

24.20



Universidad Nacional Autónoma de México

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"ZARAGOZA"

"TRANSPLANTE DE ISLOTES PANCREATICOS, POR VIA
INTRAPORTAL, EN UN MODELO DE RATAS
ALOGENICAS INMUNOSUPRIMIDAS"

T E S I S

Que para obtener el título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a

VICTOR ROMAN MADRUEÑO GUTIERREZ



México, D. F.

1986



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 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.

CONTENIDO

Capítulo 1 ANTECEDENTES

1.1 Historia de la Diabetes Mellitus.....	1
1.2 Clasificación de la Diabetes.....	2
1.3 Situación de la Diabetes en México.....	5

Capítulo 2 INTRODUCCION

2.1 Anatomía del Páncreas.....	6
2.1.1 Páncreas exocrino.....	6
2.1.2 Páncreas endocrino.....	7
2.2 Estructura de la insulina.....	7
2.2.1 Secreción de la insulina.....	10
2.2.2 Acción metabólica de la insulina.....	10
2.3 Modelos experimentales de Diabetes.....	11
2.4 El trasplante de páncreas.....	12
2.4.1 Antecedentes.....	12
2.4.2 Técnicas de trasplante pancreático....	14
2.5 El problema inmunológico del trasplante.	16
2.5.1 El sistema mayor de histocompatibili dad (HLA).....	16
2.5.2 Bioquímica del HLA.....	20
2.5.3 Genética del HLA.....	20
2.6 Efectos de la respuesta inmune.....	22
2.7 Inmunosupresores.....	24

Capítulo 3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....26

Capítulo 4 OBJETIVOS27

Capítulo 5 HIPOTESIS28

Capítulo 6 METODOLOGIA.....29

6.1 Obtención del tejido pancreático.....	29
6.2 Aislamiento de islotes.....	29
6.3 Purificación de islotes.....	30
6.4 Cultivo de islotes.....	30
6.5 Inducción del estado diabético.....	30
6.6 Trasplante de islotes pancreáticos.....	31

Capítulo 7 RESULTADOS	32
7.1 Obtención del tejido pancreático.....	32
7.2 Aislamiento de islotes.....	33
7.3 Purificación de islotes.....	33
7.5 Inducción de la diabetes.....	35
Capítulo 8 DISCUSION.....	38
Capítulo 9 CONCLUSIONES.	42
Capítulo 10. BIBLIOGRAFIA.....	43

1 ANTECEDENTES

1.1. HISTORIA DE LA DIABETES MELLITUS.

En la primera centuria de la era cristiana, Celso y Areteo - describieron clínicamente la diabetes; posteriormente, en el año- 1000 d.c. Avicena logra integrar los datos clínicos de dicha en- enfermedad. Tomas Willis en 1670. observó que la orina de los diabé- ticos tenía un olor dulce y agrega el vocablo Mellitus a la enfer- medad. Después, en 1764 Dobson y Pool encuentran azúcar en el re- siduo de la orina evaporada de un diabético y 16 años después, Ro- llo describe el primer régimen para los pacientes que presentaban diabetes. En México, en 1836 se edita el primer número del periód- ico de la Academia de Medicina con 2 artículos que versaban acer- ca de la diabetes y en el mismo siglo, se publican varias revisio- nes de trabajos extranjeros, fundamentalmente franceses, que in- troducen criterios sobre el "origen nervioso" de la diabetes, ar- tículos en que se propone investigar la presencia de azúcar en la orina (glucosuria) como método diagnóstico de laboratorio median- te el empleo del ácido litofélico así como el tratamiento con sa- les de arsénico (Botkin), en virtud de su acción sobre la médula. En la misma época en México, aparece uno de los trabajos más im- portantes sobre diabetes intitulado "La Diabetes Sacarosa", de -- Pablo Gutiérrez que consiste en una revisión amplia de los concep- tos más adelantados sobre el origen de la enfermedad, la clínica, los criterios diagnósticos y terapéuticos. En 1869, Langerhans -- descubre los islotes celulares del páncreas y 20 años después, -- Von Mering y Minkowsky demostraban que la inducción de la diabe- tes en perros se podía llevar a cabo mediante pancreatectomía to- tal. Siguiendo esta línea, Banting y Best en 1921 extraen una sus- tancia del páncreas de perro la cual disminuía los niveles de gluco- sa sanguínea, la insulina. En 1922, Mario Quiñonez realiza su té- sis con el tema "La Diabetes y su Tratamiento" y en 1926 publica -

un artículo sobre la insulina en el cuidado de la diabetes. Juan Manuel González en 1929 publica una revisión del tema que introduce en la literatura médica mexicana tanto la teoría de espasmos de origen nervioso de Cullen como la patología renal asociada a la diabetes. En el año de 1939 Hagerdom introduce la primera insulina de acción prolongada y en 1953 Sanger caracteriza la estructura química de la insulina de buey. En el mismo año Franke y Facks en Alemania y Loubatieres en Francia descubren la acción hipoglucemiante de la carbutamida iniciando el uso de los hipoglucemiantes orales. La caracterización de la estructura química de la insulina humana se describe hasta 1960 con Nicol y Smith y en 1964 Katsoyannis y Zahn logran la síntesis de las cadenas A y B de insulina y las combinan con material biológicamente activo. Pese a estos descubrimientos la diabetes mellitus y sus complicaciones no fueron controladas ni con el uso de la insulina en sus distintos esquemas y presentaciones farmacológicas ni con los regímenes dietéticos e hipoglucemiantes orales por lo que el estudio de esta enfermedad se enfoca ahora a prevenir el desarrollo de complicaciones tardías para lo que se introdujeron nuevos métodos de laboratorio como la hemoglobina y albúmina glucosiladas, los cuales orientan acerca de las concentraciones de glucosa en sangre por períodos que oscilan entre los 15 y 45 días. Es a raíz de las investigaciones de Gayet y Guillaumie en 1927, sobre trasplante de páncreas que se abre otra luz al problema del control de la diabetes mellitus al diseñar nuevas técnicas de trasplante pancreático y de islotes que dieran mayor esperanza al paciente diabético (1, 2).

1.2. CLASIFICACION DE LA DIABETES.

Para fines didácticos simplificaremos la clasificación de la diabetes mellitus adoptada por la NDDG: (National Diabetes Data Group):

1.- Diabetes Mellitus (DM). caracterizada por hiperglucemias -- prolongadas (mayores de 140 mg./100 ml.) ó niveles elevados de glucosa en plasma durante la prueba de tolerancia a la glucosa -- (PTG). A su vez comprende dos clases:

- a) Diabetes Mellitus tipo I, diabetes mellitus insulino dependiente o diabetes juvenil. Se caracteriza por un aumento abrupto de los síntomas tales como insulinopenia, poliuria, polidipsia, polifagia que progresivamente cambia a anorexia, pérdida de peso y propensión a la cetosis. Es común en niños, adolescentes y adultos jóvenes. A este tipo se asocian factores ambientales y predisposición genética involucrados con ciertos tipos de HLA. Se piensa que existen procesos autoinmunes vinculados al padecimiento, además de que ciertas infecciones virales se ven implicadas en el proceso inflamatorio pancreático (insulinitis), como la parotiditis, rubeola y el coxsackie B₄.

- b) Diabetes Mellitus tipo II, insulino independiente o diabetes del adulto. Puede cursar o no con obesidad. Los pacientes no dependen de la insulina sin embargo, pueden requerirla para la corrección de hiperglucemias persistentes si es que éstas no pueden ser controladas con dietas o medicamentos hipoglucemiantes. Los pacientes pueden ser asintomáticos por años o décadas y muestran una progresión muy lenta de la enfermedad; a este tipo de diabetes se asocian con mayor frecuencia complicaciones como la microangiopatía, neuropatías y cataratas. Los factores hereditarios tienen mayor importancia que en la tipo I pues se encontró una gran concordancia para presentar diabetes en gemelos monocigotos, también factores ambientales que están involucrados y que actúan como agentes desencadenantes del padecimiento.

2.- Otros tipos; diabetes secundaria. Se involucra con otras patologías o síndromes y por lo general en estos tipos se conoce la causa directa del padecimiento, no hay relación con genes, herencia, virus o autoinmunidad; la diabetes puede ser secundaria:

- a) Transtornos pancreáticos o remoción del tejido pancreático.
- b) Transtornos endócrinos como acromegalia, síndrome de Cushing, glucagonoma, aldosteronismo primario, etc.
- c) La administración de drogas hiperglucemiantes como glucocorticoides, agentes antihipertensivos y otros.

3.- Intolerancia a la glucosa, también se conoce como diabetes asintomática, diabetes subclínica o latente. Cursa con niveles de glucosa plasmáticos que no llegan a la cifras definidas para diabetes pero que están por encima de los valores normales o de referencia. Se asocia a otras patologías como enfermedad pancreática, hormonal, inducida por drogas, anormalidad en el receptor de insulina y ciertos síndromes genéticos. Puede cursar con o sin obesidad y en algunos individuos puede representar un estado en el desarrollo del tipo I o del tipo II.

4.- Diabetes gestacional. Existe una elevación de la PTG durante el embarazo debido al aumento en la producción de hormonas como los estrógenos y el lactógeno placentario que antagonizan con la insulina en el embarazo. Después del parto, el mal puede quedar como antecedente o bien continuar permanentemente.

En esta clasificación, se incluyen estados que pueden ser parte de la evolución normal de la diabetes en los cuales no existen anomalías en el metabolismo de los carbohidratos y que -

están definidos como anomalías previas a la PTG (prediabetes) y anomalías potenciales a la PTG (potencial) (3,4,5,6).

1.3 SITUACION DE LA DIABETES EN MEXICO

En nuestro país, estudios realizados por varios investigadores ha puesto de manifiesto que la diabetes afecta del 2 al 5% de la población general y a más del 33% de las personas con antecedentes familiares. En la población más expuesta la prevalencia es del 10% (7). Por otra parte se ha observado que la predisposición genética es alta por lo que, conforme nuestra población envejezca, la prevalencia irá en aumento y por lo tanto el número absoluto de casos.

Desde 1975 la diabetes ocupa el 10o. lugar dentro de las 10 principales causas de mortalidad general en nuestro país; en los grupos de 45 años y más ocupa lugares que oscilan del 3o. al 9o. y comparativamente con años anteriores, la mortalidad por diabetes se ha incrementado, de manera que en 1963 ocurrieron 3 449 defunciones con tasa del 16.2 por 100 000 habitantes (8). Estudios parciales realizados por diversas instituciones del País -- corroboraron los datos anteriores. La Clínica de Diabetes del -- Hospital de Enfermedades de la Nutrición, en estudios de prevalencia encontró más del 2% de casos. La Dirección General de Servicios Coordinados de Salud Pública en los Estados en un programa piloto de detección de diabetes en los Estados de México y -- Puebla en una población seleccionada que ascendió a 3 000 personas, encontrando más del 12% de casos. En el D.F. muestreos realizados en población adulta urbana aparentemente sana se encontraron tasas del 11.6 por 1 000 personas examinadas; por otra -- parte el IMSS. en 1978 a través de su programa de detección precoz del padecimiento, reportó el 1.2% de diabéticos en población derechohabiente y el 1.9% de diabéticos clínicos. El ISSSTE, en una población de 100 000 adultos no seleccionados halló una tasa

del: 4.5% de casos y 15% de prediabéticos (9).

2 INTRODUCCION

2.1. ANATOMIA DEL PANCREAS

El páncreas es una glándula de secreción; endócrina y exocrina intraabdominal que se localiza detrás del estómago y por delante de las vértebras lumbares I y II, entre el duodeno y el bazo; es un órgano blando carnoso, con muy poco tejido conectivo. Se compone de cabeza, cuerpo y cola. La cabeza se halla enmarcada por la curva duodenal y se le yuxtaponen por delante la región pilórica del estómago y la primera porción del duodeno. En el páncreas se distingue la porción exócrina de la endócrina (10).

2.1.1 PANCREAS EXOCRINO

El páncreas exocrino 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 emerge por la cola del páncreas y se dirige hacia la derecha, entra en relación con el coledoco con el que desemboca en la segunda porción del duodeno, en la papila mayor (11).

Esta porción exócrina del páncreas comprende aproximadamente el 98 al 99% del peso total de la glándula (12) y produce el jugo pancreático cuya secrección se regula por mecanismos humorales y nerviosos (parasimpáticos). El jugo pancreático esta formado por una gran variedad de enzimas como la tripsina, quimotripsi

na, carboxipeptidasa, ribonucleasa y desoxirribonucleasa (enzimas proteolíticas) así como amilasa pancreática, colesterasa y lipasa pancreática para la digestión de carbohidratos y lípidos (13).

2.1.2 PANCREAS ENDOCRINO.

La porción endócrina de la glándula pancreática consta de pequeñas células que forman aproximadamente el 1% del peso total del órgano (14). A estas pequeñas células se les denomina islotes de Langerhans y están diseminadas en el espesor del páncreas; cada islote está abundantemente irrigado por capilares en los cuales vierten su contenido (15). En estos islotes coexisten distintos tipos celulares como las células A, productoras de glucagon B, productoras de insulina D, cuya producción es de somatostatina, las productoras del péptido intestinal vasoactivo (VIP) o células D₁, células que producen el polipéptido pancreático (PP), así como un grupo de células heterogéneas denominadas EC - productoras de péptidos como la sustancia P, motilina y encefalina (16).

En las ratas, las células B se localizan en la periferia del islote. Contienen gránulos solubles al alcohol, son redondeados y homogéneos, incluidos en vesículas membranosas (17).

El concepto de células B, nació en 1907 cuando Lane describió las células A y B de los islotes. Originalmente, las células B se caracterizaron por su contenido de gránulos citoplásmicos, solubles en alcohol; en este tiempo nadie conocía la capacidad de estas células para producir la insulina sin embargo, la evidencia morfológica mostraba que estaban involucradas en el desarrollo de la diabetes (18). Hoy, la célula B se define no solo por sus características histológicas y citoquímicas, sino también --

por su habilidad para expresar un complicado juego de genes el -- cual provee a la célula de un mecanismo único para sintetizar, al macenar y secretar insulina en su concentración exacta para los -- requerimientos metabólicos del organismo. La célula B expresa en su membrana ciertos antígenos para este tipo celular que pueden -- inducir respuestas autoinmunes (19).

2.2 ESTRUCTURA DE LA INSULINA.

La insulina es una hormona protéica, producida por los islotes de Langerhans los cuales, como ya se mencionó, constituyen el 1% del tejido pancreático. La molécula de insulina tiene un PM de 6000 y consta de 2 cadenas de aminoácidos (A y B) conectadas por puentes disulfuro. Existe un tercer puente intradisulfuro en la cadena A. La ruptura de cualquiera de estas uniones inactiva la insulina (fig.1) (20)

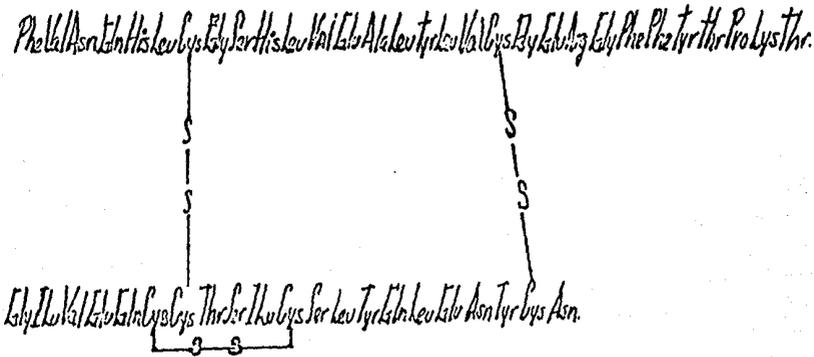


Fig. 1 ESTRUCTURA DE LA INSULINA

La insulina que se almacena contenida en el paquete vesicular de la célula B se condensa para formar el gránulo B típico envuelto en sacos membranosos (21)

2.2.1. SECRECIÓN DE LA INSULINA.

La insulina se secreta mediante un proceso denominado Emerocitosis, que se inicia cuando los gránulos B 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. La concentración elevada de glucosa -- sanguínea es el estímulo para la liberación de insulina cuya concentración en sangre es de 10 a 20 μ U/ml. Con el advenimiento de -- las hormonas gastrointestinales se han puesto de manifiesto 3 mecanismos que favorecen la secreción de insulina.

- a) La absorción de nutrientes y su paso a la circulación sistémica (niveles elevados de ciertos aminoácidos).
- b) Liberación de hormonas gastrointestinales (fundamentalmente -- el péptido inhibidor de gastrina)
- c) Señales neurogénicas por la ingestión de alimentos que ha -- permitido integrar el eje entero insular (22).

El Ca^{++} desempeña un papel importante en la liberación de insulina la cual se secreta junto con péptido C y una pequeña cantidad de proinsulina libre. El promedio de vida de las moléculas de insulina en sangre es de solo 3 o 4 minutos y su degradación se lleva a cabo en el hígado (40%) y el riñón (15 a 20%) por la enzima glutación insulina transhidrogenasa que separa por reducción las uniones disulfuro que conectan las cadenas A y B de la insulina para -- después degradarlas por proteólisis (23 - 25)

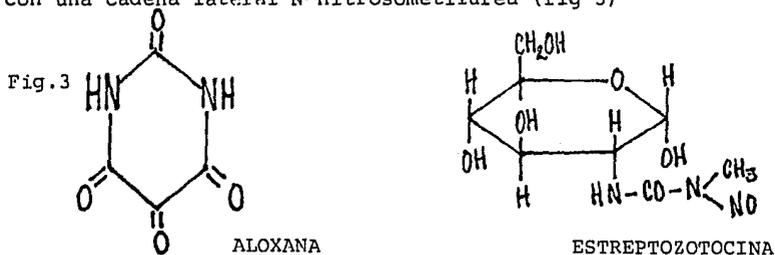
2.2.2. ACCIÓN METABÓLICA DE LA INSULINA.

Las células blanco para la insulina, 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 guanósino-3', 5'-fosfórico cíclico (GMPC), que actuaría como el segundo mensajero en la activación de la respuesta hormona-receptor ya que en células adiposas se observan incrementos en la concentración del GMPC, disminución de la concentración del AMPC, incrementos en la biosíntesis de triglicéridos a partir de glucosa y una disminución en la hidrólisis enzimática de lípidos, la insulina induce la conversión de la forma inactiva de la glucógeno sintetasa a su forma activa, intensifica la glucoquinasa y la fosfofructoquinasa, suprime la formación de ciertas enzimas de la gluconeogénesis tales como la piruvato carboxilasa y la fructosa difosfatasa. Para los aminoácidos, la insulina favorece la síntesis protéica, además de ejercer 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 K^+ , así como la biosíntesis de productos protoplásmicos y de almacenamiento. El efecto más aparente de la insulina administrada a un mamífero es la pronta reducción del nivel de glucosa en sangre lo cual se debe, según se cree, a una intensificación del transporte de glucosa desde la sangre a través de la membrana plasmática de sus células blanco hasta el espacio intracelular (26).

2.3 MODELOS EXPERIMENTALES DE DIABETES.

Para el estudio de la diabetes, los modelos que se han empleado son los naturales o espontáneos, como es el caso de hamster chino y sudafricano (27). Otros incluyen el de diferentes agentes como los virales (Coxsackie, generos EMC y algunos picorna

virus) para la destrucción de los islotes pancreáticos (28), o bien, el uso de diversos fármacos diabetogénicos. Dentro de es tos fármacos se encuentran aquellos con un efecto citotóxico - sobre los islotes pancreáticos, como son el ácido dehidroascórbico y la ditizona. Otros como el diazóxido, la 6-aminonicotina mida y la azaserina ejercen su efecto al interferir con los mecanismos de liberación de la insulina (29). Existe otro grupo - de fármacos con efecto bloqueador de insulina y citotóxico como la aloxana (alloxan) que es un derivado de la pirimidina, y la estreptozotocina (streptozotocin) que es una 2-desoxi-D-glucosa con una cadena lateral N-nitrosometilurea (fig 3)



La aloxana inhibe el ciclo de Krebs al disminuir la oxidación de glucosa y manosa, también tiene un efecto bloqueador -- sobre el ciclo del ácido cítrico a nivel de la oxidación del -- succinato (30). Por otra parte, la estreptozotocina inhibe la oxidación de glucosa y la liberación de insulina, con disminución del NAD en las células del islote y por tanto causa deterioro de célula B (31).

2.4 EL TRANSPLANTE DE PANCREAS.

2.4.1 ANTECEDENTES.

En 1927 por primera vez, Gayet y Guillaumie transplantan-

el páncreas completo de un perro a otro, previamente pancreatectomizado y demuestran que el trasplante de este órgano es capaz de regular la concentración de glucosa en la sangre de los animales pancreatectomizados, por un período de 12 hrs. Botin, en 1936 revasculariza un homotrasplante de páncreas en un perro y reporta una sobrevivida mayor de 7 días. La técnica del trasplante pancreático logra otro avance importante con Lichtenstein y Barschak cuando en 1957 descubren que el fracaso en sus trasplantes se debe a factores tales como la torsión vascular acompañada de trombosis y pancreatitis que finalmente llega al rechazo del órgano. De Jode Y Howard en 1962 reportan una técnica de trasplante de páncreas total en perros al implantar páncreas con una porción del duodeno del donador con el fin de drenar la secrección exócrina al intestino del receptor, con lo que se logró una sobrevivida del trasplante de 9 días (32). En 1964, Hellestrom reporta el primer método de disección manual de islotes pancreáticos de ratas obesas e hiperglucémicas para estudios enzimáticos y 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 (33). Yunoszai y asociados, en 1969 reportan por primera vez el trasplante de islotes aislados a ratas diabéticas, por vía intraperitoneal con mejoría parcial del estado diabético (34). En 1970, Strautz logra revertir algunas complicaciones tardías de la diabetes mellitus al transplantar islotes pancreáticos en ratones ob/ob (35). Posteriormente, Lacy y Ballinger demuestran que para mejorar el estado diabético inducido con estreptozotocina en ratas isogénicas se requiere de 400 a 600 islotes (36). Reckar y Baker, en 1973 "curan" la diabetes mediante el trasplante intraperitoneal de islotes pancreáticos isólogos. En el mismo año, Lacy aisla islotes de ratas adultas y Kempt experimenta nuevas rutas de trasplante de islotes (37). De este año a la fecha, las publicaciones de trasplante de islotes se han incrementado

notablemente con la introducción de diferentes modelos experimentales incluido, el humano.

2.4.2 TECNICAS DE TRANSPLANTE PANCREATICO.

En el trasplante pancreático el problema que existe es el rechazo, sin embargo se ven otras consideraciones técnicas que merecen importancia y por las cuales se han desarrollado diversos métodos de trasplante. Estos problemas son, entre otros la secreción exócrina y la trombosis vascular. El prevenir estas 2 dificultades dió como resultado 3 técnicas generales que contienen a su vez una serie de variantes para el trasplante pancreático.

- 1) Injerto pancreático de todo el órgano (en asociación con el duodeno). Con drenaje exócrino al intestino o en otras víceras del receptor, tiene como variantes.
 - a) Injerto pancreático duodenal.
 - b) Injerto pancreático duodenal con doblés en la papilla de Vater y anastomosis del ducto enlazado al yeyuno.
 - c) En bloque con otros órganos (38, 39).

Las principales desventajas que presenta esta técnica, han sido la trombosis por torsión vascular (el duodeno esta propenso a necrosis y/o ulceramiento. El escape anastomótico es grave por la activación de enzimas exócrinas(40).

- 2) Injertos de segmentos pancreáticos (cola o cuerpo del páncreas) los cuales no tienen drenaje exócrino. La técnica del injerto de segmentos pancreáticos es más sencilla y evita algunos de los problemas que tiene la técnica del injerto de páncreas total, ya que el drenaje exócrino se canaliza al anastomosar el páncreas transplantado al yeyuno del receptor (41), aunque pueden ocurrir fu

gas anastomóticas, activación enzimática y necrosis. De forma similar que la técnica anterior, el transplante de segmentos pancreáticos tiene algunas variantes:

- a) Transplante de segmentos pancreáticos con ligadura del ducto donde, teóricamente, el tejido exocrino se atrofia y el tejido endócrino puede permanecer intacto. -- Sin embargo existe una relativa alta incidencia de pancreatitis y trombosis vascular después de ligado el ducto, además de que se puede presentar una reacción inflamatoria aguda del páncreas (42).
 - b) Transplante de segmentos pancreáticos con obstrucción del ducto mediante inyección de polímeros sintéticos -- con el objeto de destruir totalmente el sistema ductal (43). Estos polímeros se endurecen casi inmediatamente después de inyectarse y forman un molde sólido dentro del ducto mayor y sus ramificaciones eliminando con -- ello la secreción y función exocrina (autodigestión -- del tejido exocrino). Entre estas sustancias encontramos al Neoprene, acrilatos y el poli-isopropeno (44). Los efectos adversos que se presentan son fibrosis del tejido pancreático con inflamación persistente e islotes morfológicamente degenerados (45)
 - c) Transplante de segmentos pancreáticos con drenaje al peritoneo. Esta técnica se desarrolló gracias a la propiedad que tiene la cavidad peritoneal de absorber las secreciones de los segmentos pancreáticos con un mínimo de complicaciones (46).
- 3) Transplante de islotes libres
- a) Transplante de islotes aislados de adulto. Se basa en la desorganización del parénquima pancreático por la --

introducción de una solución salina balanceada para posteriormente, fragmentar el tejido y exponerlo a digestión enzimática para separar los islotes B₁ del tejido exocrino y purificarlos mediante un gradiente de densidad (47, 48). Esta técnica a pesar de no tener los inconvenientes del trasplante de páncreas total ni segmentario, requiere de un alto rendimiento de islotes puros y de otras consideraciones técnicas que varían de acuerdo al modelo experimental (49).

- b) Trasplante de islotes intactos con pobre secreción -- exocrina (páncreas fetal o neonatal) . En esta técnica se obtienen islotes de páncreas con bajo contenido en enzimas proteolíticas y mayor cantidad de tejido acinar que en el adulto (48). No se requiere aislar el tejido exocrino del endócrino. La desventaja es su considerable potencial inmunológico (50)
- c) Trasplante de páncreas disperso. Se obtiene de donadores a los que se les indujo atrofia exócrina o al transplantar páncreas en sitios con mayor resistencia a la introducción de enzimas pancreáticas. La atrofia exocrina se produce mediante la introducción de un análogo de la metionina (DL-Etionina) (51).

2.5 EL PROBLEMA INMUNOLOGICO DEL TRASPLANTE.

2.5.1 EL SISTEMA MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD (HLA)

La idea del trasplante de órganos se concibió desde hace mucho tiempo. Los experimentos en animales en los inicios de siglo llamaron la atención al hecho de que la supervivencia de órganos transplantados estaba en función de diferentes factores inmunológicos como la individualidad en animales de experimentación (52). También se mostró que las células de di-

ferentes órganos poseen antígenos comunes, los cuales están presentes en leucocitos y son determinantes de histocompatibilidad.

De todos los sistemas genéticos que codifican antígenos de trasplante solo uno parece tener importancia decisiva en la supervivencia de los aloinjertos y sus efectos son difíciles de superar, incluso con fármacos inmunosupresores. Este sistema es el HLA, de histocompatibilidad o complejo mayor de histocompatibilidad (MHS), que consiste en una serie de genes fuertemente unidos en un segmento de cromosoma (número 6 en el hombre) normalmente heredado en bloque y denominado "Haplotipos" HLA (53).

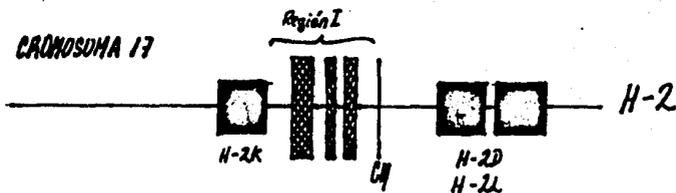
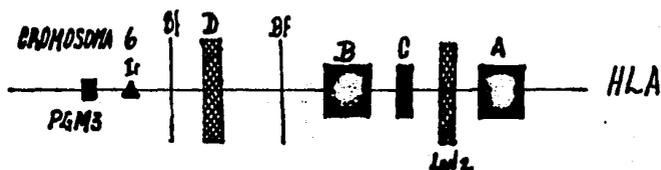
La introducción de los antígenos HLA dentro de receptores de diferente grupo de tejidos, induce una respuesta tanto humoral como celular (54). También denominados antígenos de tejidos; los antígenos de histocompatibilidad se conocen en otras especies; por ejemplo el H-2 en el ratón, Rth-1 (o Ag-B) en la rata, el locus B del pollo, el RL-A en el conejo, DL-A o sistema del perro, ChL-A en el chimpancé, etc. (55).

Se observó por otra parte que, si hay diferencia de estos antígenos entre el donador y el receptor de un cierto aloinjerto, el injerto lo rechaza. Por esta razón los antígenos de histocompatibilidad junto con los antígenos sanguíneos A y B se llaman antígenos de trasplante (56)

Existen 5 genes íntimamente relacionados en esta región cromosómica que han sido designados oficialmente como genes HLA: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-D y HLA-DR. Los productos de 2 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. Los antígenos tienen movilidad libre sobre la membrana celular y cuando son expuestos a anticuerpos con fluorescencia, se observa que se aglutinan y coalescen en casquete para luego desaparecer (fig. 4) (57)

fig. 4



- = Gen de respuesta inmunitaria
- = Gen de fosfoglucomutasa 3
- = Genes de especificidad inmunitaria asociada
- = Genes de especificidad antigénica.
- = Genes determinantes de la activación del linfocito (Lad)
- = Genes de componentes de complemento.

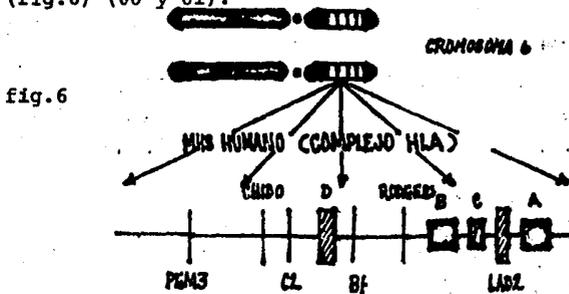
Los loci A, B y C se reconocen mediante prueba de linfotoxicidad dependiente de complemento y se denominan serológicamente definidos (SD). Los antígenos del locus A, determinan las series A de antígenos llamados también SD1. En el locus B encontramos los antígenos de las series B o SD2 y los alelos en el locus C, determinan las series SD3. La secuencia de los 3 locus en el cromosoma es BC_A, donde el C está muy cercano al B (58).

El producto del locus D y DR se reconocen por su habilidad para estimular linfocitos t alogénicos (Cultivo mixto de linfocitos o MLC) (fig.5) (59).



Linfocitólisis mediada por células (MLC) (1) Células que responden no tratadas (2) Células estimuladoras tratadas con mitomicina. Deben estimular a las células que responden en el MLC. (3) Células blanco marcadas con Cr⁵¹ (4) Radiactividad significativa señala que las células blanco han sido destruidas y deben compartir los antígenos "blanco" con las células estimuladoras.

El HLA incluye locus adicionales. El locus Ir, Ia, Ds o de susceptibilidad a enfermedades, el loci HDR o de reacción de hipersensibilidad retardada, componentes de complemento como los factores C₂, C₄ y C₆, factor Bf y el loci con determinantes de antígenos para los sistemas eritrocitarios Chido, Rodgers y Bg. (fig.6) (60 y 61).



Los antígenos HLA se estudian mediante el empleo de anticuerpos. La inmunización hacia HLA se logra al poner en contacto unas células con antígenos HLA alogénicas lo cual puede ocurrir en el embarazo (mujeres multíparas) o como resultado de transfusiones, injertos de piel o trasplante de otros órganos (62).

2.5.2 BIOQUIMICA DEL HLA.

Los antígenos HLA son moléculas protéicas que se adhieren -- firmemente a la superficie de casi todas las células. Probablemente, parte de la membrana se halla embebida en la membrana externa de la célula o la atraviesa. Estos antígenos son, en realidad, -- glucoproteínas que se detectan y clasifican por su capacidad para unirse a anticuerpos específicos, que se forman al inyectar células alogénicas a un animal para inducir la síntesis de anticuerpos específicos dirigidos contra las moléculas propias (63).

2.5.3 GENETICA DEL HLA

El sistema HLA es muy complejo debido a su gran polimorfismo genético. Los genes del sistema se heredan a la manera mendeliana (fig.7) (64).

Puesto que los genes se comportan como alelos, únicamente -- un gene esta presente en cada locus, esto es, 3 en cada cromosoma. De esta forma un par de cromosomas contienen 6 genes HLA y cada individuo tiene 6 antígenos, 2 de A, 2 de B y 2 de C (series SD). Se conocen aproximadamente, 60 antígenos en las 3 series del conjunto y cada serie puede contener al menos un antígeno no conocido, denominado "blanco" o X_1 , X_2 y X_3 respectivamente. Lo anterior se comprueba con el número posible de fenotipos que asciende a va-

rios millones (fig 8) (65).

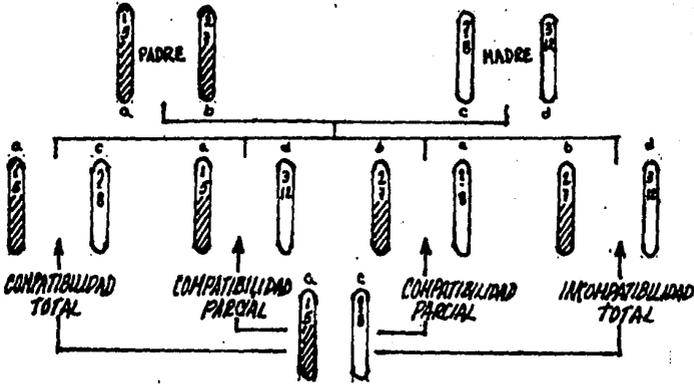


fig 7 Herencia de Haplotipos HLA: a,b,c,d son los haplotipos HLA; 1,2 y 3 son del locus HLA-A y las 5,7 y 8 del --- HLA-B.?= antígeno sin detectar.

PADRES:	Padre		Madre	
	Locus A	Locus B	Locus A	Locus B
	a	A 11 BW35	c	A 10 B23
	b	A 10 BW17	d	A 1 BB
Genotipos:	HLA-A11,BW35/A10,BW17		HLA-A10,B23/A1,BB	
Fenotipos:	HLA-A10,11,BW35,BW17		HLA-A1,10,BB,B23	
Haplotipos:	a	A 11, BW35	b	A 10, BW17
			c	A 10, B23
			d	A 1, BB
HIJOS:				
Haplotipos Paternos:	a	A 11, BW35	c	A 11, BW35
Haplotipos Maternos:	c	A 10, B23	d	A 1, BB
Genotipos:	HLA-A11,BW35/A10,B23		A 11, BW35/A1, BB	
			A 10, BW17/A10, B23	
Haplotipos:	HLA-A10,A11,BW35,B23		A 1, A11, BW35, BB	
			A 10, BW17, B23	
			A 1, A10, BB, BW17	

fig. 8 Herencia de antígenos HLA

2.6 EFECTORES DE LA RESPUESTA INMUNE

Entre 1944 y 1946, Medawar, al realizar aloinjertos de piel observó que después de un corto periodo de tiempo las células -- linfoides del huésped infiltraban el injerto y que algunas de -- éstas se transformaban en blastos; 12 días después, el tejido in jertado se necrosaba y era reemplazado por un tejido cicatrizal. Posteriormente efectuó otro injerto proveniente del mismo dona-- dor al mismo huésped y observó que el fenómeno de rechazo se ace leraba manifestándose en un periodo de 6 a 10 días. En la última fase de este experimento, injertó piel, pero ahora de otro dona-- dor y observó que el tiempo de rechazo era de 12 días. De lo an-- terior se dedujo que el rechazo de injerto se llevó a cabo por - medios inmunológicos cuyas características eran el de ser especí-- fico, inductible, y el de ser transferible (66).

Ahora se sabe que la respuesta de rechazo tiene componentes, tanto humorales como celulares. El rechazo inmediato (hiperagudo) o acelerado se manifiesta por depósito de plaquetas y fibrina en los vasos del injerto, además de la invasión de granulocitos en los tejidos circunvecinos. El rechazo tardío y lento se acompaña de infiltración del injerto por células mononucleares del hués-- ped. En el hombre, los antígenos de histocompatibilidad así como los antígenos de grupos sanguíneos se expresan en la superficie-- del endotelio vascular, lugar donde se efectúa la reacción hiper-- aguda de rechazo mediada por anticuerpos (humoral). En el rechazo tardío mediado por células (celular), el ataque celular es mayor por los linfocitos y específicamente, linfocitos T sensibiliza-- dos con antígenos del injerto. Estos linfocitos son citotóxicos (Lit 1⁺ 2⁺) y su especialización depende de los aloantígenos que se expresen en el injerto (67, 68).

En el caso de la sobrevida de los injertos de islotes aislados, se observa que en algunos casos es más corta que en los transplantes de órganos como corazón o riñones. La razón a esto aún permanece oscura, sin embargo se ha propuesto la existencia de antígenos específicos de tejido de islotes que contribuya a aumentar la inmunogenicidad o bien que en el proceso de separación se desenmascan antígenos de histocompatibilidad, lo que, experimentos de Naji y colaboradores han desmentido (69); también se dice que existen leucocitos viajeros que se supone acompañan al tejido del donador. Ideada por Snell, esta teoría nos habla de que los leucocitos viajeros potencian la capacidad de respuesta del huésped al formar un mayor estímulo inmunogénico (70) y se explica mediante el modelo experimental de doble señal de Lafferty y Cunningham en el que se aduce que el estímulo antigénico no basta para que el linfocito T se active sino que faltan otros componentes. Así, la primera señal para la estimulación del linfocito se efectúa al enlazarse el antígeno con el receptor de la célula T. Una célula estimuladora (denominada S^+) provee una molécula inductiva o coestimuladora (CoS) la cual dará la segunda señal a la célula T para su activación. En el caso concreto de los islotes pancreáticos, presentan células "dendríticas" con antígenos Ia^+ o estimulador positivo (demostrado con antisueros Ia) (71), hecho que se apoya con los resultados obtenidos al efectuar cultivo de órganos, donde se ha visto que disminuye la inmunogenicidad del órgano a transplantar (se observa una rápida degeneración del endotelio vascular y de los elementos sanguíneos); además que como los leucocitos presentan una cierta sensibilidad tóxica al oxígeno, el cultivo los perjudica (72, 73, 74). Por otra parte, los experimentos con cultivos de islotes demuestran que a pesar de que éstos son sensibles al oxígeno en ciertas condiciones, la agrupación en cúmulos les confiere una mayor resistencia (75, 76).

2.7 INMUNOSUPRESORES

A las sustancias capaces de inhibir los procesos de inmunidad especialmente la formación de anticuerpos se les denomina inmunosupresores. Su aplicación más importante es en lo referente a --- trasplantes de órganos para evitar fenómenos de rechazo. La mayoría de ellos son citotóxicos.

El mecanismo de acción consiste en bloquear la síntesis de -- ácidos nucleicos, en especial el DNA, con lo que se produce daño celular. Entre ellos tenemos varios grupos:

- a) Agentes alquilantes como la ciclofosfamida, que no son muy potentes y sí muy tóxicos .
- b) Antimetabolitos del ácido fólico como el metotrexato, son medianamente potentes.
- c) Antimetabolitos de las purinas que comprenden los agentes inmunosupresores más potentes, como la mercapto purina y azatioprina.
- d) Antimetabolitos de las pirimidinas, no tan potentes como los anteriores.

Los antimetabolitos ejercen su acción al competir con un metabolito esencial en la formación de los ácidos nucleicos. Se denominan también ciclopendientes ya que actúan sobre la fase S -- del ciclo mitótico o de síntesis del DNA (77). Entre los antimetabolitos más empleados se encuentran la azatioprina y la mercaptopurina, ya que prolongan la supervivencia de los trasplantes renales siempre y cuando su administración sea inmediata o bien, junto con el trasplante (78, 79). Otras sustancias utilizadas como inmunosupresores han sido los corticosteroides, sueros antilinfocíticos (ALS) y finalmente, la ciclosporina A (80).

La Ciclosporina A (C y A) es un metabolito extraído de 2 - especies de hongos (Cylindrocarpun lucidium y Trichoderma polysporum). Es un polipéptido cíclico formado por 11 aminoácidos uno de los cuales es único. El undecapéptido es insoluble en agua, - pero soluble en aceite y otros alcoholes (81). Su potente actividad antilinfocítica la sitúa como un potente inmunosupresor en - animales, ya que inhibe la inmunidad humoral al reducir la formación de la placa celular además de suprimir la inmunidad celular en aloinjertos de piel (82). Por otra parte, los fármacos immuno supresores tienen la grave desventaja de favorecer, con su uso, - infecciones al receptor, sobre todo por bacterias oportunistas y hongos de tipo de Candida sp.

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En virtud de que la diabetes mellitus es un padecimiento de etiología múltiple, su prevalencia y número de casos se incrementa año con año además, el hecho de que no exista un tratamiento efectivo para su control hace que las tasas de morbilidad y mortalidad aumenten en nuestro país. Por lo anterior, nos hemos motivado implementar y desarrollar, a nivel experimental, el trasplante de islotes pancreáticos en ratas diabéticas alógenicas, - modelo que nos permitirá conocer las dificultades técnicas y metodológicas que implica el trasplante de islotes.

4 OBJETIVOS.

- 4.1 Implementar la metodología para el trasplante en un modelo experimental alogénico, con diabetes mellitus inducida.
- 4.2 Obtener el número de islotes viables necesarios y utilizar como vía de trasplante, el sistema porta para así corregir el metabolismo anormal de los carbohidratos en la diabetes mellitus.
- 4.3 Desarrollar una técnica de cultivo de islotes pancreáticos así como el empleo de una terapia inmunosupresiva eficaz - contra el rechazo para obtener un mejor control metabólico de la diabetes mellitus.

5 HIPOTESIS

"El trasplante alogénico por vía intraportal, de islotes pancreáticos cultivados a una rata con diabetes mellitus inducida, normalizará su glicemia y la terapia inmunosupresiva mínima con ciclosporina A asegurará la viabilidad del trasplante"

6 METODOLOGIA

6.1 OBTENCION DEL TEJIDO PANCREATICO

Para esta etapa se requirieron 50 ratas Long Evans de 4 meses de edad y peso aproximado de 300 gr.

Se tomó una rata Long Evans que se sacrificó en una cámara de éter; se disecó por planos la pared abdominal hasta exponer el conducto biliar común cerca del hilio hepático; se obturó el extremo distal del conducto biliar común, cerca de su desembocadura en el duodeno. En el extremo proximal del conducto, con ayuda del microscopio de disección y equipo para microcirugía, se hizo una pequeña incisión en el mencionado conducto y se introdujo un catéter muy delgado que se fijó al conducto biliar, por el catéter se pasaron 10 ml. de solución de Hanks, tibia hacia el páncreas con el objeto de destruir el tejido pancreático exócrino, posteriormente, se removió el páncreas distendido y se depositó en una caja de Petri con solución Hanks, fría para después, fragmentarlo con tijeras, en trozos de 1 a 2 mm.

6.2 AISLAMIENTO DE ISLOTES.

El páncreas fragmentado se colocó en un tubo con rosca y tapón estériles, con colagenasa tipo IV (Sigma) a una concentración de 1000 U/ml. y un volumen equivalente a la mitad del volumen ocupado por el tejido pancreático; se agitó durante 6 minutos en baño maría a 37°C, posteriormente se agregaron 8 ml. de solución de Hanks, fría para lavar los islotes; luego se retiraron los islotes de incubación y los centrifugamos a 1470g. durante 2 minutos, separamos los islotes y repetimos el paso anterior 2 veces más, variando las concentraciones de colagenasa a 500 U/ml. y 250 U/ml. respectivamente, con agitación de 1 minuto cada vez.

6.3 PURIFICACION DE ISLOTES.

El paquete con los islotes obtenidos por digestión con colagenasa se pasó por un gradiente de Ficoll-Hypaque (Sigma) con una densidad de 1.08 gr/ml. y se centrifugó a 800g. durante 10 minutos al cabo de los cuales se separaron los islotes ya purificados (aproximadamente 400 por rata)

6.4 CULTIVO DE ISLOTES.

Los islotes purificados se cultivaron en medio RPMI-1640, a 24°C, bajo una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂, durante 7 días, con el objeto de disminuir el potencial inmunológico de los islotes (leucocitos viajeros).

La vialidad de los islotes se constató mediante: 1o. Prueba de permeabilidad con azul de tripano. 2o. Microscopía de luz -- (tinción de hematoxilina y eosina) 3o. Reto de islotes con glucosa para observar liberación de insulina in-vitro (Método RIA).

6.5. INDUCCION DEL ESTADO DIABETICO.

Se utilizaron 5 ratas Wistar de peso aproximado de 300-400gr. y edad de 4 a 5 meses.

A la rata se le administró, previa determinación de glucemia, en ayuno de 18 hrs., una dosis de aloxana (43.5 mg/kg.) por vía intravenosa (vena de la cola). La confirmación del estado diabético se comprobó mediante las cifras de glucemia, hechas por espacio de una semana y se seleccionaron solo aquellas cuyos valores de glucemia fueron mayores o iguales a los 400 mg/dl.

6.6 TRANSPLANTE DE ISLOTES PANCREATICOS.

Esta etapa, requerirá de 60 ratas Long Evans y 20 ratas --- Wistar, machos de 4 a 5 meses de edad y peso aproximado de 350 a 400 gr., las ratas Wistar se emplearán para la inducción de la diabetes y las Long Evans, para la obtención de islotes pancreáticos.

A la rata considerada diabética (después de una semana con glucemias mayores o iguales a 400 mg/dl.), se le anestesiará con éter, se incidirá la pared abdominal por planos hasta exponer la vena porta; se diseccionará perfectamente esta vena y se ligará para después perfundir los islotes pancreáticos cultivados (jeringa - estéril con aguja para tuberculina), en un volumen aproximado de 0.5-1 ml. como máximo; una vez perfundidos los islotes, con ayuda del microscopio de disección y equipo para microcirugía, se cerrará la incisión hecha por la aguja en la vena porta, mediante una pequeña sutura, al final del proceso, se suturará la pared abdominal por planos, y se administrará una dosis de 5 mg/kg. de peso de ciclosporina A (vía intravenosa). La rata se colocará en una jaula metabólica. El éxito o rechazo del transplante se evaluará por la concentración de glucosa en sangre (método de glucosa oxidasa), por lo menos, durante 2 días consecutivos, considerándose exitoso cuando la glucemia descienda a valores normales.

7 RESULTADOS

7.1 OBTENCION DEL TEJIDO PANCREATICO.

En esta etapa se emplearon 80 ratas Long Evans machos de 3-4 meses de edad y peso aproximado de 200-300 gr.

Para conocer la morfología normal del páncreas de rata, se sacrificaron 5 animales de los que se obtuvieron los páncreas completos y se efectuaron cortes histológicos para tinción con hematoxilina-eosina en los que se pudo diferenciar el tejido exocrino y el endocrino ya que en éste, los islotes se observaron con gránulos densos de color azul intenso

La perfusión del páncreas, para la obtención de los islotes, se llevó a cabo mediante 2 vías: Una anterógrada y otra retrógrada. En la primera el conducto biliar común se canalizó -- con una aguja para insulina en su extremo proximal y se obstruyó el distal. Para la perfusión retrógrada, se canalizó el conducto biliar común en su extremo distal y se ocluyó en el proximal. Se optó por la vía anterógrada ya que la retrógrada ofreció múltiples obstáculos para su canalización y se diseñó un catéter de aproximadamente 0.5-1mm. de diámetro puesto que con el empleo de la aguja para insulina se dañaba fácilmente el conducto y el tejido pancreático. Una vez que se encontraron las condiciones óptimas de perfusión (con 10ml. de solución de Hanks) se trabajó con microscopio de disección e instrumental para microcirugía. Al terminar la perfusión del páncreas, se disecó de los órganos adyacentes, se depositó en solución de Hanks fría - y se procedió a fragmentarlo con tijeras en trozos de 1-2 mm. -

7.2 AISLAMIENTO DE ISLOTES

Se utilizaron 80 ratas Long Evans de 3-4 meses de edad y peso aproximado de 200-300gr.

El páncreas fragmentado, se sometió a digestión con colagenasa tipo IV (Sigma) para lo cual se ensayaron diferentes concentraciones (2,500 y 3,000 U/ml., tiempo constante de 8 minutos) y tiempos de exposición (10 y 12 minutos, concentración total de colagenasa 1,750 U/ml.). Se seleccionó el procedimiento descrito en el apartado 6.2 referente a metodología ya que con éste se obtuvo el menor daño y el mayor rendimiento (evaluado mediante prueba de permeabilidad de membrana con azul de tripano) (83).

7.3 PURIFICACION DE ISLOTES

Se precisaron 50 ratas Long Evans con las características de edad peso y talla descritas.

La purificación de islotes se intentó mediante el empleo de 2 gradientes de densidad (1.08gr./ml.); uno a base de sacarosa (1.6 M) y el otro con ficoll-hypaque (In-Vitro). En ambos casos, el paquete con los islotes aislados se depositaron en tubos de cristal de fondo cónico con 5ml. de gradiente que se centrifugaron a 800g por 10 minutos (centrifuga refrigerada PRJ cabezal de ángulo libre, 30cm. de diámetro). Al finalizar la centrifugación, se obtuvieron 2 bandas en el gradiente de sacarosa no bien diferenciadas y 3 bandas muy nítidas en el gradiente de ficoll-hypaque. A cada una de las bandas de los 2 gradientes se les practicó la prueba de permeabilidad con azul de tripano así como tinción con hematoxilina-eosina y se observó, en la banda-

superior del gradiente de sacarosa, que el número de islotes -- fué mínimo además de haberse encontrado islotes no viables (incorporación del azul de tripano al citoplasma celular). Por --- otra parte, en el análisis de las bandas del gradiente de Ficoll-Hypaque se encontró un gran número (400) de islotes viables en - la banda central. En las otras bandas se encontraron solución de Hanks (1a.banda) y fragmentos de islotes (3a.banda). En el fondo del tubo se identificaron detritus celulares correspondientes a tejido glandular exocrino (fig.9).

Se seleccionó el gradiente de Ficoll-Hypaque como método de purificación de islotes.

7.4.CULTIVO DE ISLOTES

Para esta etapa se requirieron 100 ratas Long Evans (características ya mencionadas) y se practicaron 20 cultivos con --- aproximadamente 800 islotes por cultivo.

El medio de cultivo que se empleo fué RPMI-1,640 al que se adicionó suero fetal de ternera (In-vitro) para proporcionar a los islotes un mejor sustrato además de facilitar la adherencia de éstos a la pared inferior de la caja de cultivo (84); también se adicionó una mezcla de antibióticos (penicilina 100U-estrep-tomicina 100mcg/ml.) para prevenir el desarrollo de agentes bacterianos. Al igual que otros autores, (76) adicionamos al medio-glucosa(8.33mM/ml.) pues se ha demostrado que con ello el islote mantiene su funcionalidad en lo referente a secreción de in--sulina.

Los primeros 8 cultivos se contaminaron por lo que pensa--mos que la esterilización del medio de cultivo no era la co---

recta. Posteriormente se descartó esta suposición al no observar desarrollo bacteriano ni micótico en un período de 4 a 6 días de incubación de un medio testigo (carente de islotes pancreáticos).

Se administró terapia a base de Kanamicina (6mg/kg/día) - a las ratas durante 48 horas antes de la obtención del tejido pancreático con lo que se evitó la contaminación en los cultivos de islotes. Las condiciones óptimas para el cultivo de islotes fueron las ya señaladas en el apartado 6.4 referente a metodología. Es importante señalar que al séptimo día de incubación los islotes permanecieron viables (prueba de permeabilidad con azul de tripano) y conservaron su capacidad de secretar insulina al retarlos con una carga de glucosa (27mM/ml.) - ya que la concentración final de esta hormona, mostró un incremento en relación a la concentración basal. Sin embargo debido a la sensibilidad del radioinmunoanálisis (RIA) empleado, la apreciación no fué cuantitativa.

7.5 INDUCCION DE LA DIABETES

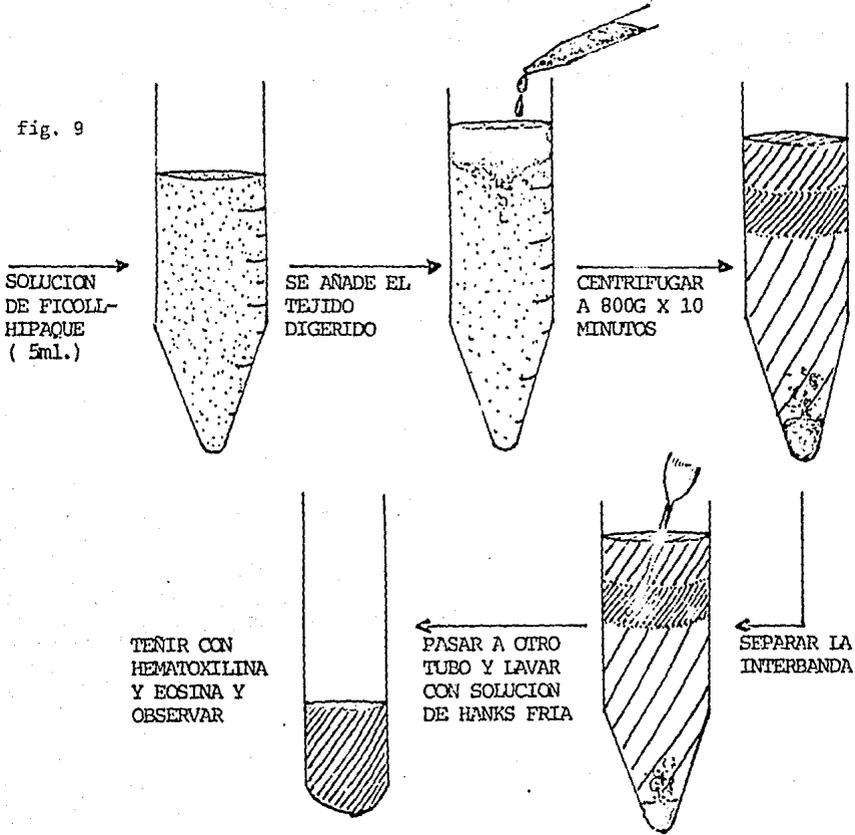
En esta etapa se emplearon 5 ratas Wistar de 150-200grs. - de peso y de 3-4 meses de edad.

Para la inducción del estado diabético se les administró una dosis única intravenosa (vena de la cola) de 43.5mg/kg de peso de aloxana, previa determinación de glucemia (98 a 110 mg/100ml, método GOD). La hiperglucemia se identificó a las 24 hs. de administrada la aloxana con cifras que oscilaron entre los 400 y 500mg/100ml. y persistieron durante 14 días al cabo de los cuales se sacrificaron.

Tiene importancia señalar, que en 3 ratas con diabetes inducida con aloxana se les practicó un simulacro de transplante de islotes con solución salina a manera de placebo (como se describe en el apartado 6.6 referente a metodología) para evaluar el riesgo quirúrgico y las complicaciones trans y post operatorias con resultados del todo satisfactorios ya que se logró abordar y perfundir el placebo por vía intraportal sin complicaciones. Al 5o. día de post-operatorio, las ratas se sacrificaron sin evidencia de infección.

Debido a los sucesos del 19 de septiembre que ocasionaron la pérdida casi total del Centro Médico Nacional y por ende del Laboratorio de Endocrinología del Hospital de Pediatría, lugar en el que se llevaba a efecto este proyecto, la culminación del mismo no fué posible.

fig. 9



8 DISCUSION

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto el alto grado de complejidad que esta metodología implica en cada uno de sus fases, a la vez que realzan la importancia de que los animales de experimentación reúnan las condiciones de trabajo estipulados ya que, variaciones en el peso dificultan la canalización del conducto biliar común (peso menor a 200 gr.) o impiden la digestión enzimática del tejido exocrino (peso mayor de 300 gr.) por ser más fibroso.

La perfusión pancreática por vía retrógrada mostró mayores problemas para la canalización del conducto biliar común puesto que éste, en su extremo distal, es muy delgado y frágil lo que facilita su ruptura con el bisel de la aguja además, al estar incluido en la glándula pancreática, dificulta su sutura por lo resbaloso del tejido. La perfusión del páncreas por vía antero-grada descrita por Lacy (33) presentó menor dificultad ya que en ella el conducto biliar común se canaliza antes de que se interne en el páncreas, donde es de mayor calibre; para facilitar la maniobra se diseñó un catéter de 0.5-1mm. de diámetro y se trabajó bajo microscopio de disección y equipo para microcirugía lo que se tradujo, en una disminución de tiempo efectivo de canalización (5 minutos en promedio) y por ende, en menor deterioro a los islotes.

La digestión con colagenasa es, probablemente, la etapa metodológica de mayor importancia, ya que según se ha señalado -- por diferentes grupos de trabajo (33, 85) de ella depende el -- que se obtenga el mayor rendimiento celular y por lo tanto, la concentración y el tiempo de exposición a esta enzima debe encaminarse a este fin. Por otra parte, debemos señalar que todo el -

proceso se debe efectuar en condiciones óptimas de esterilidad - (campana de flujo laminar, material de cristal, bata y guantes, - así como cubrebocas) y precisión extrema en los tiempos de digestión puesto que cualquier error repercutirá en contaminación, -- disminución del rendimiento celular (menor número de islotes) o bien, deterioro de la estructura y función del islote. En nues-- tras manos, el método para aislar los islotes mediante digestión con colagenasa tipo IV (Sigma) dió buenos resultados (350-400 islotes por rata) sin embargo, se suprimió la última digestión debido a que el rendimiento celular fué mínimo (10) y el daño al - islote mayor observado en la incorporación de Azul de tripano al citoplasma de las células.

En la purificación de islotes, se probó el gradiente de sacarosa por su accesibilidad y bajo costo, pero debido a la escasa diferenciación de sus bandas aunado al hecho de su alta osmolaridad, perjudicial a las células, se descartó su empleo. Conel empleo de este gradiente se obtuvo un rendimiento bajo --- (aproximadamente 150 islotes por páncreas de rata) además de alteraciones importantes en su estructura (incorporación de azulde tripano) hecho también reportado por otros autores (86). Por otra parte, con el ficoll-hypaque como ya se señaló en resultados, el rendimiento celular fué de 350-400 islotes, libres de - daño estructural (no hubo incorporación de azul de tripano en - su citoplasma) hecho que concuerda con lo reportado por otros - grupos de trabajo(87)

Para el cultivo de islotes se han reportado diferentes métodos (88), entre los que destaca, la incubación de islotes a concentraciones altas de oxígeno (73). El método que empleamos --- (apartado 6.4 referente a metodología) fué simple y accesible a nuestras posibilidades, sin embargo, como quedó señalado en re-

sultados, los primeros 8 cultivos desarrollaron crecimiento bacteriano entre las 24 y 48 hrs. de incubación, hecho al que no se encontró explicación aparente ya que las condiciones de trabajo eran las óptimas en esterilidad; en tal virtud, se planteó la posibilidad de contaminación de la rata desde el bioterio y se procedió a dar a las ratas un tratamiento a base de Kanamicina 48 - horas antes de obtener los islotes, con lo que se evitó el desarrollo bacteriano de los cultivos durante el período de incubación. Creemos por lo tanto, que debe tenerse en mente la posibilidad de contaminación en el bioterio, del animal de experimentación.

La capacidad del islote de secretar insulina después de 7 -- días de incubación, se valoró al agregar al medio de cultivo una concentración conocida de glucosa como ya lo reportó Anderson -- (76). Los islotes incrementaron la concentración de glucosa en el medio después de dicha exposición, sin embargo este cambio no fué cuantificado debido a la falta de sensibilidad del radioinmunoanálisis para insulina (Cis), para esto, se requerirá modificar las condiciones del radioinmunoensayo de forma tal que mejoraremos su sensibilidad o bien emplear antígenos y anticuerpos de rata.

La inducción de la diabetes mellitus con aloxana fué acorde con lo ya reportado* y el simulacro de trasplante de islotes -- pancreáticos por vía intraportal a estas ratas con hiperglucemias de 400 a 500 mg/100ml., nos permitió conocer los problemas técnicos quirúrgicos con ello relacionados, además, es importante señalar que el 14o. día post-quirúrgico no se presentaron ninguna de las complicaciones esperadas por su frecuencia (hipertensión, sangrado e infección entre otras.)

(*) (Apartado 7.5 del inciso correspondiente a Resultados)

La metodología expuesta y discutida al igual que los problemas resueltos en su implementación son la base para el transplante de islotes pancreáticos alogénicos en ratas con diabetes mellitus inducida, objetivo principal de esta tesis, pero que por los acontecimientos acaecidos en septiembre del año pasado nos vimos imposibilitados de llevar a cabal realización.

9 CONCLUSIONES

9.1 La perfusión del páncreas por vía anterógrada bajo microscopio de disección y equipo de microcirugía, facilita la disección pancreática, a la vez que destruye el tejido exocrino y de esta manera, coadyuva a la digestión enzimática.

9.2 La digestión enzimática del páncreas exocrino con colagena sa tipo IV realizada en forma rápida y minuciosa, proporciona un alto rendimiento de islotes pancreáticos sin menoscabo de su estructura y función.

9.3 La purificación de islotes pancreáticos con un gradiente de ficoll-hypaque permite recuperar, sin daño alguno, aproximadamente el 95% de los islotes aislados, libres de tejido exocrino u otros contaminantes.

9.4 La incubación del cultivo de islotes pancreáticos durante 7 días en un medio adecuado, preserva la estructura y función del islote hasta el momento del trasplante por vía intraportal a un receptor (rata) con diabetes mellitus inducida con aloxana.

9.5 La inducción con aloxana de diabetes mellitus experimental es un modelo rápido y eficaz para el estudio de dicha enfermedad nosológica

9.6 Es factible el trasplante de islotes por vía intraportal en un modelo alogénico de ratas con diabetes mellitus inducida con aloxana.

Se piensa que establecidas las condiciones ideales de trabajo, el trasplante de islotes pancreáticos alogénicos a una rata con diabetes mellitus inducida es capaz de revertir el estado diabético.

10 BIBLIOGRAFIA

- (1) Viesca, T.C., Fernández del, C.F., *La Endocrinología en México, Información Científica y Tecnológica, México; - 6(96): 15 - 17, 1984.*
- (2) Marble, A., White, P., Bradley, R.F., *Joselin's Diabetes Mellitus, 11^a ed., Ed. Lea and Febiger, Philadelphia: -- 1-2, 1973.*
- (3) México, Secretaría de Salud, *Diabetes Mellitus, Editado-S.S.A (Secretaría de Salud), México, I: 6-8, 1980.*
- (4) National Diabetes Data Group, *Classification and Diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance, Diabetes; 28: 1039-1057, 1979.*
- (5) Bennet, P.H., *The diagnosis of diabetes, Ann.Rev.Med.;-- 34: 295-309, 1983.*
- (6) Velazquez, R., *Diabetes Mellitus, Información Científica y Tecnológica, 6 (96): 22-25, 1984.*
- (7) Op. Cit. Secretaría de Salud: 10-11
- (8) Ibid. :12-15.
- (9) Ibid. :16-18
- (10) Ham, L., *Tratado de Histología, 4^a ed., Ed. Interamericana, México: p.123, 1966*
- (11) Ibid.: 124
- (12) Bloom, R., Polak, J.M., *Gut Hormones, 2^a ed., Ed. Churchill Livingstone, London: 87, 1981.*
- (13) Guyton, C.A., et. al., *Tratado de Fisiología Médica, 5^a ed., Interamericana, México : 871-873, 1976.*
- (14) Setzer, S.H., *Pancreatic islet Transplantation; how close to the goal?, J.Lab.Clin.Med., 98 (2): 166, 1981.*
- (15) Malacara, J.M., García, V.M., *Endocrinología Clínica, 3^a ed., Ed. Prensa Médica Mexicana, México: 156-158, 1982.*
- (16) Op. Cit. Bloom: 97.
- (16) Op. Cit. Ham: 128.

- (16) Op. Cit. Bloom : 97.
- (16) Op. Cit. Ham : 128
- (18) Schaefer, E.A., Address in physiology on internal secretions, *The Lancet*, 1985; 107h: 321-324.
- (19) Hellestrom, C., The life story of the pancreatic B-cell, - *Diabetología*, 1984; 26: 393-394
- (20) Harper, A.H., Rodwell, W.V., *Química Fisiológica*, 6^a ed., Ed. Manual Moderno, México, 1978:516-517.
- (21) Lehninger, A.L., *Bioquímica*, 2^a ed., Ed. Omega, México, - 1979 : 828-830.
- (22) Op. Cit. Bloom : 103-104.
- (23) Op. Cit. Harper : 519-520.
- (24) Op. Cit. Lehninger : 820-821.
- (25) Mercado, R., *Insulina al alcance de todos, Información -- Científica y Tecnológica, México, 1984; - 6(96) : 38.*
- (26) Op. Cit. Lehninger : 832-833.
- (27) Matas, A.J., Sutherland, D.E.R., et.al., *Islet Transplantation, Surg. Gyn.Obst.*, 1977; 145: 758.
- (28) Gunnarson, R., *Function of pancreatic B - cell in spontaneous and experimentally induced diabetes - mellitus in mice, Acta Universitatis Upsaliensis*, 1974; 214 : 9.
- (29) *Ibid.* : 10-11.
- (30) *Ibid.* : 14-15.
- (31) *Ibid.* : 18
- (32) Conolly, J.E., *Pancreatic whole organ transplantation, -- Surg.Clin.of North.Am.*, 1978; 58(2): 384.
- (33) Lacy, P.E., Kostianovsky, M., *Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat - pancreas, Diabetes*, 1967;16 : 35-39.

- (34) Younoszai, R., Sorensen, R.L., et.al., Homotransplantation of isolated pancreatic islets, Diabetes, 1970; 19 (suppl 1) : 406
- (35) Strauts, R.L., Studies of hereditary - obese mice (ob/ob) after implantation of pancreatic islets in millipore filter capsules, -- Diabetologia, 1970; 6: 306.
- (36) Ballinger, W.F., Lacy, P.E., Transplantation of intact pancreatic islets in rat, Surgery, 1972; 72 : 175-186.
- (37) Kempt, C.B., Knight, M.J., Effect of transplantation site on results of pancreatic islets isografts in diabetic rats, Diabetologia, 1973; 9: 489.
- (38) Sutherland, D.E.R., Pancreas and islet transplantation, -- Diabetologia, 1981; 20: 162-163.
- (39) De Jose, L.R., Howard, J.M., Studies in pancreaticoduodenal homotransplantation, Surg.Gynecol. and Obst., 1962; 114: 553-558.
- (40) Op. Cit., Sutherland, : 162.
- (41) Toledo-Pereyra, L.H., Castellanos, J., et. al., Comparative evaluation of pancreas transplantation techniques, Ann. Surg.1975; 182: 567-571.
- (42) Rausis, C., Choudhury, A., et al., Influence of pancreatic duct anastomosis and function of auto transplanted canine pancreatic segments, J. Surg. Res., 1970; 10: 551-557
- (43) Baumgartner, D., Sutherland, D.E.R., et al., Studies on -- segmental autotransplantation in dogs, Transplant. Proc., 1980; 12(suppl. 2): 163-171.

- (44) Dubernard, J.M., Traeger, J., et al., A new method of preparation of segmental pancreatic --- grafts for transplantation: trials - in dogs and in man., *Surgery*, 1978; 84: 633-639.
- (45) Op. Cit. Sutherland : 164.
- (46) Satake, K., Nowygrod, R., et al., Free duct pancreatic -- transplantation in rats, *Surg. Forum.*, 1979; 30: 308-309.
- (47) Op. Cit. Lacy, : 36.
- (48) Kempt, C.B., Lacy, P.E., et al., Transplantation of isolated pancreatic islets into the portal vein of diabetic rats, *Nature*, - 1973; 244(17): 447.
- (49) Dowing, R., Scharp, D.W., An Improved technique for the - isolation and identification of --- mammalian islets of Langerhans, *Transplantation*, 1980; 29: 79-83.
- (50) Matas, A.J., Sutherland, D.E.R., et al., A mouse model of islet transplantation using neonatal donors, *Transplantation*, 1977; 24: - 383-393.
- (51) Payne, W.D., Sutherland, D.E.R., et al., DL-ethionine -- treatment of adult pancreatic donors: Amerioration of diabetes in multiple recipients with tissue from a single donor., *Ann. Surg.*, 1979; 189: 248-258.
- (52) Lili, F., Alloantigen systems of humanleucocytes and platelets, *Akademia Kiado, Budapest, Hungary*, 1979: 50.

- (53) Festenstein, H., Demant, P., *Inmunogenética fundamental, -
biología y aplicaciones clínicas del -
HLA y H-2*, Ed. Manual Moderno, 1981:23.
- (54) Op. Cit. Lili : 29.
- (55) Ibid. : 31.
- (56) Ibid. : 30.
- (57) Fudenberg, H., Stites, D., et al *Inmunología Clínica 2^a ed.,
Ed. Manual Moderno, México, 1980: 181.*
- (58) Op. Cit. Lili : 50.
- (59) Mollison, P.L., *Blood transfusion in clinical medicine, 6^a
ed., Ed. Blackwell Cientific Publication,
Oxford, 1979: 592.*
- (60) Ibid. : 593.
- (61) Op. Cit. Festenstein : 28.
- (62) Op. Cit. Lili : 36
- (63) Cunningham, B.A., *Estructura y funcionamiento de los antígenos de histocompatibilidad, Inmunología, Cientific American, Ed. Labor, Barcelona España, 1983 : 200-201.*
- (64) Op. Cit., Festenstein : 25.
- (65) Op. Cit., Lili; :54.
- (66) Op. Cit., Festenstein : 1-2.
- (67) Op. Cit., Fudenberg : 193-194
- (68) Lafferty, K.J. Prowse, S.J., *Immunobiology of tissue transplantation: a return to the passenger - leucocyte concept, Ann. Rev. Immunol., 1983; 1: 147.*
- (69) Nají, A., Reckard, C.R., et al., *Vulnerability of pancreatic islets to immune cells and serum., Surg. Forum., 1975; 26: 459-461.*
- (70) Op. Cit., Lafferty : 143-145.

10 BIBLIOGRAFIA

- (1) Viesca, T. C., Fernández del, C.F., La Endocrinología en México, Información Científica y Tecnológica, -- México, 1984 ; 6(96) : 15 - 17.
- (2) Marble, A., White, P., Bradley, R.F., Joselin's Diabetes Mellitus, 11^a. ed., Ed. Lea and Febiger, Philadelphia, 1973: 1-2.
- (3) México, Secretaria de Salud, Diabetes Mellitus, Editado --- S.S.A. (Secretaria de Salud), México, 1980; I: 6-8-.
- (4) National Diabetes Data Group, Clasificación and Diagnosis - of diabetes mellitus and other categories of - glucose intolerance, Diabetes, 1979;28:1039-1057.
- (5) Bennet, P.H., The diagnosis of diabetes, Ann.Rev.Med.; 1983; 34:295-309.
- (6) Velazquez, R., Diabetes Mellitus, Información Científica y - Tecnológica, México, 1984; 6(96): 22-25
- (7) Op. Cit. Secretaria de Salud : 10-11
- (8) Ibid. :12-15
- (9) Ibid. :16-18.
- (10) Ham, L., Tratado de Histología, 4^aed., Ed. Interamericana, México, 1966, :p. 123
- (11) Ibid. : 124
- (12) Bloom, R., Polak, J.M., Gut Hormones, 2^a ed., Ed. Churchill - Livingstone, London, 1981: 87.
- (13) Guyton, C.A., et. al., Tratado de Fisiología Médica, 5^a ed., Interamericana, México, 1976, : 871-873.
- (14) Setzer, S.H., Pancreatic islet Transplantation; how close to the goal?, J.Lab.Clin.Med., 1981; 98(2): 166.
- (15) Malacara, J.M., García, V.M., Endocrinología Clínica, 3^a ed., Ed. Prensa Médica Mexicana, México, 1982:156-158.

- (18) Schaeferm E.A., Address in physiology on internal secretion, *The Lancet*, 107h: 321-324, 1985.
- (19) Hellestrom, C., The life story of the pancreatic B-cell, *Diabetología*, 26: 393-394, 1984.
- (20) Harper, A.H., Rodwell, W.V., *Química Fisiológica*, 6^a ed., Ed. Manual Moderno, México : 516-517, 1978.
- (21) Lehninger, A.L., *Bioquímica*, 2^a ed., Ed. Omega, México: 828-820, 1979.
- (22) Op. Cit. Bloom: 103-104.
- (23) Op. Cit. Harper: 519-520.
- (24) Op. Cit. Lehninger: 820-821.
- (25) Mercado, R., Insulina al alcance de todos, *Información Científica y Tecnológica*, México, 6(96): 38, 1984.
- (26) Op. Cit. Lehninger: 832-833.
- (27) Matas, A.J., Sutherland, D.E.R., et. al., Islet Transplantation, *Surg. Gyn.Obst.*, 145: 758, 1977.
- (28) Gunnarson, R., Fuction of pancreatic B - cell in spontaneous and experimentally induced diabetes mellitus in mice, *Acta Universitatis Upsaliensis*; 214: 9, 1974.
- (29) Ibid : 10-11.
- (30) Ibid : 14-15.
- (31) Ibid : 18.
- (32) Conolly, J.E., Pancreatic whole organ transplantation, --- *Surg.Clin.Of.North. Am.*, 58(2): 384, 1978.
- (33) Lacy, P.E., Kostianovsky, M., Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas, *Diabetes*, 16: 35-39, 1967.
- (34) Younoszai, R., Sorensen, R.L., et. al., Homotransplantation of isolated pancreatic islets, *Diabetes*; 19(suppl 1): 405, 1970.
- (35) Strauts, R.L., Studies of hereditary - obese mice (ob/ob) after implantation of pancreatic islets in millipore filter capsules, *Diabetología*; 6: 306, 1970.

- 36) Balliger, W.F., Lacy, P.E., Transplantation of intact - pancreatic islets in rat, Surgery, 72: 175-186, 1972.
- 37) Kempt, C.B., Knight, M.J., Effect of Transplantation site on results of pancreatic islets isografts in diabetic rats, Diabetologia, 9: 489, 1973.
- 38) Sutherland, D.E.R., Pancreas and islet transplantation, Diabetologia; 20: 162-163, 1981.
- 39) De Jose, L.R., Howard, J.M., Studies in pancreaticoduodenal homotransplantation, Surg. Gynecol. and Obst., -- 114: 553-558, 1962.
- 40) Op. Cit. Sutherland, : 162.
- 41) Toledo-Pereyra, L.H., Castellanos, J., et. al., Comparative evaluation of pancreas transplantation techniques, Ann. Surg.; 182: 567-571, 1975.
- 42) Rausis, C., Choudhury, A., Et al., Influence of pancreatic duct anastomosis and function of autotransplanted - canine pancreatic segments, J.Surg. Res., 10: 551-557, - 1970.
- 43) Baumgartner, D., Sutherland, D.E.R., et al., Studies on segmental autotransplantation in dogs, Transplant. Proc., 12(suppl.2):163-171, 1980.
- 44) Dubernard, J.M., Traeger, J., et al., A new method of - preparation of segmental pancreatic grafts for transplantation: trials in dogs and in man., Surgery; 84: 633-639, 1978.
- 45) Op. Cit. Sutherland: 164
- 46) Satake, K., Nowygrod, R., et al., Free ducto pancreatic transplantation in rats, Surg. Forum., 30: 308-309, 1979.
- 47) Op. Cit. Lacy, : 36
- 48) Kempt, C.B., Lacy, P.E., et al., Transplantation of isolated pancreatic islets into the portal vein of diabetic - rats, Nature, 244(17): 447, 1973.

- (49) Dowing, R., Scharp, D.W., An Improved technique for the isolation and identification of mammalian islets of Langerhans, *Transplantation*, 29: 79-83, 1980
- (50) Matas, A.J., Sutherland, D.E.R., et al., A mouse model of islet transplantation using neonatal donors, *Transplantation*, 24: 383-393, 1977.
- (51) Payne, W.D., Sutherland, D.E.R., et al., DI-ethionine treatment of adult pancreatic donors: Amelioration of diabetes in multiple recipients with tissue from a single donor., *Ann. Surg.*, 189: 248-258, 1979.
- (52) Lili, F., Alloantigen systems of human leucocytes and platelets, *Akademia Kiado, Budapest, Hungary*: 50, 1979
- (53) Festenstein, H., Demant, P., *Inmunogenética fundamental, biología y aplicaciones clínicas del HLA y H-2*, Ed. Manual Moderno: 23, 1981.
- (54) Op. Cit. Lili: 29
- (55) Ibid; 31
- (56) Ibid: 30
- (57) Fudenberg, H.; Stites, D., et al *Inmunología Clínica 2^a ed.*, Ed. Manual Moderno, México: 181, 1980.
- (58) Op. Cit. Lili: 50
- (59) Mollison, P.L., *Blood transfusion in clinical medicine*, 6^a ed., Ed. Blackwell Cientific Publication, Oxford: 592, 1979.
- (60) Ibid: 593.
- (61) Op. Cit. Festenstein: 28
- (62) Op. Cit. Lili: 36
- (63) Cunningham, B.A., *Estructura y funcionamiento de los antígenos de histocompatibilidad*, *Inmunología, Cientific - American*, Ed. Labor, Barcelona España: 200-201, 1983.
- (64) Op. Cit., Festenstein: 25
- (65) Op. Cit., Lili: 54.

- (66) Op. Cit., Festenstein: 1-2.
- (67) Op. Cit., Fudenberg: 193-194.
- (68) Lafferty, K.J. Prowse, S.J., Immunobiology of tissue trans-
plantation: a return to the passenger leucocyte concept,
Ann. Rev. Immunol., 1: 147, 1983.
- (69) Naji, A., Reckard, C.R.; et al., Vulnerability of pancrea-
tic islets to immune cells and serum., Surg. Forum., 26:
459-461, 1975.
- (70) Op. Cit., Lafferty: 143- 145.
- (71) Ibid.: 150,152, 153, 155.
- (72) Anderson, A., Tissue Culture of isolated pancreatic islets,
Acta Endocrinol., 83 (suppl.205): 289, 1979.
- (73) Lacy, P.E. Finke, E.H., et al., Prolongation of islet xeno-
graft survival by in vitro culture of rat. Megaislets in -
95% O₂, Transplantation, 33(6): 588-592, 1982.
- (74) Op. Cit., Lafferty: 154.
- (75) Op. Cit., Lafferty: 155
- (76) Anderson, A., Effects of lucese on the structure and meta-
bolism of isolated pancreatic islets maintained in tissue
culture., Acta Universitatis Upsaliensis, Uppsala Sweden;
169: 1-18, 1973.
- (77) Litter, M., Compendio de Farmacología, 2^a ed., Ed. El Ate-
neo, España: 638-658, 1978.
- (78) Ibid.: 668.
- (79) Bell, R.N., Fernandez -Cruz, L., et al., Prevention of ---
glomerular basement membrane thickening in alloxan-diabetes,
Surgery, 88: 31-40, 1980.
- (80) Bell, P.R., Wood, R.F., et al., Comparison of various me--
thods of chemical immunosupression in islet cell transplan-
tation., Transplant. Proc., 12(2): 291-293, 1980.

- (71) Ibid. : 150, 152, 153, 155.
- (72) Anderson, A., Tissue Culture of isolated pancreatic islets, Acta Endocrinol., 1976,; 83(suppl.205): 289.
- (73) Lacy, P.E. Finke, E.H., et al., Prolongation of islet xenograft survival by in vitro culture of rat. Megaislets in 95% O₂, Transplantation, 1982; 33(6): 588-592.
- (74) Op. Cit., Lafferty : 154.
- (75) Op. Cit., Lafferty : 155.
- (76) Anderson, A., Effects of lucese on the structure and metabolism of isolated pancreatic islets -- maintained in tissue culture., Acta - Universitatis Upsaliensis, Uppsala -- Sweden. 1973; 169: 1-18.
- (77) Litter, M., Compendio de Farmacología, 2^a ed., Ed. El Ateneo, España, 1978,:638-658.
- (78) Ibid. :. 668.
- (79) Bell, R.N., Fernandez-Cruz, L., et al., Prevention of glomerular basement membrane Thickening in alloxan-diabetes, Surgery, 1980; - 88: 31-40.
- (80) Bell, P.R., Wood, R.F., et al., Comparison of various methods of chemical immunosuppression in islet cell transplantation., Transplant. Proc., 1980; 12(2): 291-293.
- (81) Dos Reis, G.A., Shevach, E.M., Effect of Cyclosporin A on T cell function in vitro: the mechanism of the T cell proliferation depends - on the nature of the T cell stimulus- as well as the differentiation state the responding T cell., J. Immunol., 1982; 129(6): 2360-2364.

- (81) Dos Reis, G.A., Shevach, E.M., Effect of Cyclosporin A - on T cell function in vitro: the mechanism of the T cell proliferation depends on the nature of the T cell stimulus as well as the differentiation state the responding T cell., *J. Immunol.*, 129(6): 2360-2364, 1982.
- (82) *Ibid.*: 2365-2367.
- (83) Cumming, H., *Virología, cultivo de tejidos*, Ed. Manual -- Moderno, México, 38, 1975.
- (84) *Ibid.*: 28,34.
- (85) Shibata, A.M Ludvigsen, C.W., et al., Standarization of - a digestion filtration method for isolation pancreatic is lets., *Diabetes*, 25(8): 667-672, 1976.
- (86) Lindall, A., Steffes, M., et al., Immunoassayable insulin content of subcelular fractions of rat islets., *Endocrinology*, 85: 218-223, 1969.
- (87) Sharp, D.W., Kemp, C.B., et al., et al., The use of ficoll in the preparation of viable islets of Langerhans from the rat pancreas., *Transplantation*, 16: 686-689, 1973.
- (88) Gordon, D.A., Toledo-Pereyra, P., Presevation for trans-plantation: A review of techniques of islet cell culture and storage., *J. Surg. Res.*, 32(2): 182-193, 1982.

- (82) Ibid. : 2365-2367.
- (83) Cumming, H., *Virología, cultivo de tejidos*, Ed. Manual Moderno, México, 1975; 38,
- (84) Ibid. : 28, 34.
- (85) Shibata, A.m Ludvigsen, C.W., et al., Standardization of a digestion filtration method for isolation pancreatic islets., *Diabetes*, 1976; 25(8): 667-672.
- (86) Lindall, A., Steffes, M., et al., Immunoassayable insulin - content of subcellular fractions of rat - islets., *Endocrinology*, 1969; 85: 218-223.
- (87) Sharp, D.W., Kemp, C.B., et al., The use of ficoll in the - preparation of viable islets of Langer-- hans from the rat pancreas., *Transplantation*, 1973; 16: 686-689.
- (88) Gordon, D.A., Toledo-Pereyra, P., Preservation for transplan tation: A review of techniques of islet- cell culture and storage., *J. Surg. Res.*, 1982; 32(2): 182-193.