersensibilidad se encuentra la histamina, serotonina, la sustancia de reacción lenta de anafilaxia (SRS-A) y las cininas del plasma.

Otro éxito de la historia de la inmunología fue la descripción de las reacciones de precipitación de Heidelberg y Kendal. Ellos trabajaron con el polisacárido III de neumococo y obtuvieron anticuerpos contra él, inmunizando cobayos.

En 1944 y 1945 Medawar, con sus estudios referentes a los trasplantes de tejido entre individuos distintos de la misma especie contribuyeron de manera notable al conocimiento de las reacciones de rechazo de injertos.

En 1957, Porter propuso como estructura de las globulinas lo siguiente: dos pares de cadenas polipeptídicas unidas entre sí por puentes disulfuro.

Durante 1970 las investigaciones estuvieron orientadas hacia la inmunogenética de los antígenos de histocompatibilidad y de la producción de inmunoglobulinas y el reconocimiento de los circuitos inmunológicos.

Ahora puede decirse que los años 1980 serán denominados, al menos en parte, por la caracterización de las linfocinas y la obtención de vacunas sintéticas. (11)

GENERALIDADES DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL Y CELULAR.

El sistema de defensa de todo huésped está constituido por propiedades químicas, celulares y estructurales. La defensa celular depende esencialmente de células fagocitarias, pero también de la acción directa de células T, Células K y células NK sobre los patógenos invasores. La base de las defensas físicas no tanto de las células individuales como de las características de su ordenación física en estructuras epiteliales queratinizadas, acción peristáltica y así sucesivamente.

La primera barrera con que tropiezan la mayor parte de los microorganismos consiste en la piel o las mucosas intactas. Mientras estén fuera del cuerpo, los microorganismos están expuestos a la desecación, que pudiera ser suficiente para eliminarlas. Además tienen efecto antibacteriano el ácido láctico, ácido caprónico y ácido caprílico de las glándulas sebáceas. En las secreciones del cuero cabelludo y posiblemente en otras partes pilosas del cuerpo humano hay ácidos grasos C_7 , C_9 y C_{11} saturados, los cuales son especialmente fungistáticos e importantes para eliminar los hongos que causan infecciones superficiales de piel y pelo. (1)

La fagocitosis tal vez sea el más vital de los procesos internos de defensa del animal inmune. Las células fagocitarias principales son los neutrófilos y los monocitos de la sangre; monocitos y macrófagos de los tejidos. (1)

Los neutrófilos pueden estar también en los tejidos, como parte de la respuesta inflamatoria. Estas células son atraídas a focos de inflamación por diversas sustancias leucotácticas y linfocinas. El proceso de la fagocitosis forma parte de la respuesta inflamatoria inespecífica y presenta el contacto inicial del huésped con la sustancia extraña. Endocitosis es el término más general que incluye a la fagocitosis (ingestión de partículas). Ambas presentan el proceso de captación y engullido de partículas o de líquidos desde el ambiente, y los grupos de células especializadas que llevan a cabo estas funciones suelen denominarse células fagocíticas.

La fagocitosis la llevan a cabo primeramente, fagocitos mononucleares, neutrófilos y eosinófilos (en menor grado).

Fagocitos mononucleares: El sistema de fagocito mononuclear (MPS) consiste en un grupo generalizado de células ampliamente distribuidas por todo el cuerpo, donde pueden eliminar eficazmente materia extraña y restos de sangre, linfa y tejidos. El sistema MPS incluye monocitos de la sangre circulante y macrófagos que se encuentran en diversos tejidos. La fase de maduración es: Monoblasto ---- Pro-monocito ---- monocito, después de uno a dos días en circulación sanguínea, los monocitos emigran hacia su lugar principal de acción en los tejidos, diferenciándose más en macrófagos. El monocito de la sangre sirve como célula intermedia en la transición de monocito-macrófago, la cual es acompañada de cambios morfológicos, bioquímicos y funcionales. (1)

El proceso fagocítico a veces es facilitado por anticuerpos (pues las partículas revestidas de anticuerpos son ingeridas más eficazmente), el complemento un conjunto de proteínas que reaccionan seriamente. El término opsonina describe este proceso estimulante de la fagocitosis - de ambos, anticuerpo y complemento.

Neutrófilos o leucocitos polimorfonucleares. Los granulocitos circulantes comprenden tres variedades de células morfológicamente identificables el neutrófilo, el eosinófilo y el basófilo. De los cuales sólo el neutrófilo, el eosinófilo son fagocitos. El neutrófilo (30 a - 70 % del número total de leucocitos en sangre periférica) es una célula terminal de la diferenciación mieloide y ya no se divide. Los neutrófilos nacen a partir de la médula ósea a partir de una célula madre común y pasando por una serie de divisiones madura, pasando por: mieloblasto -- promielocito -- metamielocito -- célula en banda -- polimorfonuclear maduro (PMN).

Después de un breve período en la sangre (unas 12 horas) los PMN penetran en los tejidos donde completan su vida, en la cual sólo duran unos días. La producción de granulocitos y su liberación parecen estar bajo control de factores celulares y humorales.

Eosinófilos. Los granulocitos eosinófilos constituyen el 1 a 3% - de los leucocitos en sangre y se distinguen por sus voluminosos gránulos citoplasmáticos que con eosina se tiñen de color rojo intenso, a diferencia de los neutrófilos los eosinófilos maduran en la médula ósea de 3 a 6 días antes de ser liberados a la circulación.

Los eosinófilos tienen una semidesintegración de doce días en los tejidos, como neutrófilo, los eosinófilos no regresan desde los tejidos a la circulación, sino son eliminados a través de las mucosas de las vías respiratorias y digestivas. a pesar de que las células pueden fagocitar diversas partículas, incluyendo microorganismos y complejos solubles antígeno-anticuerpo, el proceso parece ser menos eficaz que en el caso de los neutrófilos. Se ha probado que los eosinófilos participan en reacciones de citotoxicidad mediada por anticuerpos, reacciones que tienen importancia para aclarar algunos organismos parásitos como Schistosoma. (1)

Por regla general, la eosinofilia es más frecuente en enfermedades atópicas en las cuales se encuentran los valores aumentados de IgE que en otros trastornos mediados inmunológicamente.

FAGOCITOSIS

Este proceso puede dividirse en dos etapas: la fase de fijación y la fase de ingestión.

En la fijación se establece un contacto estrecho con la partícula y el fagocito directamente por procesos no estimulados, en cuyo caso depende de las propiedades de su superficie de la partícula que va a ser fagocitada, en otros casos, la fijación incluye la participación de dos tipos de receptores de la membrana plasmática del fagocito:

- 1) Un receptor para el fragmento Fc de una molécula de inmunoglobulina.
- 2) Un receptor para C₃b, un componente del complemento.

Las bacterias que no son encapsuladas son captadas rápidamente por fagocitos y son destruidos. Cuando están presentes algunas proteínas séricas por ejemplo, complemento o anticuerpos (opsoninas), la fijación de la bacteria recubierta se facilitará por los receptores de superficie y se estimula a la captación fagocítica.

El proceso de ingestión representa el aprisionamiento de la partícula. El fagocito invagina su membrana plasmática y luego la partícula es captada dentro del citoplasma y encerrada en una vacuola (fagosoma) cuya pared está constituida por la membrana plasmática invertida.

A causa de las actividades químicas y físicas netamente diferentes, quizá sea adecuado considerar a las partículas T y a los fagocitos como dos compartimentos separados de la respuesta de la inmunidad mediada por células (IMC).

La hipersensibilidad celular y humoral no son iguales.

El apoyo principal para la teoría humoral proviene de los estudios de Bering, quién en 1899 afirmó que la inmunidad contra la difteria y tétanos dependía de la capacidad de la sangre para identificar la exotoxina diftérica o tetánica.

En 1903 Douglas y Alexander Fleming, publicaron pruebas convincentes de que algunas sustancias séricas, que llamó opsoninas ayudaban a la fagocitosis de bacterias.

Paul Ehrlich descubrió que la inmunidad podía ser transferida de la madre a los hijos, la hipótesis de la cadena lateral, estandarizó la antitoxina y las toxinas. (1)

Kamón, observó en 1923 que las toxinas podían convertirse en toxoides por acción del formaldehído, los toxoides conservarían en esencia, toda la actividad antigénica de la toxina sin sus efectos perjudiciales. Los toxoides eran mucho más estables que las toxinas y se emplearon rápidamente para sustituir las mezclas de toxina-antitoxina entonces utilizadas para la inmunización. (1 y 10)

Isaac y Linderman en 1957, descubrieron el interferon, sustancia producida o liberada por las células a consecuencias de infecciones virales o de ciertos inductores. Los interferones entran en las células adyacentes y las protegen contra los parásitos intracelulares inductores y contra otros de antigenicidad afín. La inespecificidad de los interferones es una diferencia importante que los distingue de los anticuerpos. (1 y 11)

HISTORIA DE LA DIABETES MELLITUS.

En el primer siglo de nuestra era Aretéo y Celso mencionaron los términos clínicos de la diabetes, después de 1000 años a.c. Aviena describe los datos clínicos.

La Diabetes mellitus es un trastorno metabólico, cuya característica principal es el aumento de glucosa en los niveles fisiológicos de sangre y la aparición de glucosa en orina, por lo general es acompañada de poliuria (aumento en el volumen normal de orina), poliipsia (sed extraordinaria) y polifagia (aumento de apetito). Es un trastorno que algunas veces es hereditario, cuyo porcentaje mundial es de 2 a 4%. (16) podríamos decir que la diabetes es causada por una deficiencia absoluta o relativa de los niveles efectivos de la insulina, hormona endócrina segregada por las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas endócrino.

La diabetes es conocida desde la antigüedad, es citada en el papiro de ebers, fue hasta 1670, desde Tomas Willis, que observa un olor dulce en la orina de los diabéticos, agregando el vocablo mellitus a la diabetes. En 1764, se encuentra azúcar en la orina evaporada de un diabético por Dobson y Pool. En 1780, son descubiertos los islotes celulares del páncreas por Langerhans, posteriormente Von Kering y Minkowsky demostraron que la inducción de la diabetes en perros se podía llevar a cabo mediante la pancreatectomía total y quedaba establecida la relación páncreas-diabetes. (12, 13 y 16)

La glándula pancreática tiene una doble función secretora; la exócrina y la endócrina. La exócrina o externa se llama jugo pancreático. La endócrina a cargo de los islotes de Langerhans y segrega hormonas que pasan directamente a la sangre.

Los Islotes de Langerhans son acúmulos de diferentes tipos celulares: las células beta segregan insulina, las células alfa segregan glucagón y otros tipos celulares que segregan gastrina, somatoestatina y otras hormonas.

Las células alfa se encuentran en la periferia del islote y las células beta hacia dentro. En las células beta se encuentran unos gránulos dentro de las vesículas, las cuales se denominan beta que contienen insulina y proinsulina.

El páncreas es casi totalmente exócrino (98%) el cual funciona como secretor del jugo pancreático que se compone de agua, bicarbonato y enzimas. Estos componentes degradan lípidos, proteínas y carbohidratos. En la extracción, se provoca la activación de tripsina, quimiotripsina y enzimas proteolíticas las cuales degradan a la insulina.

La insulina es una proteína pequeña de peso molecular 5900, se compone de dos cadenas A y B, están unidas por dos puentes disulfuro. En la cadena A se encuentra otro puente disulfuro intracatenario.

Stainer y colaboradores en 1970, aislaron un precursor de la insulina y fue denominado proinsulina, cuyo peso molecular es de 9000 y tiene poca actividad biológica. En contacto con enzimas proteolíticas

como la tripsina se rompe la cadena de proinsulina liberando el péptido de conexión y se convierte en la insulina. (8)

A fines del siglo XIX en México, es publicado un trabajo titulado "La Diabetes Sacarosa", donde se revisan los conceptos más adelantados sobre el origen de la enfermedad, la clínica, los criterios diagnósticos y terapéuticos escritos por Pablo Gutierrez. En 1921 extraen una sustancia del páncreas de perro, la cual disminuiría los niveles de glucosa sanguínea, la insulina; trabajo realizado por Frankey Facks y Loubatieres. En 1960 es descrita la estructura química de la insulina humana por Nicel y Smithys. La síntesis de las cadenas A y B de insulina y la combinación con materiales biológicamente activos fue hecha por Katsogannis y Zahin en 1964.

A pesar de todos los avances descubiertos, no se ha podido controlar la Diabetes Mellitus, por lo cual, para poder evitar los efectos colaterales, se han enfocado las investigaciones en la hemoglobina y albúmina glucosiladas, las cuales controlan los niveles fisiológicos de glucosa en períodos que oscilan entre 15 y 45 días. (16)

GENERALIDADES DE LA DIABETES MELLITUS. TIPOS.

Clinicamente la palabra diabetes representa un síndrome con desordenes en el metabolismo y una hiperglucemia debida a una deficiencia absoluta de secreción de insulina o una reducción de sus efectividades biológicas o ambos fenómenos. (12)

Diabetes mellitus dependiente de la insulina (DMDI). Esta forma se asocia con cetosis en un estado clínico no tratado y se presenta comunemente en jóvenes no obesos; la insulina circulante está virtualmente ausente, el glucagon está elevado, las células pancreáticas beta fallan para responder a todos los estímulos insulinogénicos y se requiere insulina exógena para corregir el estado catabólico, prevenir la cetosis, reducir la hiperglucemia y normalizar la glucemia. (14)

Se asocian ciertos antígenos HLA (BB, Bw15, Dw3 y DRw4) con procesos autoinmunes, por ejemplo, se sabe que los anticuerpos hacia el factor intrínseco gástrico son al menos 4 veces más comunes en diabéticos que en la población sana, y que los anticuerpos contra las glándulas adrenales, los cuales son raros en ausencia de enfermedad de Addison se hayan con mayor frecuencia en pacientes diabéticos. (15,16 y17)

Histológicamente se observa un infiltrado linfocítico en islotes pancreáticos, por lo tanto, este tipo de diabetes puede ser resultado de un ambiente infeccioso tóxico que ataca a las células pancreáticas - "B" de personas con disposición genética (virus Coxsackie "B4", virus que destruye células beta de los islotes de Langerhans), virus de las paperas,

virus de la gripe y agentes tóxicos como alloxán y la estreptozotocina, las cuales dañan específicamente las células beta. (14 y 15)

Diabetes mellitus tipo II. no dependiente de la insulina (DM2/ID).

Se observa en pacientes obesos y mejoran con un régimen alimenticio adecuado, pero hay problemas en la acción de la insulina.

La Diabetes Mellitus es provocada muchas veces por la elevada susceptibilidad para las infecciones microbianas, tuberculosis, pielonefritis, neumonía, dermatomicosis, etc. De hecho los pacientes son asintomáticos por años, pueden presentar los síntomas lentamente o progresivamente, dependiendo de la alimentación llevada en su vida. El factor genético está presente con un mayor porcentaje. En algunos casos el medio ambiente actúa como un factor desencadenante de la enfermedad. (12)

Diabetes secundaria.

Hay muchas patologías, que son causa directa de la diabetes las cuales son:

- trastornos pancreáticos o remoción del tejido pancreático.
- trastornos endócrinos como acromegalia, Síndrome de Cushing, glucagonoma, aldosteronismo primario, etc.
- la administración de drogas hiperglucemiantes como corticoides, agentes antihipertensivos y otros.

Diabetes subclínica o latente.

Conocida también como diabetes asintomática, se caracteriza por presentar los valores por arriba de los normales pero sin llegar a los valores definidos para la diabetes. Está asociada con enfermedades pan---

creáticas, hormonales, anormalidades con el receptor de la insulina y ciertos síndromes genéticos; padecimiento puede o no cursar como tipo I o tipo II. (8, 13)

ANTECEDENTES DE LAS HEMOTRANSFUSIONES.

Los primeros esfuerzos en el campo de la inmunología de los trasplantes incluyeron la producción de sueros inmunizantes contra los componentes histicos (Linderman) y el descubrimiento de la especificidad histica y de especie de los antígenos. (21)

En 1902, Metcnicoff y Desredka prepararon sueros antileucocitarios y observaron que tales antisueros poseían actividad citotóxica -- contra los leucocitos, también notaron que la inyección de cantidades pequeñas de antisuero inducía la proliferación de estas células en el animal inyectado. Metcnicoff previó el empleo de tales antisueros para aumentar la resistencia de organismos contra las infecciones.

En la actualidad, prácticamente la mayoría de todos los órganos -- se han transplantado. Se calcula que cada año se efectúan alrededor de 1000 trasplantes tan sólo de riñón originados por nefropatías terminales. (20 y 21)

Con el propósito de prolongar la sobrevida en los trasplantes, se han aplicado grandes dosis de agentes inmunosupresores, los cuales tienen efectos colaterales fatales. En base a lo anterior se han efectuado numerosos ensayos con el único propósito de prolongar la vida del -- trasplante y evitar complicaciones. (10)

trabajos reportados de hemotransfusiones, indican que han encontrado un aumento de la sobrevida de trasplantes: previas transfusiones de sangre total (desde 5 a 30 días anteriores al trasplante), linfocitos y eritrocitos, aunque otros trabajos no han reportado aumento

en la sobrevida del trasplante. (11 y 21)

Un trabajo realizado en la ENEP ZARAGOZA, postula dos posibles mecanismos para mejorar la sobrevida de los trasplantes. (2)

a) que las transfusiones además de promover anticuerpos citotóxicos, originen otros anticuerpos o complejos antígeno-anticuerpo que protejan al órgano donado; se sugiere que anticuerpos contra linfocitos B sean candidatos posibles. (22)

Otro candidato posible son los anticuerpos anti-Ia que se han reportado como protectores en animales y protectores del órgano transplantado.

b) que los responsables del aumento de la sobrevida sean los linfocitos T supresores.

En el suero se encuentran factores bloqueadores, como los descritos por Hellström (1972), en un sistema de cultivo mixto de linfocitos, factores que se transfieren del donador al receptor y que de alguna manera bloquean la respuesta inmune de rechazo aumentando la sobrevida del trasplante. (25).

ANTECEDENTES

ANTECEDENTES.

La ciencia del trasplante de órganos nació hace más de mil años con los injertos de piel para corregir defectos congénitos. (1)

Durante el renacimiento Gaspare Tagliacozzi efectuó trasplantes de piel de animales al hombre con el fin de corregir defectos de nariz.

En 1804 Baronio realiza trasplantes de piel entre animales de la misma especie (aloinjerto). Shone en 1912, propuso que los trasplantes son un proceso sin éxito, diciendo que los fenómenos que ocurren en el rechazo de éstos son de algún tipo de respuesta inmune. Entre 1872 y 1918 se realizan trasplantes de córnea y riñón, teniendo poco éxito, por lo que se plantean dos teorías para tratar de explicar la reacción hacia el órgano donado: la primera en 1906 debida a Paul Ehrlich, quién al hacer trasplantes de tumores de ratones a ratas, encuentra que se necesita cierto tiempo para que los tumores mueran; en consecuencia postula que en los tejidos hay cierta sustancia que mantiene vivo y en crecimiento al tejido transplantado, pero al agotarse se termina también la protección. La segunda teoría fue propuesta por Murray y Haaland en 1908 y empleada en 1912 por Russell, ya que al hacer trasplantes de tumores de ratones a ratas, encontraron que son destruidos en un tiempo de 9 a 11 días, y que si se hacía un segundo trasplante la destrucción se presenta de 3 a 5 días, por lo que concluyeron que durante el primer trasplante se monta una respuesta inmune en contra del tumor, que ocasiona que un segundo trasplante fuera destruido en menos tiempo. (2)

En 1920 Marine y Manley, concluyeron de sus experimentos que la --- respuesta de rechazo a los órganos transplantados es debida a las células linfoides (las células linfoides comprenden las células plasmáticas y los linfocitos). (2)

hoy en día, el trasplante de órganos de un individuo a otro, o entre dos regiones de un mismo individuo es un trasplante clásico en medicina moderna. Se han transplantado órganos como: piel, médula ósea, - riñón, corazón, pulmones y páncreas, excepto sistema nervioso central.

(1)

Los trasplantes de páncreas han sido aplicados clínicamente en casos selectos en algunos centros para el tratamiento de Diabetes Mellitus. Desde 1977 se han llevado a cabo aproximadamente 130 trasplantes de -- páncreas en humanos.

En 1968 Dezuki, fue el primero en reportar prósperamente la preservación pancreática experimental, usando oxigenación hipotérmica. Desde entonces han sido pocos reportes de otras técnicas para la preservación de páncreas.

En 1982 Breke, Stephane y S. Vidnes, muestran que cantidades relativamente pequeñas de glucagon se liberan del injerto, y que la liberación exagerada de glucagon del páncreas del hospedero se normaliza al - seguir el trasplante de páncreas. (3)

En 1983, James A. Schulak, demuestra que injertos de páncreas con riego sanguíneo (sin isquemia) y sin él (con isquemia) a ratas diabéticas generan glucemia semejante. (4)

Marroquín Segura encuentra en 1984, que el suero condiciona la sobrevivencia de trasplantes de piel en un modelo de ratas alogénicas. (2)

RESPUESTA INMUNE DE RECHAZO EN EL TRANSPLANTE.

Después de un injerto de tejido, se ponen en marcha los mecanismos de inmunidad humoral y celular, dirigidos principalmente contra antígenos de histocompatibilidad del donador. El rechazo del tejido por parte de la respuesta inmune celular, está asociada al desenvolvimiento de hipersensibilidad tardía y generación de linfocitos T citotóxicos (LTCs). Las células que inicialmente se infiltran en el órgano rechazado son células mononucleares, principalmente linfocitos T, de los cuales sólo la 1/5 parte está específicamente sensibilizados, los linfocitos T auxiliares (LTA) son los primeros en aparecer, se sensibilizan como respuesta al reconocimiento de los antígenos de histocompatibilidad serológicamente definidos (HLA SD) extraños, produciendo daño al órgano directamente, necesitando además la cooperación de los LTA para su activación. Tanto los LTA como los LTCs, pueden producir mediadores solubles (linfocinas) como el factor inhibidor de la migración de los macrófagos y leucocitos polimorfonucleares, factores quimiotácticos, factores blastógenos, factor de transferencia, linfoxinas, amplificando la respuesta inmune de rechazo y en consecuencia el daño al órgano donado.(7)

RESPUESTA INMUNE HUMORAL

Está dada por la formación de anticuerpos en contra de determinantes antigénicos del órgano donado. En la respuesta de rechazo a un primer injerto. Los linfocitos B sensibilizados son producidos como respuesta al reconocimiento de los HLA SD extraños, y aparecen en las etapas finales del rechazo. Estos linfocitos producen anticuerpos que intervienen en la destrucción del órgano, por medio de la activación del complemen-

to o por medio de células citotóxicas dependientes de anticuerpos. La respuesta humoral tiene gran importancia en el rechazo de un segundo -- trasplante del mismo donador, protagonizando el llamado rechazo hiperagudo, proceso que ocurre en un menor período de tiempo y con menor participación de inmunidad celular. (2)

REGULACION GENETICA HLA.

Los antígenos de histocompatibilidad se definen como moléculas que difieren de unos individuos a otros y se reconocen en el rechazo de injertos. En el ratón, se han detectado aproximadamente treinta antígenos de histocompatibilidad, cada uno de los cuales puede variar en poblaciones no isogénicas. esta diversidad genética proporciona singularidad para cada individuo en una población normal.

Los antígenos de histocompatibilidad difieren en su capacidad para provocar una respuesta inmunológica en un receptor injertado. En el ratón, un grupo de antígenos conocidos como H-2 proporciona la barrera más fuerte para el trasplante. Si se intercambian injertos de piel entre ratones que tengan diferentes antígenos H-2 en sus células, el injerto resultará siempre rechazado en un plazo de 14 días. Los antígenos de histocompatibilidad H-2 fueron descritos por primera vez por Peter Jorer y sus colegas. (7)

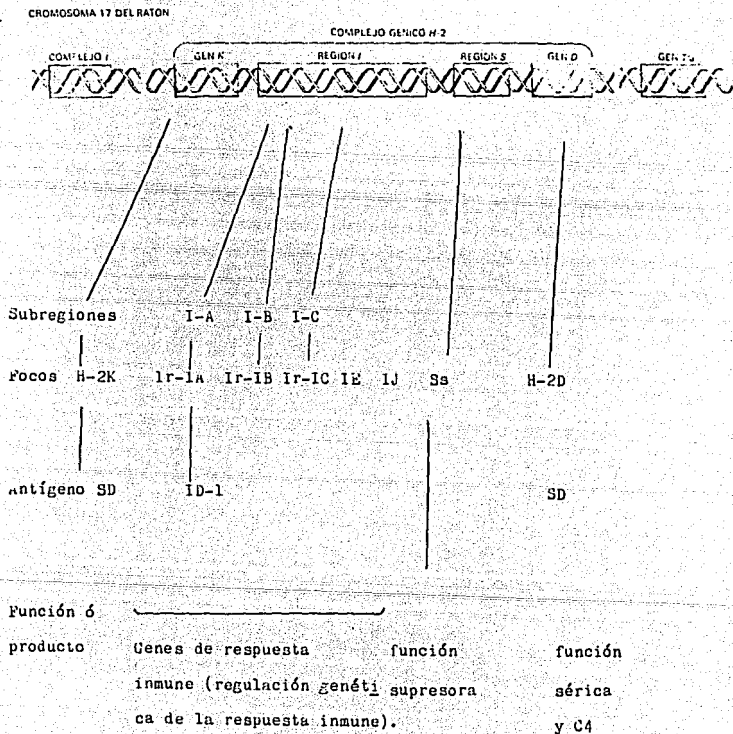
Los fuertes antígenos H-2 del ratón tienen su contrapartida en --- los antígenos HLA del hombre, detectados en un principio sobre la superficie de los leucocitos sanguíneos en la década de 1950. (7)

Los antígenos H-2 y HLA son moléculas protéicas que se adhieren firmemente a la superficie de casi todas las células. Con probabilidad, parte de la molécula se encuentra embebida en la membrana externa de la célula o la atraviean. como otras moléculas protéicas, los antígenos de histocompatibilidad constan de varias cadenas de aminoácidos; contienen además, una pequeña porción de hidratos de carbono, por lo que denominan glucoproteínas. Se detectan y clasifican por su capacidad para unirse a los anticuerpos específicos que se fabrican cuando se inyectan células de un animal a otro animal de la misma especie, genéticamente distinto. El receptor sintetizará anticuerpos específicos dirigidos contra las moléculas que son diferentes a las suyas.

Tales anticuerpos son los que definen la especificidad antigénica que puede definir o reflejar la presencia, en las células del donante, de un antígeno ausente en las células del receptor, o bien puede reflejar diferencias estructurales entre variantes de un antígeno de histocompatibilidad que se encuentre presente tanto en células del donante como en las del receptor. (7)

La región del material genético del ratón que codifica para los antígenos de H-2 está constituida por un complejo de genes localizados a lo largo de un segmento del cromosoma 17 (fig. 1) que es relativamente corto y que sólo representa una tresmilésima parte del DNA total del ratón. A pesar de todo, dicha región es lo suficientemente grande para codificar hasta 200 proteínas de tamaño intermedio. Dos de esas proteínas son los antígenos H-2, que se codifican por genes localizados en ambos extremos del complejo H-2; se designan en el simbolismo H-2K y H-2-D respectivamente. (7)

FIG. (1) cromosoma 17 del ratón.



se han descrito, al menos 10 variantes de genes H-2K y 10 variantes de genes H-2D en cepas isogénicas de ratones. Las Investigaciones realizadas por Jan Klein, sobre poblaciones heterogéneas salvajes, de ratones, sugieren que el número de formas variables de cada gen puede superar el centenar. Las especificidades antigénicas para el H-2K y H-2D son inmunológicamente distintas, pero ambos genes tienen muchos aspectos en común. (7)

En estas regiones se encuentra el código correspondiente a productos que se pueden identificar con antisueros, recurriendo a métodos serológicos ordinarios, y que se llaman también focos SD, por "identificación serológica" (Serologically Defined). El peso molecular de los antígenos H-2 es de 50,000.

Las regiones K y D son las que intervienen durante fenómenos de rechazo de aloinjertos por los linfocitos T citotóxicos. También se ha visto que cuando las células eran enfrentadas a ciertos virus o a ciertos haptenos químicos, tales agentes parecían entablar una relación específica con las regiones SD; además los linfocitos T citotóxicos sólo destruyen las células cuando dichas células blanco, modificadas por el virus o la sustancia química, poseen el mismo antígeno modificador y las mismas moléculas de región K y región D que las células desencadenantes iniciales. (1)

REGIÓN I

Otras partes del complejo H-2 que han podido ser identificadas abarcan la región I y la región S, las cuales se encuentran estrechamente relacionadas con el sistema inmunológico.

La importancia de la región I se reconoció primero cuando Baruj Benacerraf, Hugo O. McDevit y Michael Sela, mostraron que ciertas razas de ratones isogénicos podían fabricar anticuerpos contra un determinado antígeno, mientras que otras razas no lo podían hacer. Subsiguientemente, hallaron que la capacidad para sintetizar anticuerpos estaba controlada por una serie de genes dentro de la región I, conocidos como Genes Ir o genes de inmunorrespuesta. Aunque los productos de los genes Ir no se han identificado, sí se han podido detectar ciertas proteínas designadas -- por Ia (antígenos asociados a la región I) sobre la superficie de los linfocitos. (7)

En el ratón es en la región I donde se encuentra el complejo de histocompatibilidad mayor que regula gran parte de los fenómenos inmunológicos más importantes. Hasta ahora se identificaron tres subregiones llamadas I-A, I-B y I-C que contienen focos como por ejemplo Ir-IA, Ir-IB y Ir-IC encargados de la genética de la respuesta inmune frente a ciertos antígenos definidos, como las proteínas de mieloma y los polipéptidos sintéticos. Los antígenos cuyo código figuran en estas regiones se llaman antígenos Ia (relacionados con la región I) que tienen un peso molecular de 28000 y 32000. Mientras que los productos de las regiones K y D figuran en todos los tejidos, con excepción de los espermatozoides, los antígenos Ia sólo se encuentran en linfocitos, macrófagos, espermatozoides y células de la epidermis. (2)

REGIÓN S

La región S que fue primeramente detectada por Sherefler y sus colegas, ha demostrado controlar la síntesis de un componente del comple-

mento sérico; este es el sistema de proteínas del suero sanguíneo que actúa para destruir células antigénicas, como bacterias y células injertadas, en cuanto hayan entrado en reacción con anticuerpos específicos. (7)

HLA EN EL HUMANO.

Para el complejo HLA humano (Human Leucocyte Antigens) se ha obtenido un mapa genético. Los anticuerpos anti-HLA se encuentran con frecuencia en el suero de mujeres que han tenido múltiples embarazos y han fabricado anticuerpos contra los antígenos HLA paternos expresados en las células del feto. Suelen obtenerse también anticuerpos contra dichos antígenos a partir de individuos que han recibido múltiples transfusiones sanguíneas y que, por tanto, han estado expuestos a antígenos HLA extraños presentes en los leucocitos de la sangre del donante.

El complejo HLA se encuentra localizado en el cromosoma 6 humano; fig.2. Tiene muchos aspectos en común con el complejo H-2. Existen tres genes en el complejo que codifican para los antígenos de histocompatibilidad los cuales se han designado con los símbolos HLA-A, HLA-B y HLA-C. El HLA-A y HLA-B parecen estar estrechamente relacionados con el H-2D y el H-2K del ratón. No obstante, la topografía del complejo HLA difiere del complejo H-2 en que la región HLA-D (una área comparada con la región I del ratón) se localiza externamente a los genes A y B, mientras que la región I se encuentra entre H-2D y H-2K. (7)

Fig. (2)



El complejo HLA, localizado a lo largo del cromosoma 6 humano, con tiene tres genes que codifican para antígenos de histocompatibilidad -- HLA-A, HLA-B y HLA-C y una región D que es comparable con la región I - del ratón. (7)

Recientes investigaciones han identificado la cadena polipeptídica ligera del H-2, HLA y T1 como la beta-2 microglobulina. Esta molécula no incorpora hidratos de carbono y no parece poseer ninguno de los determinantes antigénicos que son característicos de un definido tipo H-2 o HLA. Por lo tanto los hidratos de carbono y las especificidades antigénicas deben correr a cargo de las cadenas pesadas.

La beta-2 microglobulina fue descubierta por Igemar Berggard y Alexander U Bearn, en la orina de pacientes con disfunción renal. (7)

Se ha visto que los genes que determinan los antígenos de los mamíferos son notablemente similares, por lo que se han dividido en tres -- clases generales de antígenos de transplante, los de clase I, los de -- clase II y los de clase III. (11)

Los antígenos de clase I, están caracterizados por una glucoproteína de peso molecular de aproximadamente 44000 D unida en forma covalente a una B-2 microglobulina. Estos antígenos están caracterizados por -- los antígenos de transplante.

Los antígenos de clase II en el hombre y en el ratón son semejantes, con identidad en la secuencia de aminoácidos en un 60 y 70 %. Estos antígenos se presentan en las células nucleadas con excepción de los espermatozoides y las células trofoblásticas. Se caracterizan por los antígenos Ia, asociados con la región I, son parte integral de las proteínas de membrana incluidas en las reacciones de reconocimiento que permiten al sistema inmunitario distinguir entre lo propio y lo extraño.

La familia de la clase III codifica varios componentes del complemento. Antes eran llamados antígenos Ss (sustancia sérica), son codificados dentro de la región S del complejo H-2. Este grupo comprende dos -- proteínas importantes, la originalmente llamada Ss, correspondiente al C₄ en el ratón, y la Slp (proteína limitada sexualmente), que depende de los niveles de testosterona y está presente en ratones machos de la cepa Slp.^{*} (11)

FUNDAMENTOS DE LA ELECCION DEL TEMA

FUNDAMENTOS DE LA ELECCION DEL TEMA.

La Diabetes mellitus, constituye un problema de salud mundial, ya que el número de diacéticos es cada día más grande. A nivel mundial se estima que existen aproximadamente de 40 a 50 millones de diabéticos.(13)

Del número de muertes de personas diabéticas, de 60 a 80 % mueren - por infecciones recurrentes ocasionadas por bacterias, virus, hongos y parásitos.(26)

Los trasplantes de páncreas han sido aplicados clínicamente en ca- sos selectos, en algunos centros, para el tratamiento de Diabetes Melli- tus. Desde 1977 se han llevado a cabo aproximadamente 130 trasplantes de páncreas en humanos. (1)

En 1984 se encuentra que el suero condiciona la sobrevida de trans- plantes de piel en un modelo de ratas alogénicas. (2)

Con el propósito de prolongar la vida en los trasplantes, se han aplicado grandes dosis de agentes inmunosupresores, los cuales tienen - efectos colaterales fatales. (1)

Por tal motivo, se pensó hacer un estudio para ver si el suero --- completo, o si alguna fracción del suero, condiciona la sobrevida de -- aloinjerto de páncreas en ratas diabéticas, induciendo la diabetes con alloxán en ratas alogénicas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Estudios realizados con anterioridad en esta escuela (ENSP ZARAGOZA) demostraron que el suero alarga la sobrevida de los injertos de piel, - por lo que se ha planteado mostrarlo experimentalmente en páncreas. (2) Se desea además fraccionar el suero a través de una columna de filtración molecular y evaluar el posible efecto de la sobrevida del injerto con las distintas fracciones. Para tal efecto se inducirá la Diabetes mellitus tipo 1 con alloxán en los animales de experimentación, injertando el páncreas por las diferentes vías (subcutánea, intraparietal, e intramuscular) y así encontrar la vía que nos dé una disminución de - la glucemia. (24)

En todos los casos la variable de respuesta será la glucemia, cuando ésta se encuentre dentro de los valores de referencia se considerará como positivo el efecto de la sobrevida.

OBJETIVOS

OBJETIVOS :

1.1 Determinar el efecto del suero en la sobrevida de aloinjertos de páncreas.

1.2 Determinar el efecto de las fracciones de suero en la sobrevida de aloinjertos de páncreas.

1.3 Encontrar la vía óptima de implantación del injerto.

HIPOTESIS

HIPOTESIS:

De acuerdo con las consideraciones de Pearson y Newman (15), se propone dos hipótesis de trabajo para cada diseño experimental propuesto.

I VIA DE ADMINISTRACION

- A) No hay diferencias significativas entre las vías de administración.
- B) Por lo menos una vía es diferente.

II FRACCIONES

- A) No hay diferencias en los niveles de glucemia entre las fracciones, suero completo y control.
- B) Por lo menos un tratamiento tiene diferentes niveles de glucosa.

MATERIAL Y EQUIPO

MATERIAL:

Baño de hielo.

Bulbos.

Cajas petri. Pyrex.

Cajas grandes de plástico con tapa.

Espátula de acero inoxidable.

Estuche de disecciones.

Frascos de vidrio.

Gasa.

Gradilla para tubos de 13x 100

Hilo sutura seda 00

Jeringas desechables. Beckton Dickinson.

Matraces erlenmeyer 1000 ml. Pyrex.

Marcador. Esterbrook.

Maskintape.

Papel parafilm

Papel sanitario

Paquete de algodón. Cometa.

Pipetas graduadas 10ml. Pyrex.

Pipetas graduadas 5ml. Pyrex.

pipetas graduadas 1ml. Pyrex.

Pipetas graduadas 0.5ml. Pyrex.

Probetas 100ml. Pyrex.

Pipetas pasterur.

Sanitas.

Tabla de madera 20X30 cm

Tapones de hule.

tubos de ensaye 13X100. Pyrex.

Vasos de precipitados 250ml. Pyrex.

Vasos de precipitados 100 ml Pyrex.

Vasos de precipitados 50 ml Pyrex.

Vasos de precipitados 10 ml. Pyrex.

Vasos de precipitados 5ml. Pyrex.

EQUIPO:

Baño maría de precisión circulating system-253. GCA/precisión científico.

Balanza analítica. Mettler H80.

Balanza granataria. Ohaus.

Centrífuga clínica. Napsa-solvat.

Colector automático.

Columna de separación K16 Pharmacia Fine Chemical.

Espectrofotómetro. Espectrónico 20. Bausch & Lomb.

Refrigerador eléctrico. General eléctrico.

REACTIVOS Y MATERIAL BIOLÓGICO.

REACTIVOS:

Ácido pícrico. Grado reactivo. Merck.

Agua destilada.

Alimento para ratas. Purina.

Alloxán 9,2,4,5,6,-(1H,3H)(pirimidin tetrona) grado reactivo. Sigma.

Azida de sodio. Grado reactivo. Merck.

Azul de dextrán. Grado reactivo.

Cloruro de sodio. Grado reactivo. Merck.

Éter etílico. Grado reactivo. Sigma.

Glucosa. Grado reactivo. Merck.

O-toluidina. Grado reactivo. Baker.

Sephadex G 200.

MATERIAL BIOLÓGICO:

Ratas Long-evans machos de 3 meses de edad.

Ratas wistar machos de 3 meses de edad.

Ratas CIIZV (wistar- long evans) machos de tres meses de edad.

PREPARACION DE SOLUCIONES

PREPARACION DE SOLUCIONES:

-Solución salina isotónica 0.85% (SSI)

Disolver 8.5 g de cloruro de sodio (NaCl) en 1000 ml de agua destilada.

-Solución de alloxán, 43mg/kg. peso.

Disolver 0.205g de alloxán en 12 ml de solución salina isotónica. Protegerla de la luz.

-Solución de azul de dextrán al 1%

Disolver 1 g de azul de dextrán en 100 ml de agua destilada.

-Azida de sodio al 0.1%

Pesar 0.1g de azida de sodio y disolver en 100 ml de agua destilada.

-Solución de ácido pícrico.

Disolver la cantidad necesaria de ácido pícrico en agua destilada.

Sephadex G 200.

Hidratación:

-activación del gel.

Hidratar en un volúmen adecuado de agua destilada la cantidad requerida de sephadex G 200 para empacar la columna.

Dejar hidratar durante 70 hs. a temperatura ambiente.

Eliminar el aire por succión al vacío.

METABOLOGIA

METODOLOGIA

EMPACAMIENTO DE LA COLUMNA.

- 1.- La columna se llena con Sephadex G 200 activado, evitando la formación de burbujas en su interior.

CALIBRACION DE LA COLUMNA.

- 1.- Tomar 1 ml de una solución de azul de dextrán al 1% y solución de - concentraciones conocidas de hemoglobina y citocromo C para formar una mezcla de soluciones de proteínas de concentración conocida.
- 2.- Colocar 1 ml de la mezcla en el interior de la columna.
- 3.- Colectar fracciones de 1ml.
- 4.- Leer a 550 nm contra blanco de SSI las fracciones colectadas.
- 5.- Graficar \log del peso molecular de proteína contra fracciones.

FRACCIONAMIENTO DEL SUERO.

- 1.- Colocar 2ml de suero en la columna, la cual ha sido calibrada previamente.
- 2.- Eluir con solución salina isotónica (SSI).
- 3.- Recoger las fracciones de 1ml en el colector automático.

SENSIBILIZACIÓN.

- 1.- Se anestesia la rata donadora en una cámara de éter etílico.
- 2.- Se extrae sangre por punción cardiaca.
- 3.- Se deja coagular por 5 min.
- 4.- Remover el coágulo con un palillo de madera.
- 5.- Centrifugar por 5 min. a 3000 rpm.
- 6.- Separar el suero con pipeta pasteur.
- 7.- Anestesiarse la rata receptora.
- 8.- Se le administra 0.4 ml de suero obtenido anteriormente para sensibilizarla.
- 9.- Posteriormente se lleva a cabo la inducción de la diabetes.

INDUCCION DE DIABETES MELLITUS.

- 1.- Pesar las ratas y marcarlas adecuadamente para evitar confusiones
- 2.- Anestesiarse la rata en cámara de éter etílico.
- 3.- Administrar por vía intravenosa, en vena de pene, la cantidad correspondiente de solución de alloxán para 43 mg/kg, que es la dosis --- efectiva.
- 4.- Cuantificar glucosa a las 48 hs.

Otra forma de inducir la diabetes mellitus es la siguiente:

- 1.- Administrar por vía subcutánea la cantidad correspondiente de solución de alloxán, 151 mg/kg de peso.
- 2.- Cuantificar glucosa a los 5 días. (13)

Nota:

Se considerarán como ratas hiperglucémicas aquellas cuya glucosa - sea superior a 400 mg/ml.

CUANTIFICACION DE GLUCOSA.

- 1.- Anestesiarse la rata en cámara de éter etílico.
- 2.- Obtener sangre por punción cardíaca de 1 a 2 ml.
- 3.- Dejar coagular la sangre por 5 min., remover el coágulo.
- 4.- Centrifugar por 5 min. a 3000 rpm.
- 5.- Separar el suero con pipeta pasteur.
- 6.- Preparar varios tubos de ensaye con 5 ml de o-toluidina.
- 7.- Al tubo No. 1 adicionarle 0.1ml de solución patrón de glucosa (100mg/ml)
- 8.- Al tubo 2 adicionarle 0.1ml de agua destilada como blanco.
- 9.- Al siguiente tubo adicionarle 0.1ml de suero problema (de igual manera a los demás tubos si son varias muestras problema).
- 10.- Colocar los tubos, previamente marcados, a baño maría a ebullición durante 10 min.
- 11.- Dejar enfriar los tubos.
- 12.- Leer las absorciones a 630 nm de los problemas y el patrón.
- 13.- Cálculos:

$$\left(\frac{\text{absorción del problema}}{\text{absorción del patrón}} \right) 100$$

Esta fórmula nos dá la concentración de glucosa en mg/100ml de suero.

Los valores normales en ratas : 90 a 130 mg/100ml. (6).

DETERMINACION DE LA VIA OPTIMA PARA LOS INJERTOS DE PANCREAS.

- 1.- Sensibilizar a la rata con 0.4 ml de suero por vía intravenosa en vena de pene.
- 2.- Al tercer día se induce la Diabetes Mellitus con solución de alloxán por vía intravenosa en vena de pene.
- 3.- Al día siguiente se efectúa el injerto de páncreas por las diferentes vías de administración.
- 4.- 3 ratas por vía subcutánea con páncreas macerado.
3 ratas por vía subcutánea con páncreas completo.
3 ratas por vía intramuscular con páncreas macerado.
3 ratas por vía intramuscular con páncreas completo.
3 ratas por vía intraparietal con páncreas macerado.
3 ratas por vía intraparietal con páncreas completo.
- 5.- Se dejan tres ratas diabéticas sin injerto como control.
- 6.- Se determina glucosa cada tercer día por espacio de dos meses.

Nota: A las ratas Long-evans se les extrae el páncreas y se corta a la mitad, una parte se macera con solución salina y la otra mitad -- queda completa. Se introduce a las ratas Wistar.

REALIZACIÓN DE INJERIOS:

- 1.- Se anestesia la rata donadora Long-evans en cámara de éter etílico.
- 2.- Se hace la disección con bisturí en condiciones estériles.
- 3.- Se localiza el páncreas y se extrae cortando con bisturí o con tijeras con ayuda de pinzas.
- 4.- Se coloca el páncreas en una caja petri con solución salina isotónica y ésta sobre baño de hielo.
- 5.- Se anestesia la rata receptoraistar.
- 6.- Se lava y se rasura la parte en la cual se hará la disección.
- 7.- Se efectúa la disección en una pequeña porción y se introduce el páncreas con las pinzas.
- 8.- Una vez que ha penetrado el páncreas se hace la sutura con hilo seda 00 y con aguja curva especial, se hacen las puntadas necesarias para cerrar bien la herida.
- 9.- Se deja reposar la rata hasta que despierte de la anestesia. Se marca con ácido pícrico disuelto en agua con un algodón y tijeras.
- 10.- A partir de las 48 hs. se hace la determinación de glucosa cada tercer día por espacio de dos meses.

Nota: Las ratas no deben estar más de 6 en cada caja. Cambiar el acerrín diario y ponerles agua y alimento.

FRACCIÓN QUE CONDICIONA LA SOBREVIDA.

- 1.- Se anestesia la rata receptora y se sensibiliza con 0.4 ml de suero fraccionado (excepto control) por vía intravenosa en vena de pene, cuatro ratas por cada fracción.
- 2.- Al tercer día se induce la diabetes con solución de alloxán.
- 3.- Al siguiente día se realizan los injertos por vía intraparietal con páncreas completo.
- 4.- Se dejan 4 controles:
 - 2 ratas con injerto de páncreas sin suero.
 - 2 ratas con injerto de páncreas con suero.

RESULTADOS

VIA DE ADMINISTRACION

Se obtuvieron los siguientes datos de la determinación de glucosa por las diferentes vías de administración del páncreas.

VIA	PANCREAS	GLUCOSA mg/100ml.	\bar{x}
IM	macerado	500 520	510.0
IM	macerado	211 146 134	168.7
IM	completo	-	
IM	completo	-	
IM	completo	461 348 186 206 296 163 181 185 209 186 180	299.0
IM	macerado		
IP	macerado	176 136 130 137 133 154 118 105 159 160 157	140.0
IP	macerado	180 160 182 148 166 136 145 145 161 169 207	244.5
IP	macerado	-	
IP	completo	150 184 165 172 152 136 122 145 200 200 184	163.5
IP	completo	134 148 134 168 142 163 140 145 149 161 176	149.6
IP	completo	192 224 182 213 200 172 209 160 236 295 161	202.0
SC	macerado	180 160 152 173 154 163 145 227 147 169 153	172.5
SC	macerado	392 440 173 182 236 400 409 400 450	359.0
SC	macerado	144 128	136.0
SC	completo	-	
SC	Completo	128 152 178 134 113 172 172 210 204 173 200	150.0
SC	completo	140 164 200 152 195 181 204	216.0

Nota: IM - intramuscular

IP - intraparietal

SC - subcutáneo

PRUEBA DE LAS FRACCIONES.

La siguiente tabla de resultados se obtuvo al hacer la determinación de glucosa para probar las diferentes fracciones de suero.

FRACCION	GLUCOSIA mg/100 ml de suero	\bar{x}
11	175 107 109 120 106 100 104 222 126	129.8
11	175 100 90 140 103 125 133 166 148 196 125 150 140 213 188 175 226.6	129.8
11	220 235 113 140 153 137 145 181 192 250 142 246 225 225 172 225 198.3	198.3
11	175 142 113 140 145 153 174 148	147.7
12	290 221 290 90 213 224 250 229 251 300 300	241.6
12	280 128 172 110 220 259	194.8
12	110 114 150 165 113 140 145 140 155 342 110 230 150 155 175 175 158.6	158.6
12	400	400.0
13	240	240.0
13	120 92 127 190	132.2
13	265 178 318	253.0
13	260 285 327 475 193 337	319.5
14	190 307 140 160 280 224 250 362 444 340	270.2
14	170 192 127 125 333 244 262	206.8
14	160 235 109 195 246 237 262 237 450 290 446 396 525 300 450 296 295.8	295.8
14	125 157 113 140 226 148 158 214 174 200	165.0

50

FRACCION GLUCENIA mg/100ml de suero.

 \bar{x}

15 425 357 300 310 348.0

15 200 135 140 185 326 103 108 171.0

15 200 100 159 170 173 148 145 118 133 150 162 188 155 190 240 175 225.0

15 360 214 272 125 333 311 209.2

16 150 190 106 103 132 126 126 120 122 172 100 100 129 188 100 140 131.0

16 -

16 132 132.0

16 550 420 485.0

17 162 158 160.0

17 450 380 490 650 525 472 333 444 395 333 366 372 450 460 380 432.6

17 130 130.0

17 112 142 127.0

18 250 250.0

18 550 550.0

18 -

18 162 96 100 106 118 112 154 114 166 188 155 104 91 108 120 100 128.3

C₁ 75 114 109 170 193 170 187 166 188 236 156 135 213 146 160.6C₁ 75 100 113 96.0C₂ 145 107 50 135 113 166 175 170 181 240 158 269.0

Фракция глюкозы, мг/100мл.

\bar{x}

19	125 100 100 96 158	119.0
19	106 158 106 132 144 100 225 117 144 111 150	132.0
19	106 100 96 144 118 96 112 123	111.8
19	130	130.0
20	125 100 106 100 92 100 100 148 122 100 108 75 102 100 112 100 128.3	
20	100 96 92 150 96 125 144 144 111 91 120 75 112 108 92 104 101.6	
20	200 132 106 166 92 96 100 150 166 127 137 116 116 104 102 104 109.8	
20	600	600.0
21	500	500.0
21	170	170.0
21	550 392 400 650 529 450 450 222 360 266 300 375 360 344 250 395.2	
21	170 92 106 132 80	116.0
22	300 480 375 190 290 220 290 260 220 210 215 260 220 272.0	
22	140 180 200 150 185 171.0	
22	188 180 280 150 110 100 180 120 75 90 110 180 145 146.8	
22	375 430 140 331.6	
23	175 490 500 340 280 235 250 290 272 210 200 200 190 285.0	
23	92 140 125 155 125 150 120 130 85 80 95 160 119.0	
23	350 505 475 350 295 210 290 220 210 190 170 200 180 280.0	
23	350 375 100 275.0	

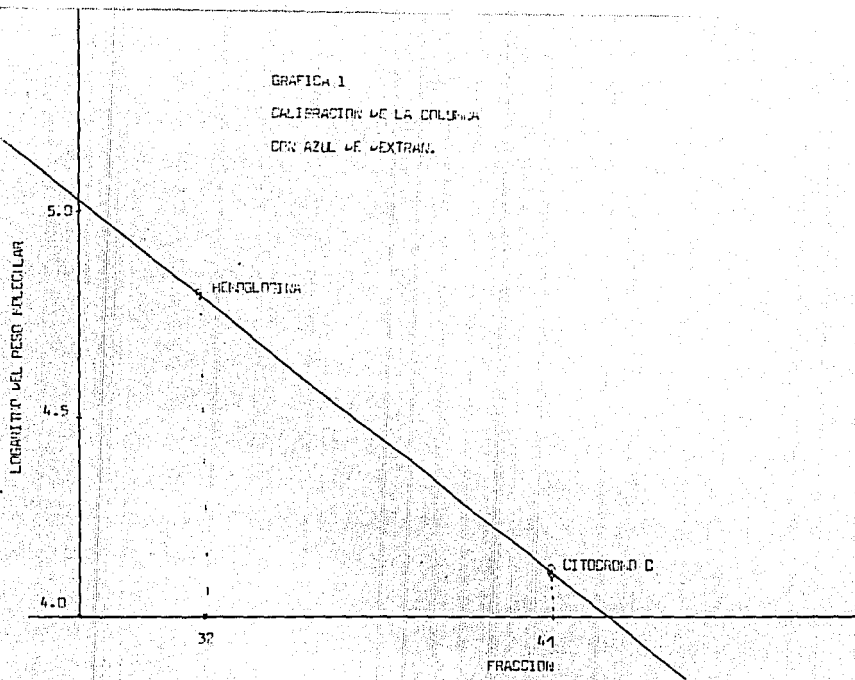
FRACCIÓN	GLUCEMIA mg/100ml	\bar{x}
24	240 230 470 375	329.0
24	196 320 500 475 365	372.0
24	80 150 150 145 130 132 112 80 96 110 148 120	120.0
24	208	208.0
25	80 200 125	135.0
25	240 350 475 500 400 350 272 290 290	353.0
25	160 205 300 270 165 210 160 130 160 170 210 180	199.0
25	248 375 500 450 310 300 290 290 290 72 180	328.0

FRACCION	GLOUCEMIA mg/100ml suero	\bar{x}
19	225 465 475 400 270 250	347.5
19	175	175.0
19	- 450 410 330 250 170 260 290 190 210 180 210 225 190	264.5
19	225 375 500	366.0
20	- 450 330 440 305	381.2
20	210 350 350 400 350 360 360 290	183.4
20	80 1.5 240 270 125 150 220 160 180 195 200 190	183.4
20	150 500 650 500 425 270	440.8
C ₁	70	70.0
C ₂	78 130 150 130 135 110 93 100 88 90 110 110	110.3

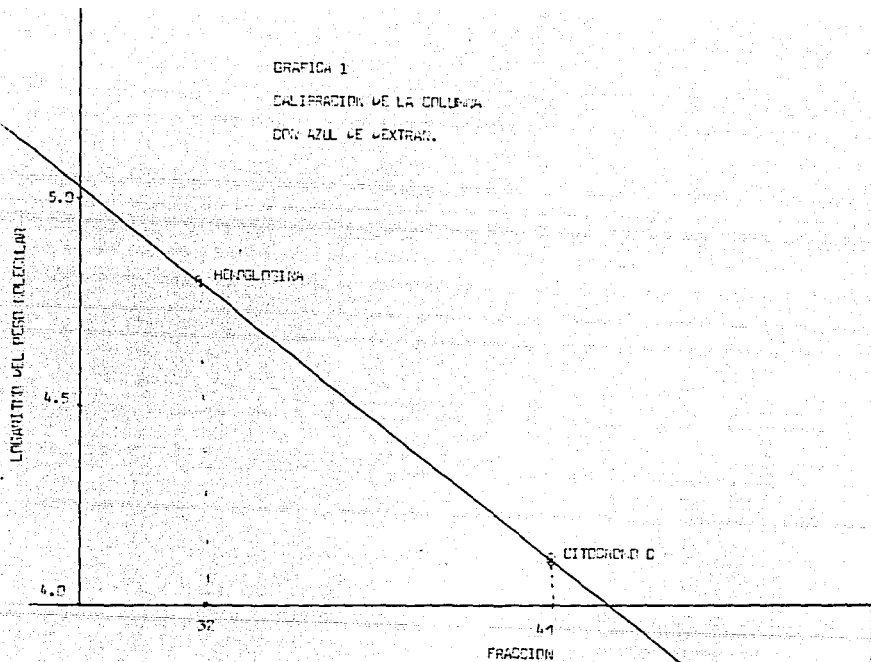
Nota: Se repitieron las fracciones 19 y 20.

GRAFICAS

GRAFICA 1
CALIBRACION DE LA COLUMNA
CON AZUL DE DEXTRAN.

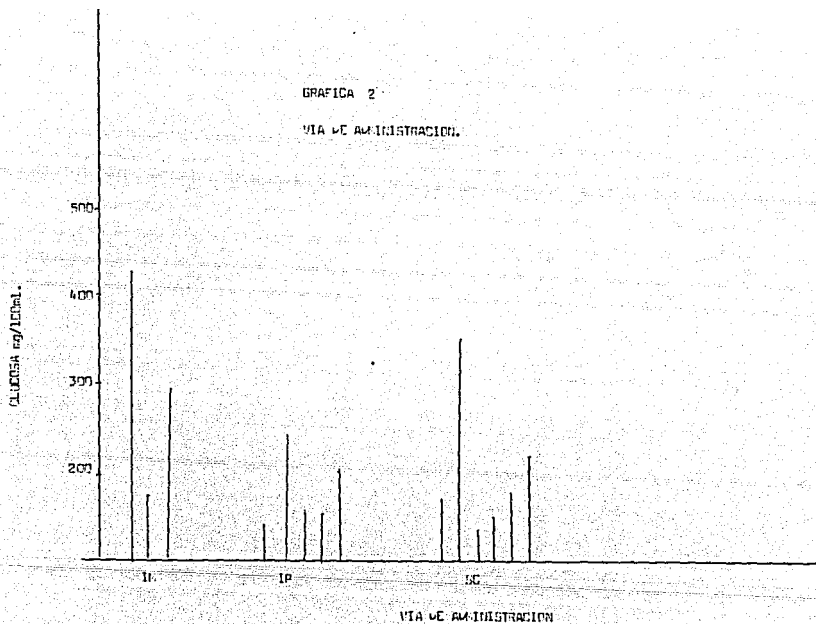


GRAFICA 1
CALIBRACION DE LA COLUMNA
CON AZUL DE CEXTRAN.



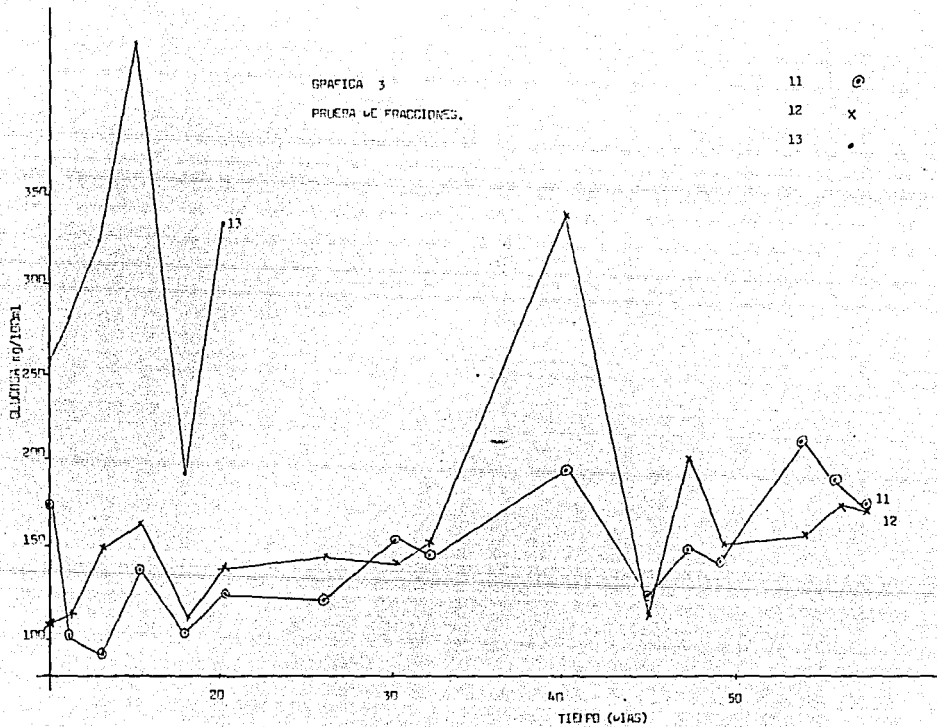
GRAFICA 2

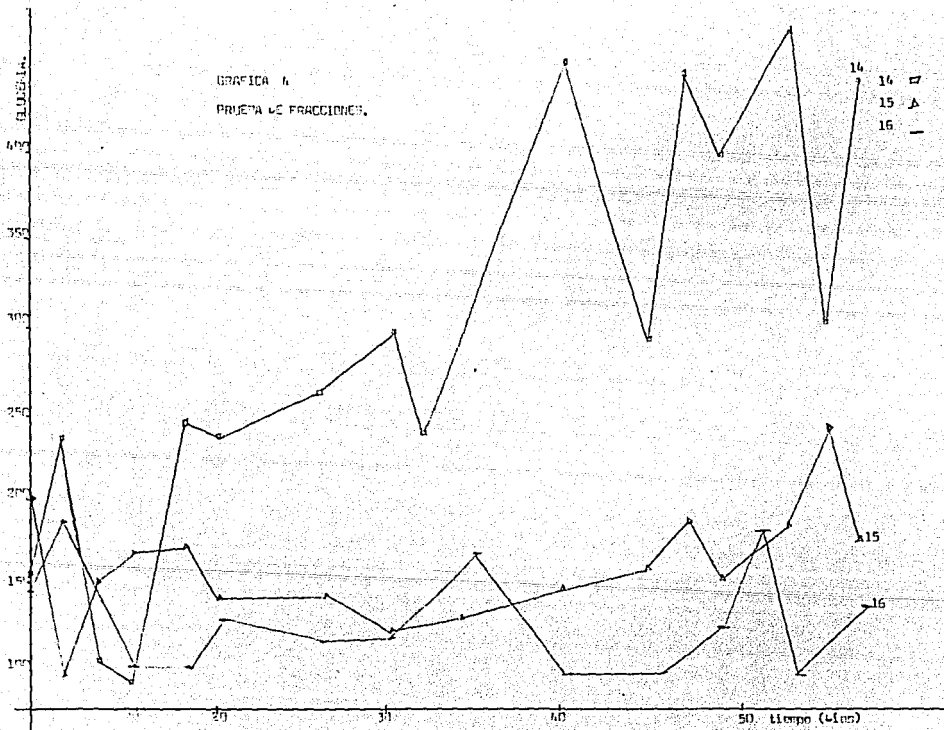
VIA DE ADMINISTRACION.

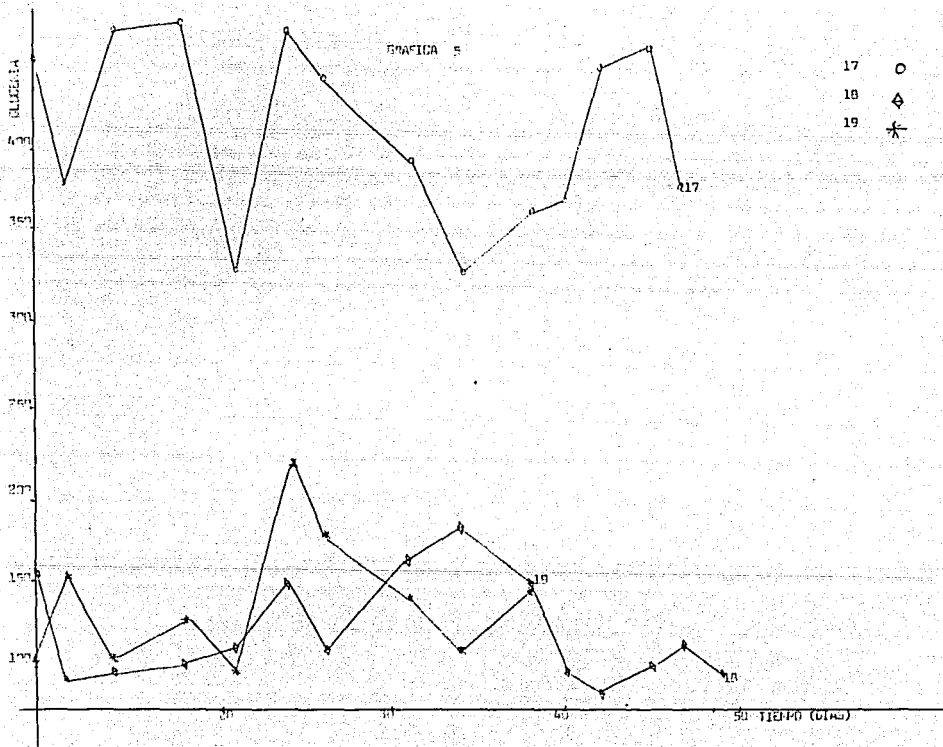


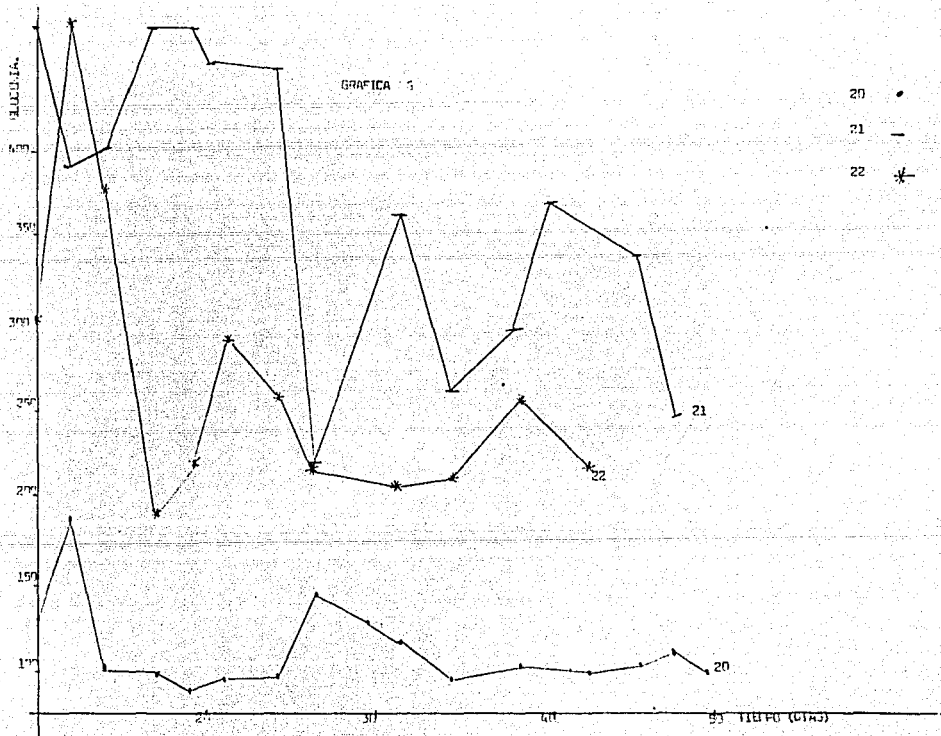
GRAFICA 3
PRUEBA DE FRACCIONES.

11 @
12 x
13 .

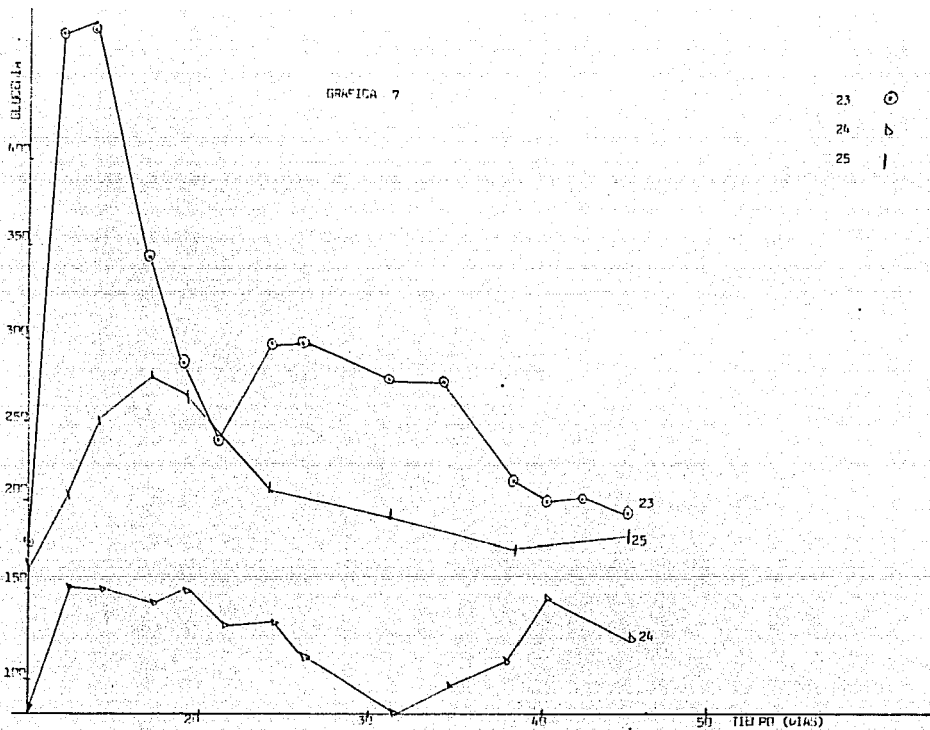


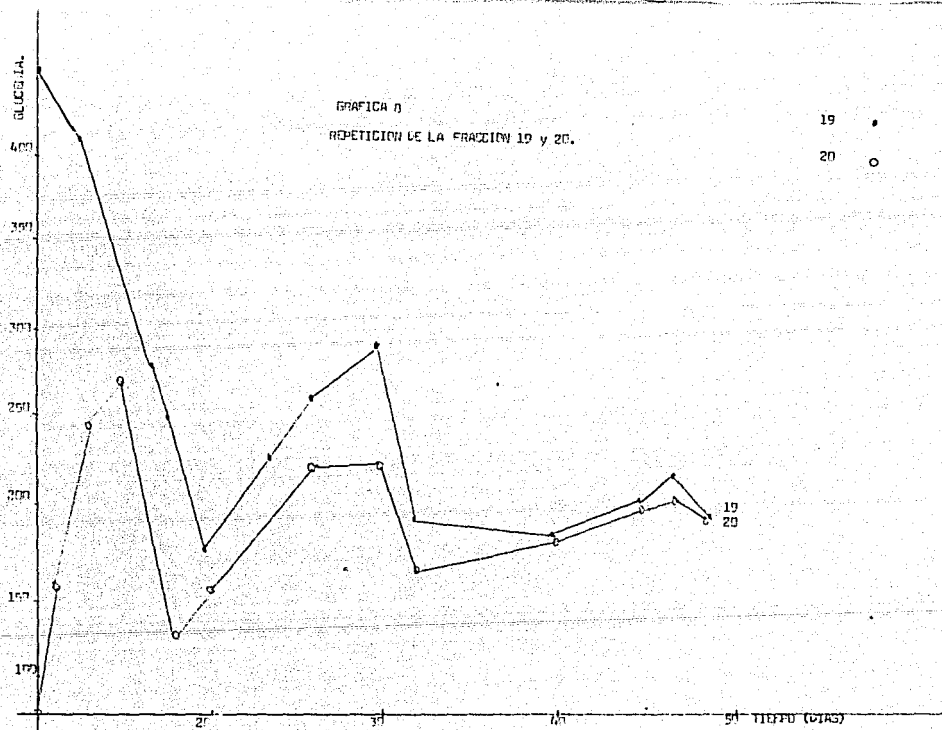






GRAFICA 7





ALUEA

4.70

3.50

2.50

2.00

1.50

1.00

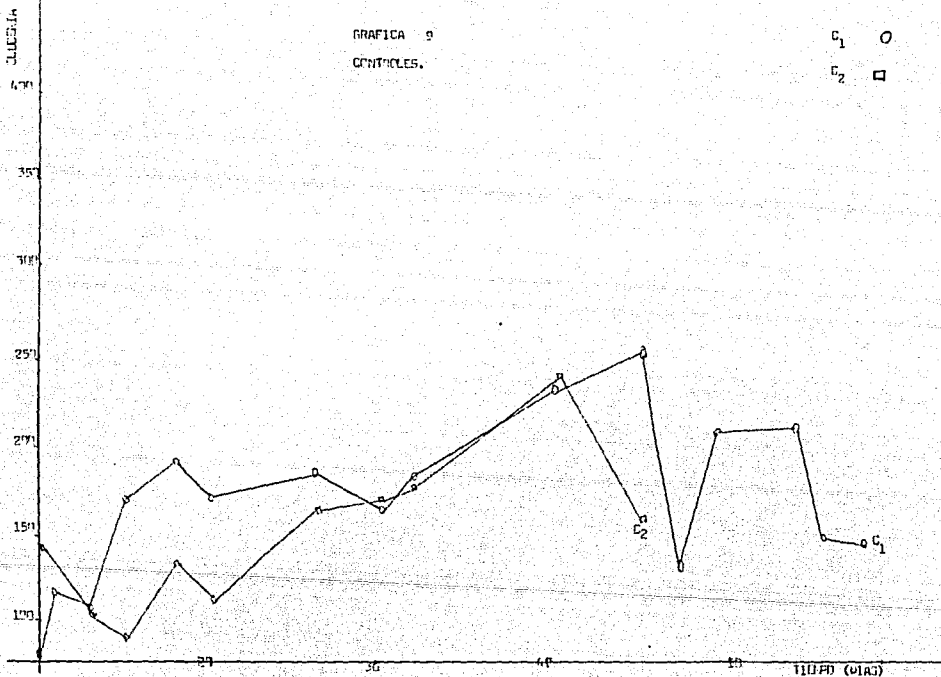
GRAFICA 2
CONTROLES.

C₁ ○

C₂ □

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100

11000 (01A3)



DISCUSION DE RESULTADOS

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Los datos obtenidos experimentalmente fueron analizados usando el análisis de varianza (ANALISIS DE ANADEVAS) para modelos lineales generales, los cuales estiman el efecto de las fuentes de variación debidas a los tratamientos, y las debidas al error experimental. (15)

Tabla de análisis de varianza "ANALISIS DE ANADEVAS", para estimar el efecto que tiene sobre la glucemia las diferentes vías de administración y formas de páncreas (macerado o completo) en las ratas de trabajo.

Tabla No. 1

	SC	IP	
PM	149.1	150.1	
	154.2	152.6	SC - Subcutáneo
PC	165.1	198.1	IP - Intraparietal
	173.3	156.5	PM - Páncreas macerado
			PC - Páncreas completo.

Nota: Cada valor corresponde al valor promedio de glucosa que resultó durante el tiempo de estudio cada rata.

Tabla 1.1

TABLA DE ANADEVAS				
FV	gl	SC	Mc	F
Vi	1	26.2	26.2	0.119
Fj	1	93.9	93.9	0.427
VIFj	1	36.8	36.8	0.167
BK(ij)	4	879.9	219.9	

REGLA DE DECISION.

Si F calculada, es mayor que una F de tablas, hay efecto significativo del factor o parámetro estudiado, de lo contrario, los resultados son debidos al error experimental.

Si F de tablas:

95% de 1 a 4 gl (grados de libertad) = 7.71

Por lo tanto como ninguna F es mayor a F de tablas, las diferencias encontradas en los resultados son debidas al error experimental.

Bajo el modelo anterior de análisis, los días que sobrevivieron -- las ratas con cada tratamiento fueron estudiados.

Tabla No. 2.0

	SC	IP
PM	42	42
	30	42
	42	42
PC	16	42

Nota: Cada valor corresponde al valor promedio de vida de las ratas en estudio. (días).

Tabla 2.1

TABLA DE ANADEVIA.

FV	gl	SC	MC	F calculada
Vi	1	329	329	4.25
Fj	1	18	18	0.23
ViFj	1	31	31	0.40
$E_{k(ij)}$	4	309	77.5	

Conclusión: Las ratas viven los mismos días independientemente de la administración del suero.

Tabla 3.0

ANALISIS DE FRACCIONES.

racción	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Glucemia	129.8	241.6	240	270	348	131	160	256	119.8	106
g/100ml	226.6	194.8	132.2	206.8	171	132	432	556	132.1	101.6
	198.3	158.6	253.6	295.8	325	485	130	128	111.8	190.8
	147.7	400.0	319.5	165.5	269		127		130	600
\bar{X}	703	995	945	937	1113	747	849	928	494	999

Fracción	21	22	23	24	25
Glucemia	500	272	285	329	135
	170	171	119	372	353
	395	150	280.3	120	119
	116	331.6	275	208	328
\bar{X}	1181	925	909	1029	1021

Tabla 3.1

TABLA DE ANADEVIA.

FV	gl	SC	MC	F calculada.
Fi	14	128953.35	9211	0.55
Ej ₍₁₎	43	709480.67	16499.5	

La F de tablas con 14 y 43 grados de libertad, es igual a 2.

Conclusión: Como F calculada es menor a F de tablas, las diferencias -- encontradas con los valores de glucemia son debidos a la -- variabilidad biológica de las ratas de experimentación y no al efecto de alguna fracción en especial.

Tabla 4.1

ANALISIS DE LA VIDA MEDIA EN FRACCIONES.

acc.	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
as	37	48	13	43	19	49	10	10	11	49	10	39	39	12	10
	62	24	19	30	30	10	47	10	38	49	10	14	37	14	25
	62	62	17	62	62	10	10	49	26	49	47	39	39	39	39
	37	13	24	43	24	-	10	-	10	10	10	11	10	10	34
	198	147	73	178	135	69	77	69	85	157	79	102	125	75	108
	10426	6893	1395	5442	5681	2601	2509	2601	2341	7303	2530	3338	4511	1961	3403

Tabla 4.2

TABLA DE ANADEVIA.

FV	gl	SC	MC	F calculada
Fi	14	5557.38	396.95	1.46
Bj(i)	43	116447.0	270.86	

Conclusión (de la tabla anterior): La F de tablas es de 2, por lo tanto, las diferencias encontradas en los días de vida es debido a la variabilidad de las ratas y no al efecto de alguna fracción.

DISCUSION DE RESULTADOS.

En este experimento observamos que al llevar a cabo la extirpación de páncreas en ratas diabéticas hay un incremento considerable de glucosa sanguínea hasta $470\text{mg}/100\text{ml}$. Sin embargo al administrar un páncreas nuevo por vía intraparietal, observamos que empieza a funcionar, puesto que van disminuyendo los niveles de glucemia en promedio de $150\text{mg}/100\text{ml}$, y encontramos que hay un promedio de vida de 42 días, siendo que las ratas diabéticas sin injerto sólo viven de 1 a 5 días.

Se probó la administración de suero en ratas diabéticas con injerto de páncreas y ratas diabéticas con injerto de páncreas sin suero, observamos que no hay diferencia significativa. En las ratas control se vió que las ratas sanas con injerto de páncreas y las ratas sanas con injerto de páncreas con suero, tampoco hay diferencia significativa, las cuales tuvieron un promedio de 62 días de vida y un promedio de glucemia de $150\text{mg}/100\text{ml}$. Las ratas vivieron los mismos días independientemente de la administración del suero.

Según los análisis de varianza, para estimar el efecto que tiene sobre la glucosa y las formas en que se administró el páncreas (tabla 1.1) en las ratas de trabajo encontramos que F calculada es menor que F de tablas y las diferencias encontradas en los resultados son debidas al error experimental, puesto que la regla de decisión es: Si F calculada es mayor que F de tablas hay efecto significativo del parámetro estudiado, de lo contrario los resultados son debidos al error experimental.

Se probaron 15 fracciones de suero, de la fracción 11 a la 25, de las cuales no encontramos una fracción que tuviera algún efecto en la sobrevida de injertos de páncreas. Como observamos en la gráfica de la fracción 20, los valores de glucosa se conservan semejantes, pero al repetir el experimento hay variación en los resultados.

Según los análisis de varianza (tabla 3.1) las diferencias encontradas en la glucosa son debidas a la variabilidad biológica de las ratas de experimentación, y no al efecto de alguna fracción en especial, puesto que r calculada es menor que F de tablas.

Encontramos que la vida media de las ratas al probar las fracciones, las diferencias encontradas en los días de vida, es debida a la variabilidad de las ratas y no al efecto de alguna fracción (tabla 2.1)

En este experimento no se encontró ninguna fracción que tuviera -- efecto en la sobrevida de injerto de páncreas en ratas diabéticas, como vemos en las gráficas de la 3 a la 9 de la prueba de las fracciones, donde se graficó glucemia contra días de vida. Ni el suero completo tiene efecto como se creía, ya que el suero tiene efecto en la sobrevida de injerto de piel. (2)

Pero se debe tomar en cuenta que pudo deberse a varias causas como:

- 1.- muerte por punción cardiaca al extraer la sangre.
- 2.- Exceso de anestesia.
- 3.- El páncreas como produce enzimas digestivas puede digerir páncreas mismo o el posible factor (si es que existe) en el suero que condiciona la sobrevida.

Sin embargo puede procurarse nuevamente llevando a cabo el aislamiento de los islotes de Langerhans, que son los productores de insulina, y no llevar a cabo el injerto de páncreas completo para que no interfieran - enzimas. Además evitando errores como: muerte por punción cardíaca, haciendo la extracción de sangre en mínima cantidad con un capilar, haciendo una pequeña herida en la cola y determinar glucosa por métodos - como electroforésis, con hemoglobina glucosada, utilizando una mínima - cantidad de sangre. (8)

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Con la obtención de datos y de su correspondiente análisis se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- 1.- No existe diferencia entre la concentración de glucosa de las ratas injertadas por cualquier vía de administración.
- 2.- La cantidad de glucosa entre el grupo de ratas que se les efectuaron injertos y diabéticas sin injertos, presentaron diferencias significativas, por lo tanto, el injerto si opera biológicamente en este ensayo.
- 3.- El suero no tiene efecto, ni en la sobrevida de la rata, ni en la concentración de glucosa en este experimento.
- 4.- La variabilidad entre los días que sobrevivieron las ratas pueden ser debidas a que murieron por lesión cardiaca ocasionada por la toma de sangre.
- 5.- Se piensa que el páncreas además de secretar insulina y glucagon, -- las enzimas que secreta pueden actuar sobre el páncreas mismo, o -- bién actuar sobre el posible factor de sobrevida en el suero.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Bellanti Joseph A. *Inmunología*.
Ed. Interamericana, 2a. ed., México, D.F. 1981.
- 2.- Flores Martínez Hugo. *Efecto de las Hemotransfusiones en la sobrevivida de un modelo de ratas*. Tesis Profesional. ENEP ZARAGOZA, UNAM. 1984.
- 3.- Brekke Inge B., Oyasater Stephanie, Vidnes J.
Long-term effect of pancreas transplantation on diabetic hyperglucagonemia.
Eur. surg. Res. 14: 211-220 (1982)
- 4.- Schulak J.A.
Effect of postmortem ischemia on the function of adult rat islets following pancreatic transplantation.
Metabolism. Jul. 32 (7) 643-645 (1983)
- 5.- Hunter and Hunter. *Analysis of experiments*.
Ed. John and sons. 1970.
- 6.- Instituto Mexicano del Seguro Social.
Manual de procedimientos de Laboratorio.
México, D.F. 1978.

- 7.- Cunninhan Bruce A. Inmunología.
Libros de investigación y ciencia. Cientific American.
Ed. Labor S.A., 1a. ed., 200-205 (1983)
- 8.- Lehninger Albert L. Bioquímica.
Ed. Omega S.A., 2a. ed. 164 (1981)
Barcelona.
- 9.- Stites Daniel P. et.al. Inmunología Básica Clínica.
Ed. El Manual Moderno S.A. de C.V.
México, D.F. 1985.
- 10.- Ortiz O. Librado. Inmunología.
1va. ed., Ed. Interamericana, México, D.F. 1987.
- 11.- Fudernberg H. et.al. Basic and clinical immunology.
Lange medical public. cap. 1, II . 1980.
- 12.- Mora J. Luis, Ortiz Oscar y Sanchez J. Francisco.
Evaluación de la Respuesta Inmune en un Modelo experimental de
Diabetes Mellitus en Ratas. Tesis Profesional.
UNAM. ENCP ZARAGOZA. 1982.

- 13.- quevedo, Elena. Determinación del Complemento en Unidades 50% Hemolíticas en un modelo de Ratas Diabéticas a diferentes intervalos de inducida la diabetes.
UNAM. ENEP ZARAGOZA. México, D.F. 1983 25-26
- 14.- Krupp M. A. ; Chaton M.J.; Current Medical Diagnostic and. treatment, Lange Medical; Los altos Cal. EUA. 735-40 1981
- 15.- Daniel Waynow. Bioestadística. base para el análisis de la ciencia de la salud., Ed. Limusa. 1a. ed. 193-237 1985.
- 16.-Vigne J.; Le Diabete, La Recherche, 115 ; 1130-39 1980
- 17.- Inglis J.R. Histocompatibility. Immunology
today lange medical public. N.Y. EUA:1-20 1980
- 18.- Tager, H. Givens M. Estructurally abnormal Insulina Causing Human diabetes; nature 280 ;5727 . 122-125 1979.
- 19.- Garza E. I. Fernández R.A. Manifestaciones Orales de la Diabetes Mellitus. Tesis Profesional. UNAM. ENEP ZARAGOZA 5-11 1980.
- 20.- Cunningham B.A. Estructura y funcionamiento de los Antígenos de Histocompatibilidad. Libros de Investigación y Ciencia.Cientific. American 1977.

- 21.-Liderman J. and Biz H. Cellular Receptores; Binding of Radioactively Labeled Anti-alloantiserum. J. Exp. Med. 136 (1972)
- 22.- Levinsky R.J.: The Measurement of immune complexes immunology today techniques. (1981)
- 23.- Brostoff J., et.al. Immune Complexes in Alopoy in the mast Cells. its in Healt and Diseases. (1979).
- 24.- Dausset J., et. al.; Serologically Defined HLA antigens and Long-term Survival of cadaver kidney transplants; a joint of 918 cases performed by france transplant and the london transplant group, N. Engl. med. (1974).
- 25.- Hellström I., Hellström K.F.; Can "Blocking" Serum factor protect against autoimmunity. Nature 240 (1972).
- 26.- Wood P. Horsburgh T. Especific Unresponsiveness to skin allografts in mice. Transplantation 31 (1981).
- 27.- Henkoven R. et.al. Lymphoid cell subclasses in rejecting. Renal - allograft in the rat. Cell Immunology. 77 (1983)
- 28.- Bach F.T. Bach M.L. Differential junction of mayor histocompatibility complex antigens in T Linfocyte activation. Nature 259 (1976).