

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

HIPERGLUCEMIA Y SU CORRECCIÓN EN EL TRASPLANTE
ALOGÉNICO DE ISLOTES DE PÁNCREAS

JUAN CARLOS FERRER GARCÍA

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2005

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 19 de
Enero de 2005 davant un tribunal format per:

- D. Antonino Jara Albarrán
- D. Antonio Hernández Mijares
- D. Pedro Costa Talens
- D. Eduard Montanya Frias

Va ser dirigida per:

D. Juan Francisco Merino Torres

D. Francisco Piñón Sellés

©Copyright: Servei de Publicacions
Ramón Gómez - Ferrer Sapiña

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-6207-1

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

Departamento de Medicina

Facultad de Medicina

Universidad de Valencia

**“HIPERGLUCEMIA Y SU CORRECCIÓN EN EL
TRASPLANTE ALOGÉNICO DE ISLOTES DE
PÁNCREAS”**

TESIS DOCTORAL:

JUAN CARLOS FERRER GARCÍA

DIRIGIDA POR:

Dr. JUAN FRANCISCO MERINO TORRES

Dr. FRANCISCO PIÑÓN SELLÉS

2004

UNIVERSITAT DE VALENCIA
DIVISIÓ DE CIÈNCIES DE LA SALUT
FACULTAT DE MEDICINA
DEPARTAMENT DE MEDICINA

HIPERGLUCEMIA Y SU CORRECCIÓN EN EL TRASPLANTE
ALOGÉNICO DE ISLOTES DE PÁNCREAS

Memoria presentada por D. Juan Carlos Ferrer
García para optar al título de Doctor en
Medicina y Cirugía

Valencia, 12 de Junio de 2004

AGRADECIMIENTOS

No van a ser suficientes estas líneas para transmitir mi agradecimiento a todas las personas que me han ayudado desde que inicié este trabajo hasta que coloqué el punto final. Les pido perdón por tan modesto recordatorio. Seguro que, además, me olvido de alguien que no lo merece. Vayan por delante mis disculpas.

Gracias a todas las personas que forman el **Servicio de Medicina Interna del Hospital General Universitario**, mi lugar actual de trabajo, donde he madurado y he sentido profundamente mi profesión. A **Agustín Herrera**, por su confianza y sus consejos. A **Pilar Fuentes**, por su apoyo incansable y su trabajo.

Gracias a todo el **Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital “La Fe”**, lugar donde pasé mis inolvidables años de residente, aprendí a amar la Medicina y encontré grandes amigos. Al personal médico, adjuntos y residentes, por lo que han aportado a mi formación. Gracias a **Ana, Maite, Elena e Isabel**, por su cariño. Al **personal del Centro de Investigación** que nos facilitó la tarea. A **Gema Pérez**, por su paciencia y su ayuda inestimable en los trabajos quirúrgicos y de laboratorio. Ha sido muy sencillo trabajar con ella. Y sin ella habría sido imposible. A **Francisco Piñón**, por valorar mi trabajo y dirigir mi trayectoria sin olvidar el lado humano. Y por último a la persona a la que debo esta tesis, **Juan Francisco Merino**. No sólo logró contagiarme su ilusión en este proyecto sino que trabajó a mi lado y me enseñó todo lo que reflejan estas páginas. Además, me ha aportado sentido clínico y rigor científico en el trabajo cotidiano. Sus consejos me han otorgado una visión crítica y paciente que comienza en mí mismo.

Gracias a todos. Sobre todo por su amistad.

A Ana, la línea de mi vida

A mi familia

Este trabajo ha sido subvencionado con la beca de
investigación 00/1001 del Fondo de
Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social

INDICE GENERAL

Índice por secciones	i
Índice de figuras	vii
Índice de tablas	ix
Abreviaturas	xi

ÍNDICE POR SECCIONES

I: <i>Justificación</i>	2
II: <i>Introducción</i>	7
1. Anatomía de los islotes de páncreas	8
1.1 Recuerdo histórico	8
1.2 Desarrollo embriológico.	8
1.2.1 Factores de diferenciación celular	12
1.2.2. Filogenia de los islotes pancreáticos	13
1.3 Componentes de los islotes pancreáticos	14
1.3.1 Células endocrinas	14
1.3.2 Microvascularización del islote	17
1.3.3 Inervación de los islotes	18
1.3.4 Interacción funcional de las células del islote	19

2.	Fisiología de los islotes pancreáticos	21
2.1	Biosíntesis de insulina	21
2.2	Regulación de la producción insulínica	27
2.2.1	Nutrientes	27
2.2.2	Hormonas	28
2.2.3	Factores nerviosos	29
2.2.4	Ejercicio y obesidad	30
2.3	Secreción de insulina	30
3.	Masa celular beta	36
3.1	Regulación de la masa beta	38
3.2	Ciclo vital de la célula beta	40
3.3	Estimuladores de la replicación	41
3.3.1	Nutrientes	41
3.3.2	Hormonas	42
3.3.3	Factores de crecimiento	43
3.3.4	Otros factores	43
3.4	Factores inhibidores	44
4.	Antecedentes del trasplante de islotes de páncreas	45
4.1	Recuerdo histórico	45
4.2	Situación actual del trasplante de islotes	48

4.3	Tendencias futuras en el trasplante de islotes	54
4.3.1	Inmunomodulación	55
4.3.2	Inmunoaislamiento	58
4.3.3	Xenotrasplante	60
4.3.4	Expansión y diferenciación de células ductales pancreáticas	61
4.3.5	Células madre adultas o “Stem cells”	62
4.3.6	GLP-1 y células madre adultas productoras de insulina	63
4.3.7	Células madre de páncreas fetal y precursores de célula beta	63
4.3.8	Terapia génica	64
5.	Efecto de la hiperglucemia sobre la célula beta trasplantada	68
5.1	Crecimiento de los islotes trasplantados	69
5.2	Revascularización de los islotes trasplantados	69
5.3	Reinervación de los islotes trasplantados	72
5.4	Funcionalidad de los islotes trasplantados	72
III.	<i>Hipótesis y objetivos</i>	75
IV.	<i>Material y métodos</i>	77

1.	Animales de experimentación, inducción de la diabetes experimental y determinación de la glucosa	78
2.	Grupos experimentales	80
3.	Tratamiento con insulina	84
4.	Aislamiento de islotes	85
5.	Trasplante de islotes	87
6.	Inmunosupresión	93
7.	Extracción del injerto y del páncreas	94
8.	Test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa	95
9.	Contenido de insulina	96
10.	Estudio histológico	97
11.	Análisis estadístico	99
V.	Resultados	101
1.	Efecto del tratamiento con insulina en la evolución del trasplante	102
1.1	Estudios preliminares	102
1.1.1	Valores de normalidad de la glucosa en sangre	102
1.1.2	Inducción de diabetes experimental	102
1.1.3	Efectividad del tratamiento con insulina	103
1.2	Evolución metabólica	105
1.3.	Test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa	121

1.4	Hemoglobina glicosilada	124
2.	Contenido de insulina	127
3.	Estudio histológico	129
VI.	<i>Discusión</i>	135
1.	Modelo experimental	137
1.1	Inducción de diabetes	137
1.2	Lugar de implantación del injerto	138
1.3	Número de islotes trasplantados	140
1.4	Trasplante alogénico	140
1.5	Inmunosupresión	141
2.	Problemática relacionada con el número de donantes	144
3.	Efectos del tratamiento con insulina sobre la evolución metabólica	148
4.	Efecto del tratamiento con insulina sobre el proceso de revascularización del injerto	151
5.	Efecto del tratamiento con insulina sobre la célula beta trasplantada	153
6.	Otros factores que modifican la evolución del trasplante de islotes	157
6.1	Problemas derivados de la técnica de trasplante	157
6.2	Efecto inflamatorio sobre el injerto	158
6.2.1	Reacción inflamatoria inmediata	158

6.2.2	Rechazo del injerto	160
6.2.3	Importancia de la inmunogenicidad sobre la respuesta metabólica	161
6.3	Hipoxia	163
VII.	<i>Conclusiones</i>	167
VIII.	<i>Comunicaciones a Congresos y artículos publicados</i>	171
IX.	<i>Referencias bibliográficas</i>	175

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1:	Esquema de la diferenciación de las células del islote	9
Figura 2:	Gen de la preproinsulina, ArNm y preproinsulina	22
Figura 3:	Estructura esquemática de la preproinsulina humana	23
Figura 4:	División de proinsulina a insulina	25
Figura 5:	Esquema del proceso secretor de la célula beta	26
Figura 6:	Esquema de la secreción bifásica de insulina	31
Figura 7:	Esquema de la fisiología de la secreción de insulina	34
Figura 8:	Ciclo de la célula beta en islotes de rata	40
Figura 9:	Independencia de la insulina durante el primer año después del trasplante de islotes en humanos	50
Figura 10:	Esquema del trasplante de islotes pancreáticos a través de la vena porta	52
Figura 11:	Diseño experimental	82
Figura 12:	Técnica del trasplante	89
Figura 13:	Finalización del trasplante	91
Figura 14:	Evolución de la glucemia en animales diabéticos no trasplantados y tratados con insulina durante un período de 30 días	104
Figura 15:	Animales normoglucémicos al final del período de seguimiento	110
Figura 16:	Evolución de la glucemia en los grupos experimentales	113
Figura 17:	Evolución de peso en los grupos experimentales	115

Figura 18:	Evolución de la glucemia en los grupos trasplantados y tratados con insulina	117
Figura 19:	Evolución de la glucemia en los grupos no tratados con insulina y en los animales tratados con insulina y normoglucémicos al final del estudio	119
Figura 20:	Test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa en los grupos de animales normoglucémicos	122
Figura 21:	Área bajo la curva del test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa	123
Figura 22:	Evolución de la HbA1c en los grupos trasplantados	126
Figura 23:	Estudio histológico de los injertos I	131
Figura 24:	Estudio histológico de los injertos II	133

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1:	Características de los tipos celulares de los islotes pancreáticos	16
Tabla 2:	Lista de factores que inhiben o estimulan el crecimiento y/o la función de la célula beta	37
Tabla 3:	tiempo transcurrido en días desde la inyección de STZ al trasplante o al tratamiento con insulina, y desde el tratamiento con insulina al trasplante	106
Tabla 4:	Características metabólicas de los grupos experimentales	107
Tabla 5:	Hemoglobinas glicosiladas de los grupos experimentales	124
Tabla 6:	Contenido de insulina pancreático en los grupos experimentales	128

ABREVIATURAS

ACTH:	corticotropina
aFGF:	factor ácido de crecimiento fibroblástico
AGL:	ácidos grasos libres
Alo-DM 1:	alotrasplante en diabetes mellitus tipo 1
APUD:	amine precursor uptake-decarboxilation (captadores y decarboxiladores de precursores de aminas).
ATP:	adenosíntrifosfato
Ca ⁺⁺ :	calcio
CCK:	colecistokinina
CGRP :	péptido relacionado con el gen de la calcitonina
DMPP:	diabetes secundaria a pancreatectomía
DNA:	ácido ácido
GAD:	anticuerpos anti- ácido decarboxilasa.
GH:	hormona de crecimiento
GIP:	péptido insulínotropo glucosa-dependiente
GLP-1:	glucagón-like péptido 1
GLUT (1-2):	transportador de glucosa tipo (1-2)
GRP:	péptido estimulante de gastrina
HbA1c:	hemoglobina glicosilada
HB-EGF:	proteína ligadora de heparina <i>EGF-like</i>
HGF:	factor de crecimiento hepático

HLA:	human leucocyte antigens (referido a antígenos de histocompatibilidad)
HOMA:	Homeostasis model assesment (modelo de evaluación de homeostasis)
IAPP:	polipéptido amiloide del islote
ICA:	anticuerpos anti-células del islote
IFN:	interferón
IGF :	factor de crecimiento insulina-like
IGFBP:	proteína ligadoras de IGF
IL:	interleukina
INGAP:	péptido asociado a la neogénesis del islote
Isl 1:	islet-1 (referido al gen del mismo nombre)
K ⁺ :	potasio
Kg:	kilogramo
LP:	lactógeno placentario
mm Hg:	milímetros de mercurio
mU:	miliunidades
NGF:	factor de crecimiento nervioso
NIP:	islotes nestin positivos
NPY :	neuropéptido Y
NT-3:	neurotrofina 3
PC:	proconvertasa
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa
PDGF:	factor de crecimiento derivado de las plaquetas

Pdx1:	factor promotor de insulina tipo 1 (IPF1)
PHAS-1:	proteína fosforilada termoestable y ácidoestable regulada por la insulina
PSP:	proteína calcular pancreática
PTH:	hormona paratiroidea
PTP:	proteína filiforme pancreática
PYY:	péptido YY
RNA:	ácido ácido
r.p.m.:	revoluciones por minuto
SOCS :	Supresores de señal de citokinas
STZ :	estreptozotocina
SU:	sulfonil-ureas
Tag:	oncoproteína SV40 T-antigen
TGF:	factor de crecimiento transformante
TNF:	factor de necrosis tumoral
TRH:	hormona liberadora de TSH
USA:	Estados Unidos de América
VEGF:	factor de crecimiento vascular endotelial.
VIP:	polipéptido vasoactivo intestinal
XIAP:	X-linked inhibitor of apoptosis protein (proteína inhibidora de la apoptosis ligada a X)

Justificación

I. *Justificación*

La Diabetes Mellitus es un grupo de trastornos metabólicos caracterizados por un aumento de los niveles de glucosa plasmáticos. Esta hiperglucemia es el resultado de un defecto en la secreción de la insulina, en su acción, o en ambos. Es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en la sociedad actual y se ha convertido en un alarmante problema de salud pública. En 1997 se calculó que unos 124 millones de personas padecían diabetes. Actualmente, la diabetes afecta aproximadamente a 140 millones de individuos y se prevee que afecte a más de 220 millones en el año 2010 (Amos AF y cols., 1997; King H y cols., 1998) y a más de 300 en el año 2025 (Zimmet P, 2003). En España, la prevalencia de la diabetes mellitus se estima en un 6,2 % para los grupos de edad de 30-65 años, y del 10 % para 30-89 años. La diabetes mellitus tipo 1 representa un 10 % del total, con una incidencia estimada de 11-12 casos/ 100.000 habitantes y año. La incidencia de la diabetes tipo 2 se estima en 8/1000 habitantes año (Goday A, 2002).

El coste de la diabetes incluye gastos directos e indirectos. El promedio de coste de la asistencia a un paciente diabético es aproximadamente cuatro veces más elevado que la asistencia de un sujeto no diabético. El paciente diabético sufre de media 3 veces más episodios de hospitalización que el no diabético (American Diabetes Association, 1998). Los costes directos de la diabetes mellitus a nivel internacional suponen alrededor de un 5 % del coste sanitario global, la mayor parte de ellos generados por las complicaciones crónicas que derivan de la enfermedad (Williams R y cols., 2002). El estudio

europeo CODE ha demostrado que el coste total de la diabetes tipo 2 en los ocho países incluidos (Bélgica, Francia, Alemania, Italia, Holanda, España, Suecia, Reino Unido), resultó ser de unos 29 000 millones de euros al año, lo que corresponde a un coste de 2 834 euros por paciente y año (Massi-Benedetti M, 2002). A ello hay que añadir los costes indirectos: bajas laborales, incapacidades, muertes prematuras, etc... Los costes indirectos relacionados con la pérdida de años productivos por su efecto sobre la capacidad de trabajo se calcularon en 46 000 millones de dólares. (National Diabetes Data Group, 1995.)

El tratamiento de la diabetes mellitus tiene como objetivo conseguir un óptimo control metabólico que evite o retrase las complicaciones crónicas propias de la enfermedad, con una buena calidad de vida y sin complicaciones agudas. El tratamiento intensificado con insulina consigue retrasar e incluso evitar la aparición de dichas complicaciones (Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1993). El tratamiento intensificado supone, no obstante, un mayor riesgo de hipoglucemias y requiere una importante implicación del paciente. Esto hace que no pueda recomendarse a todo paciente diabético. Por ello se hace necesaria la búsqueda de alternativas terapéuticas. Entre ellas, se están desarrollando el trasplante de páncreas, el trasplante de islotes de páncreas, el de células madre embrionarias y la terapia génica.

El trasplante de páncreas permite la independencia de la insulina en la mayoría de los casos, consiguiendo valores normales de glucemia y evitando hipoglucemias. Sin embargo, la técnica quirúrgica es compleja y se asocia a morbilidad y mortalidad perioperatorias significativas. Estaría especialmente

indicado en un grupo seleccionado de pacientes con insuficiencia renal crónica terminal en combinación con el trasplante renal (Tydén G y cols., 1999).

El trasplante de células madre y la terapia génica parecen esperanzadoras opciones de futuro, pero actualmente han demostrado resultados exclusivamente en modelos experimentales. A ello hay que añadir consideraciones de carácter ético todavía no aclaradas.

El trasplante de islotes de páncreas es una alternativa atractiva puesto que es una técnica poco invasiva y con baja morbi-mortalidad. No obstante, hasta el año 1999 los resultados obtenidos en términos de insulín-independencia eran pobres. Según los datos del Registro Internacional de Trasplante de Islotes de ese año, sólo un 10 % de los pacientes trasplantados estaba libre de insulina al año del trasplante si bien en un 37 % se demostró producción insulínica mediante determinación de péptido C (Brendel M y cols., 1999). En el año 2000, Shapiro y cols. dan a conocer su trabajo utilizando un nuevo protocolo de inmunosupresión (Shapiro AMJ y cols., 2000). Los resultados terapéuticos obtenidos han modificado positivamente las estadísticas del trasplante de islotes (Brendel MD y cols., 2001) y han dado nuevas perspectivas de desarrollo. Para confirmar y ampliar estos resultados, se ha iniciado un ensayo multicéntrico en 7 centros de Norteamérica y 3 europeos con experiencia en la técnica de trasplante de islotes.

En un momento en el que el trasplante de islotes está de plena actualidad, todavía se desconocen numerosos aspectos básicos sobre la funcionalidad de los islotes, su regulación, la evolución de la masa trasplantada, etc. En esta tesis se pretende ahondar en estos puntos con el objetivo de conocer mejor aquellos factores, inmunológicos o no, que conducen al deterioro de la célula beta y al

fracaso del trasplante. La comprensión de estos aspectos permitirá establecer nuevas pautas terapéuticas que contribuyan a una mayor supervivencia del injerto trasplantado.

Introducción

II. *Introducción*

1. ANATOMÍA DE LOS ISLOTES DE PÁNCREAS

1.1. **Recuerdo histórico**

Los islotes pancreáticos fueron descritos por primera vez por Paul Langerhans (1847-1888) en 1869. Los definió como “acúmulos o racimos de células enmarañados en una red vascularizada, como una glándula salivar abdominal. Estas células, como islas, están distribuidas de forma regular, tienen un tamaño mediano y en su interior se visualiza un contenido brillante y un núcleo redondeado”. En 1889 Von Mering y Minkowsky demostraron que la pancreatectomía en perros iba seguida de diabetes mortal, estableciendo las bases de la relación entre la glándula y el metabolismo de los hidratos de carbono. Laguesse en 1906 los bautiza con el nombre de islotes de Langerhans y les atribuye un papel funcional, realizando sus estudios sobre páncreas de animales vertebrados y de reos condenados a muerte. La especial naturaleza de las células fue confirmada posteriormente, tras examinar el páncreas de un neonato que “sorprendentemente poseía grandes y numerosos islotes”.

1.2. **Desarrollo embriológico.**

El primer botón pancreático dorsal surge como una invaginación del

primitivo endodermo intestinal, en su porción cefálica (Slack JMW, 1995). Su irrigación procede de las arterias gastroduodenal y esplénica a partir del tronco celíaco. Poco tiempo después aparece el botón ventral, que gira alrededor del duodeno y recibe la sangre de la arteria pancreatoduodenal inferior a partir de la mesentérica superior (Orci L y cols., 1982; Edlund H, 1998). Estas dos estructuras se fusionan, crecen y forman una estructura ramificada. En ella se diferencian tres estirpes epiteliales diferentes: las células ductales, las células exocrinas productoras de proenzimas y los islotes de Langerhans. En la figura 1 se resume el proceso de diferenciación de las células del islote.

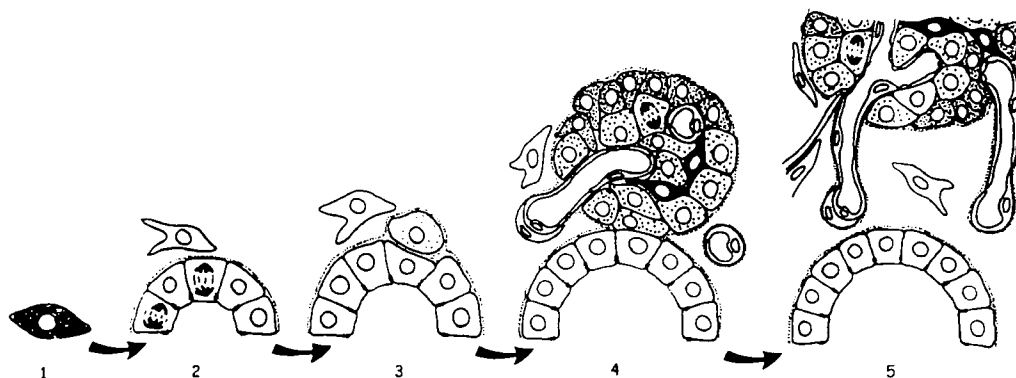


Figura 1. Esquema de la diferenciación de las células del islote. 1: Célula primitiva precursora, caracterizada por la fijación de un precursor amina y la descarboxilación (APUD). Contiene enolasa neuroespecífica. 2: Inversión de la polaridad de la división mitótica en células epiteliales del ducto para originar células endocrinas. El mesénquima podría intervenir en el proceso. 3: Una célula hija permanece conectada al epitelio por complejos de unión. Otra está libre y

penetra en el tejido mesenquimal. 4: El islote permanece todavía conectado con el ducto. La sangre comienza a invadir el islote. Varios tipos celulares surgen del mismo o de diferentes precursores, que podrían encontrarse bien en el ducto o bien en el islote. 5: En el último estadio, los islotes se separan del ducto. El proceso de crecimiento se produce a partir de células diferenciadas. Algunos precursores menos diferenciados podrían tener también su papel. Un grupo de células dentro del epitelio ductal pueden estar presentes. Los islotes se inervan. (Modificado de WJ. Rutter, 1980).

Los islotes están formados por cuatro tipos celulares principales que comparten una función común de secreción endocrina. Son las células α , β , δ y PP que producen glucagón, insulina, somatostatina y polipéptido pancreático, respectivamente y con esta secuencia de aparición. Las células madre endocrinas y exocrinas tienen su origen común en las células ductales, que bajo un estímulo adecuado se diferencian en una u otra especie (Bonner-Weir S y cols., 1993).

En el embrión humano las células endocrinas aparecen en la semana 7. En la semana 9 se demuestra la existencia de las hormonas peptídicas, presentes en primitivos islotes o en células aisladas adyacentes al ducto (Like A y cols., 1972). En la semana 16 los tipos celulares productores de cada hormona son claramente reconocibles. Los islotes fetales, de pequeño tamaño, se distribuyen sobre el parénquima exocrino. En el centro del islote, rodeadas del resto de células, quedan las células beta. Esta estructura tridimensional, con un núcleo de

células beta, permanece en la edad adulta, adquiriendo una importancia capital para la liberación fisiológica de insulina.

La proporción celular es variable según la fase del desarrollo. Así, en las primeras semanas las células más abundantes son α , ocupando un 50% de la glándula endocrina, mientras que las células β constituyen menos del 25%. En el páncreas maduro las células β forman el 70-80% del islote, ocupando el 20-30% restante las otras tres poblaciones celulares.

Durante su desarrollo, las células pancreáticas expresarán no sólo las hormonas ya conocidas sino también otro grupo de neurohormonas cuya función no ha sido todavía bien establecida. Parece que intervienen en la propia homeostasis del islote. Así, el péptido YY (PYY), el polipéptido amiloide del islote (IAPP) y el neuropéptido Y (NPY) inhiben la secreción de la insulina, contribuyen a la escasa respuesta a la glucosa de la célula beta en esta etapa del desarrollo y protegen al feto de posibles hipoglucemias (Mulder H y cols., 1998). En la rata, el PYY se detecta el día 12 de vida fetal y se sintetiza en las células endocrinas productoras de insulina y glucagón. Durante el desarrollo irá desapareciendo de las células beta para permanecer exclusivamente en las productoras de glucagón. Inicialmente el NPY está presente en los nervios interlobulares, alrededor de los vasos y del ducto. El RNA mensajero (mRNA) del NPY aparece en la célula beta el día 16 de vida fetal y el 17 se detecta ya su proteína. Con el nacimiento desaparece el mRNA de la célula beta y 5 días más tarde el NPY (Myrsen-Axcrona U y cols., 1997).

1.2.1. Factores de diferenciación celular

La diferenciación de las células pancreáticas se realiza en momentos puntuales del desarrollo del páncreas, a partir de la expresión o inhibición de factores de transcripción. La expresión o no de estos factores origina las diferencias fenotípicas entre las células y su interrelación modula la actividad celular (Edlund H, 2001). Las células pancreáticas diferenciadas son capaces de expresar unos factores de transcripción e inhibir otros, presentes en un subtipo celular diferente (Edlund H, 1998; Yamaoka T y cols., 1999; Habener JF y cols., 1998).

Uno de los factores de transcripción más importantes en el desarrollo pancreático es el Pdx1, también llamado IPF-1 (insulin promoter factor 1). En un estadio inicial permite el crecimiento, división y diferenciación de las células epiteliales pancreáticas. Posteriormente regula la expresión o inhibición de otros factores de transcripción en los subtipos celulares. El Pdx1, a través de interacciones con otros factores de transcripción, tiene un papel capital en la expresión del gen de la insulina como respuesta a los niveles de glucosa. Pdx1 participa también en la expresión de Nkx6.1 en las células beta inmaduras y activa otros genes como IAPP, glucocinasa 1 y GLUT2 (transportador de glucosa-2) que se expresan de forma específica en la célula beta (Wang H y cols., 2001). Sin embargo existen otros factores de transcripción, puesto que ratones modificados genéticamente Pdx1(-/-) que presentan agenesia pancreática, mantienen algunas células productoras de insulina y glucagón. (Swift GH y cols.,

1998; Sander M y cols., 1997; Edlund H, 1998). Entre ellos se encuentran el Pax-4 y el Pax-6, que contribuyen al desarrollo del páncreas (Matsushita T y cols., 1998). Si estos factores de transcripción están ausentes, la célula endocrina no se desarrolla. Pax-4 contribuye a la diferenciación entre células beta y delta, a partir de su expresión en las células progenitoras pancreáticas. En fases posteriores será expresado exclusivamente por la célula beta. Pax-6 interviene en la diferenciación de células alfa. Otros factores de transcripción son bHL, Isl 1, Nkx2.2y NeuD/ β 2. La mayoría de ellos intervienen también en la diferenciación neuronal. Esto implica que la diferenciación celular del páncreas y del sistema nervioso se regulan mediante mecanismos similares (Edlund H, 2001.).

1.2.2. Filogenia de los islotes pancreáticos.

Los animales invertebrados poseen poblaciones dispersas de células neuroendocrinas que regulan el metabolismo de los hidratos de carbono. En los vertebrados, por el contrario, estas células forman órganos diferenciados. En los vertebrados menos evolucionados las células productoras de insulina y somatostatina se separan de la mucosa intestinal para formar un órgano. Son los islotes primitivos que no se acompañan de tejido exocrino. Las células productoras de glucagón y polipéptido pancreático siguen formando parte, de forma dispersa, de la mucosa intestinal. Conforme avanza el desarrollo filogénico, estas células se van incorporando al islote. En los mamíferos, todas

las células endocrinas forman parte del islote, encontrándose diferencias de distribución dentro del mismo. Así por ejemplo, las células PP son más abundantes en la zona más cercana al intestino. En los animales más desarrollados esta especial distribución se acompaña de una relación funcional entre los islotes y la mucosa gastrointestinal (Falkmer S y cols., 1984). La existencia de otros productos de secreción como el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) queda restringido al páncreas de algunos mamíferos (Ding WG y cols., 1998).

1.3. Componentes de los islotes pancreáticos

1.3.1. Células endocrinas

El páncreas endocrino está formado por un número aproximado de $1-2 \cdot 10^6$ islotes de Langerhans y un grupo escaso de células ductales. En el recién nacido las células del islote constituyen un 20 % del tejido pancreático. Con el desarrollo, la masa pancreática exocrina crece en mayor grado que la endocrina, de tal modo que en el adulto los islotes constituyen un 1-2 % de todo el páncreas.

La suma de todos los islotes del adulto humano pesa 1-1,5 gramos. Cada islote está formado por una estructura compleja que incluye las células endocrinas rodeadas de ganglios neuronales, fibras nerviosas y capilares fenestrados, lo que le permite ejercer la función endocrina. Las células diferenciadas endocrinas se unen mediante gap-junctions que, a través de canales

transmembrana, permiten el paso de sustancias de bajo peso molecular (Meda P y cols., 1983). En el adulto humano cada islote mide 50-250 μm y está formado en su mayor parte por 4 tipos celulares principales que se pueden diferenciar utilizando técnicas de histoquímica, ultraestructurales y de inmunofluorescencia. Menos de un 1% correspondería a tipos celulares menores. Estos 4 tipos celulares principales son:

- Células beta (β): son las células productoras de insulina. Representan el 60-80 % de todas las células endocrinas y su distribución es uniforme en todos los islotes, rodeando un capilar venoso. Miden 10-15 μm de diámetro, poseen una estructura poligonal y en su interior existen abundantes gránulos de secreción que se liberan en el capilar venoso. Estos gránulos, cristaloides y pleomórficos, pueden ser de dos tipos, los maduros presentan un halo periférico y un núcleo electrodenso; los inmaduros no poseen este halo y su núcleo no es tan electrodenso (Orci L y cols., 1985).

- Células alfa (α): representan del 8-15% del total. Su distribución en el páncreas no es homogénea. Son de menor tamaño que las células beta. Producen sobre todo glucagón pero también otros péptidos como glucagón-like péptido 1 (GLP-1) (Bell GI y cols., 1983). Los gránulos de secreción poseen un halo periférico claro y un núcleo muy electrodenso.

- Células delta (δ): son de menor tamaño que los dos tipos anteriores. Producen somatostatina. Representan el 4-10 % de las células del islote. Se

distribuyen de forma homogénea alcanzando un porcentaje similar en todos los islotes. Sus gránulos poseen una baja densidad.

- Células PP: representan un porcentaje variable que oscila entre 4-15 %. Productoras de polipéptido pancreático. Poseen una distribución muy heterogénea, localizándose en su mayor parte en la cabeza del páncreas. Sus gránulos de secreción son los de menor tamaño, densos y alargados. Las características de los tipos celulares que forman el islote pancreático se presentan en la tabla 1.

<i>Tipo</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Contenido hormonal</i>	<i>Gránulos de secreción</i>
Alfa (α)	8-15	Glucagón, glicentina, GLP-1, TRH, endorfina, CCK	Núcleo electrodenso, halo periférico claro
Beta (β)	60-80	Insulina, amilina. (TRH en islotes perinatales)	Cristaloides, pleomórficos.
Delta (δ)	4-10	Somatostatina. Metencefalina, CGRP	Homogéneos, baja densidad, estructura de membrana
PP	4-15	Polipéptido pancreático. Metencefalina	Alargados, densos.
D1 (δ_1)	<1	VIP	Tamaño pequeño
Enterocromafines	<1	Serotonina	Mayor tamaño
G1	<1	Gastrina, otros.	

Tabla 1. Características de los tipos celulares de los islotes pancreáticos. (Modificada de P. Felig, 1995 y Robbins, 1989). GLP-1: glucagón-like péptido

1, TRH: hormona liberadora de TSH, CCK: colecistokinina, CGRP: péptido relacionado con el gen de la calcitonina, VIP: polipéptido vasoactivo intestinal.

1.3.2. Microvascularización del islote

Los islotes están irrigados por una microcirculación específica a partir de una o más arteriolas aferentes que entran en el islote atravesando la capa de células no beta y se ramifican en el interior, en una intrincada rama de arteriolas alrededor de las células beta. Las células beta son las primeras en recibir la sangre, seguidas de las alfa y delta. De este modo la célula beta se convierte en el primer sensor de la glucosa (Orci L y cols., 1982). La sangre atraviesa los capilares y confluye en una red venosa que desembocará en la vena porta o bien, atravesando la zona exocrina, en la vena esplénica o mesentérica superior. La vascularización del área endocrina del páncreas es de 5 a 10 veces superior, por unidad de volumen, a la porción exocrina. Los islotes, que representan un 1-2 % del volumen pancreático total, reciben un 10-20 % del flujo pancreático. La microcirculación de los islotes es heterogénea y se relaciona con el tamaño de los mismos. El volumen vascular y el número de capilares es menor en los islotes de tamaño más pequeño (Bonner-Weir S y cols., 1982).

En el páncreas de los roedores, al igual que en los humanos, el flujo sanguíneo sigue preferentemente una dirección insular-acinar vía porta, que conduce la secreción hormonal del islote. Otras rutas vasculares como la venosa insular, la ductal o la lobular no se relacionan con la anterior (Murakami T y cols., 1997).

Si aumentan los niveles de glucosa, el flujo del islote aumenta un 90 % aunque el flujo pancreático total sólo aumenta un 10 % (Jansson L y cols., 1983). En ratas, con la edad disminuye la irrigación pancreática total mientras que el flujo del islote aumenta. En animales jóvenes por el contrario el flujo pancreático total aumenta de forma proporcional al del islote (Jansson L y cols., (a) 1989).

1.3.3. Inervación de los islotes

El páncreas está inervado tanto por el sistema simpático como por el parasimpático e incluye neuronas colinérgicas, peptidérgicas y adrenérgicas. Las fibras simpáticas del nervio esplénico sinaptan en el exterior del páncreas con el ganglio celíaco para inervar el páncreas dorsal, y con el ganglio mesentérico superior para la inervación del páncreas ventral. Las fibras nerviosas poseen su terminación en el espacio pericapilar, cercanas a la superficie celular, pero sin alcanzar las células endocrinas. Las fibras colinérgicas se localizan de forma preferente en áreas donde las células α son más abundantes.

En el islote de Langerhans existen receptores para neurotransmisores como acetilcolina, así como para catecolaminas y otros neuropéptidos. El sistema nervioso vegetativo juega su papel en la secreción hormonal (Milner RDG y cols., 1981; Ahrén B y cols., 1986). Por ejemplo, la inervación ortosimpática del islote contiene galanina y neuropéptido Y que inhibe la secreción de insulina (Dunning BE y cols., 1990; Skoglung G y cols., 1991). Los nervios parasimpáticos presentan polipéptido intestinal vasoactivo (VIP) y

péptido estimulante de gastrina (GRP) que son neurotransmisores activadores de la secreción de insulina (Ahren B y cols., 1991). Existen otros neurotransmisores pancreáticos como dopamina, serotonina (Koevary SB y cols., 1983), encefalina, colecistokinina (CCK) (Rehfeld JH y cols., 1980) y sustancia P. La función de la sustancia P no está totalmente establecida pero parece tener un papel en el equilibrio entre ingesta y gasto energético (Hakanson R y cols., 1983).

1.3.4. Interacción funcional de las células del islote

Cada hormona del islote posee la capacidad de modificar su propia secreción y las restantes. De este modo la somatostatina inhibe la secreción de insulina, glucagón y PP. La insulina suprime la secreción de glucagón, mientras que éste estimula a insulina y somatostatina. Una acción autocrina permite a cada una estimular o inhibir su propia secreción. Esto demuestra que existe un mecanismo de interacción funcional dentro del islote. Se han propuesto tres diferentes:

- La principal vía de intercomunicación de las células del islote es la microcirculación intraislote. Este es el mecanismo más importante en la regulación de la insulina sobre la secreción de glucagón.

- Por medio de una vía paracrina las hormonas liberadas en el islote tienen capacidad para influir en las células endocrinas vecinas.

- Existen uniones celulares tipo hendidura entre células homólogas y heterólogas del islote que permiten la interacción celular modulando su función. Otro tipo de conexión son los canales intercelulares o *gap-junctions*, presentes también tanto en células homólogas como heterólogas. Su función no está aclarada todavía.

2. FISIOLOGÍA DE LOS ISLOTES PANCREÁTICOS

2.1. Biosíntesis de insulina

La insulina es una hormona polipeptídica segregada por las células beta cuya principal función es modular la homeostasis de la glucosa. El nombre de insulina procede de “ínsula”, haciendo referencia a los islotes. Su descubrimiento en 1921 por los canadienses Fred Banting, Charles Best y John Collip, a partir de extractos pancreáticos, sentó las bases para el tratamiento de la diabetes. El gen de la insulina humana está localizado en la región p15 del brazo corto del cromosoma 11 y está constituido por una región reguladora, 3 exones (regiones codificables) y 2 intrones (regiones no codificables) (Owerbach D y cols., 1981). El esquema del gen y sus regiones se representa en la figura 2.

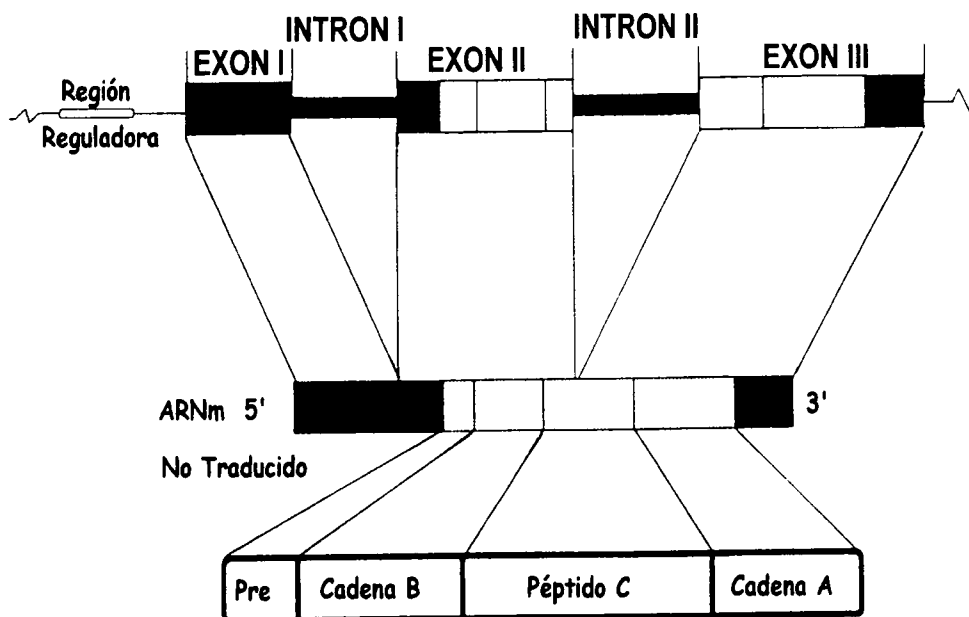


Figura 2. Gen de la pre-insulina, ARNm y preproinsulina. (Modificado de S.E. Shoelson y cols, 1993).

La pre-proinsulina es un prepéptido con un extremo hidrofóbico N-terminal de 24 aminoácidos. Se sintetiza a partir de la traducción de ARN mensajero en las células beta (Chan SJ y cols., 1976). En esta prehormona se puede encontrar la insulina y el péptido C, unido a la cadena A de la insulina por una lisina y una arginina y a la B por dos argininas (Figura 3).

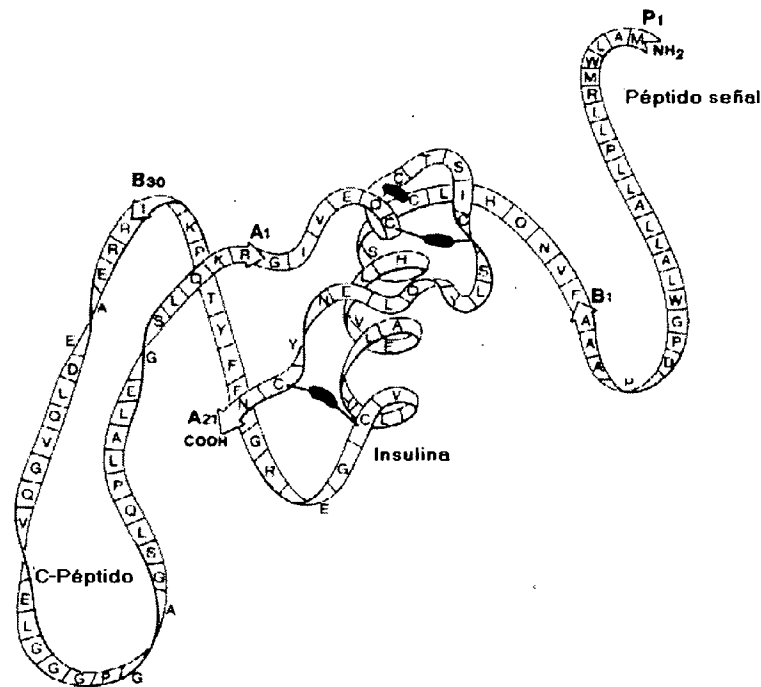


Figura 3. Estructura esquemática de la preproinsulina humana. El corte de los primeros 24 aminoácidos (péptido señal) origina la proinsulina. (Modificado de MO. Dayhoff, 1973).

Como resultado de una serie de complejas interacciones se produce la traslocación de la pre-proinsulina al interior del retículo endoplásmico rugoso en forma de microvesículas (Sanders SL y cols., 1992). Después la molécula se modifica, plegándose la cadena y formando puentes disulfuro que originan la proinsulina. Este proceso está catalizado por la enzima protein-thiol reductasa del retículo endoplásmico rugoso (Munro S y cols., 1987). La proinsulina tiene 86 residuos aminoácidos, tanto en los roedores como en el humano (Steiner DF, 1984). Comparte con la insulina las mismas propiedades de solubilidad, punto isoelectrico, autoasociación e interacción con anticuerpos anti-insulina

(Rubenstein AH y cols., 1969). Desde el retículo endoplásmico rugoso, la proinsulina se transfiere a la región *cis* del aparato de Golgi y de ésta a la región *trans* en forma de vesículas de secreción (Pagano A y cols., 1999). Durante su transporte la molécula de proinsulina se divide por la acción de las proconvertasas 2 y 3 (PC2 y PC-3, también llamada PC-1) y de la carboxipeptidasa E, originando la insulina y un péptido de 26-31 residuos denominado péptido C (Figura 4).

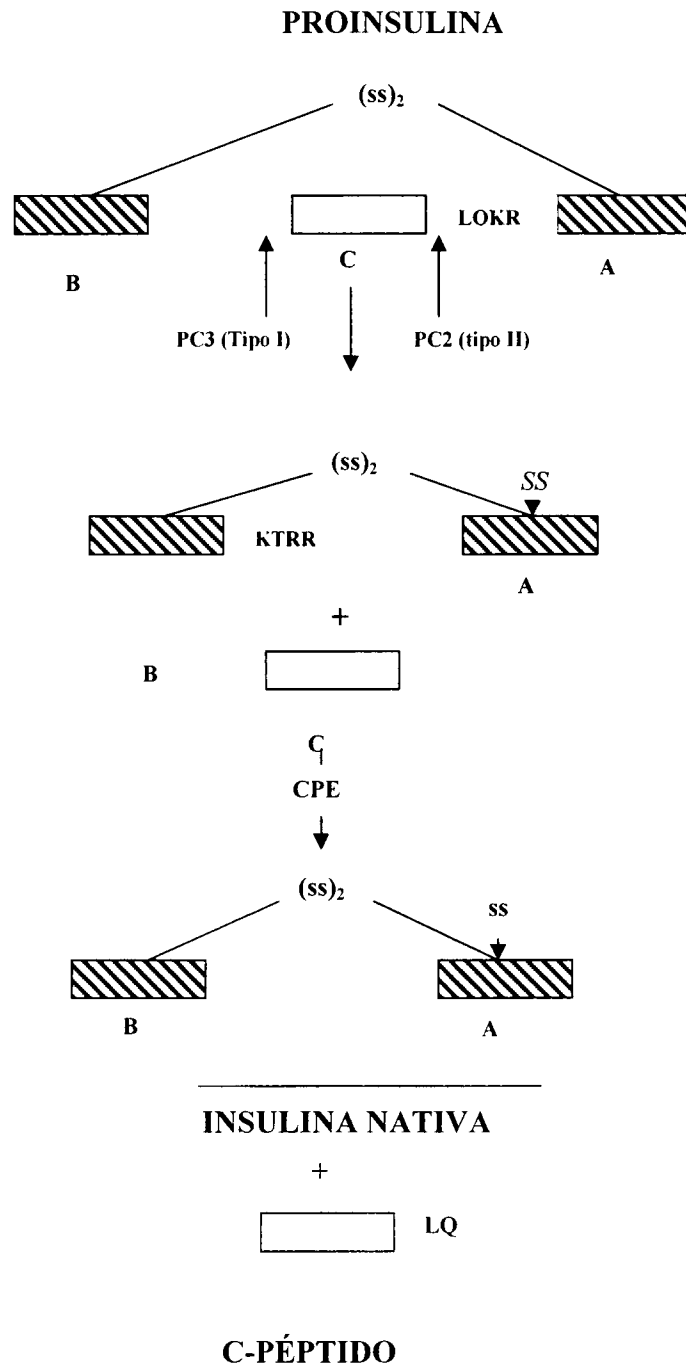


Figura 4. La división de proinsulina a insulina por la acción combinada de las pro-hormona convertasas PC2 y PC1/PC y carboxipeptidasa H. (Modificado de DF. Steiner, 1998).

La insulina y el péptido C permanecen dentro de los gránulos de secreción, en cantidades equimolares, junto a pequeñas cantidades de proinsulina residual y otros productos menores de secreción de la célula beta (Rhodes CJ, 2000; Nishi M y cols., 1990). La insulina sintetizada forma inicialmente dímeros y después se asocia con zinc para formar hexámeros que precipitan ocupando la porción central del gránulo. El péptido C, más soluble, queda en la periferia (Blundell T y cols., 1972). La excreción de la insulina se resume en la figura 5.

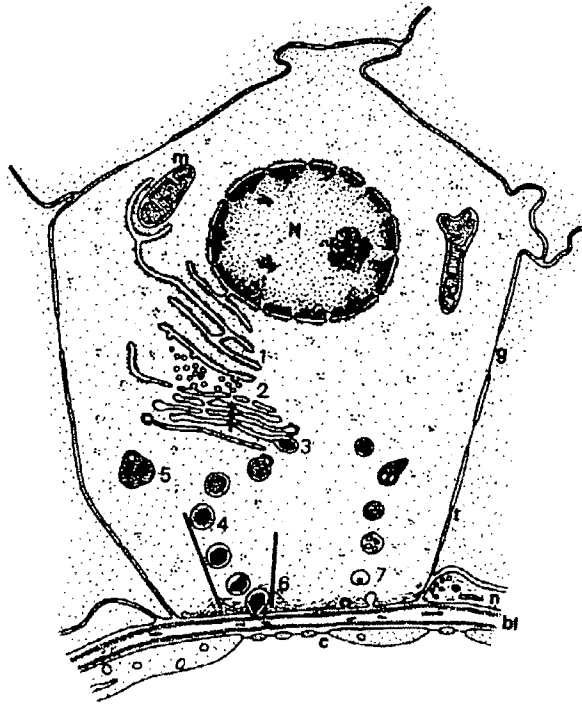


Figura 5. Esquema del proceso secretor de la célula beta. 1. Biosíntesis de pre(pro)insulina en el retículo endoplásmico rugoso. 2. Transferencia de la proinsulina al aparato de Golgi, vía microvesículas o cisternas del retículo endoplásmico. 3. Conversión de proinsulina en insulina y almacenamiento en gránulos. 4. Final del proceso de conversión y cristalización de la forma hexamérica insulina-zinc. 5. Degradación ocasional de los productos de

secreción por crinofagia. 6. Liberación por exocitosis de los gránulos de insulina mediante microtúbulos y microfilamentos del citoesqueleto. 7. Renovación de la membrana por mecanismo endocitótico. N: núcleo; m: mitocondria; g: unión gap; t: unión hermética; bl: lámina basal; c: endotelio fenestrado; n: nervio. (Modificado de B. Reusens y cols., 2001).

2.2. Regulación de la producción insulínica

2.2.1 Nutrientes

La principal sustancia que regula la producción de insulina es la glucosa (Chen M y cols., 1976). La respuesta secretora de insulina es mayor tras la administración oral de glucosa que intravenosa (Tillil H y cols., 1988). El efecto de la glucosa sobre la célula beta es dosis-dependiente. Otros hidratos de carbono también pueden estimular la síntesis de insulina: D-manosa, dihidroxiacetona, D-glucosamina, N-acetilglucosamina, fructosa, galactosa. El xilitol y el sorbitol también modifican la secreción de la célula beta. El anómero- α de la glucosa es un estímulo mayor que el β para la secreción de insulina. Lo mismo ocurre con el anómero α de la manosa (Grotsky GM y cols., 1975; Niki A y cols., 1979).

Los aminoácidos han demostrado capacidad para estimular la síntesis de insulina en ausencia de glucosa. Los aminoácidos esenciales lisina, arginina y leucina son los secretagogos insulínicos más potentes (Fajans SS y cols., 1972). Sus efectos sobre la secreción de insulina son potenciados por la glucosa (Leahy

JL y cols., 1988). Algunos metabolitos de aminoácidos, el fenilpiruvato, α -cetoisocaproato, α -ceto- β -metilvalerato y α -cetocaproato son estimuladores insulínicos, más efectivos en ausencia de glucosa (Matschinsky FM, 1973).

El efecto de los lípidos y sus metabolitos sobre la liberación de insulina es menos conocido. Existe una acción estimulante de los cuerpos cetónicos y los ácidos grasos (Muller VA y cols., 1971). Estudios recientes, con roedores diabéticos sometidos a trasplante de islotes de páncreas, han demostrado que una dieta rica en ácidos grasos no esterificados inhibe la secreción de insulina en respuesta a la arginina (Hiramatsu S y cols., 2001). Del mismo modo, la exposición prolongada del islote a concentraciones elevadas de ácidos grasos tiene efectos deletéreos sobre la síntesis de insulina, dependientes de los niveles de glucosa. (Briaud I y cols., 2002).

2.2.2 Hormonas

El glucagón estimula la secreción de la célula beta (Samols E y cols., 1965) mientras que la somatostatina la inhibe (Alberti KG y cols., 1973). Otras hormonas que han demostrado un efecto estimulante sobre la insulina son la hormona de crecimiento (Felig P y cols., 1971), la prolactina (Landgraf R y cols., 1977), los glucocorticoides (Kalhan SC y cols., 1975), las hormonas sexuales (Ensinck JW y cols., 1972) y el lactógeno placentario (Beck P y cols., 1967). Estas hormonas pueden estimular de forma directa la célula beta o bien inducir un estado de resistencia insulínica. En el hipertiroidismo se ha

demostrado una situación de hiperinsulinemia que a veces se acompaña de un trastorno en la tolerancia hidratarada (Osei K y cols., 1984). Concentraciones bajas de hormona paratiroidea (PTH) tienen un efecto estimulante sobre la secreción de insulina mientras que las altas concentraciones son inhibitoras (Fadda GC y cols., 1990). El calcio parece ser el segundo mensajero más importante en la respuesta de la célula beta a la PTH.

Algunas hormonas gastrointestinales han demostrado su efecto como mediadores de la respuesta insulínica a la glucosa: péptido insulínico dependiente (GIP), colecistocinina (CCK), y péptido glucagón-like-1 (GLP-1). Es lo que se conoce con el nombre de *efecto incretina* (Fehmann HC y cols., 1995; Perfetti R y cols., 1999). GLP-1 regula la síntesis de insulina y proinsulina y actúa también como modulador en la replicación de la célula beta. Aunque el polipéptido vasoactivo intestinal (VIP), la secretina y la gastrina también parecen modificar la síntesis de insulina, su mecanismo de acción no ha sido aclarado todavía.

2.2.3 Factores nerviosos

Los neurotransmisores del sistema nervioso simpático modifican la respuesta secretora de la célula beta. La epinefrina ejerce un efecto inhibitor mediada por los receptores α . La acción de la norepinefrina es menos potente.

Los efectos del sistema nervioso simpático son inciertos. Agentes simpático-miméticos de acción β -adrenérgica condicionan un estímulo insulínico

(Roy MW y cols., 1984). Se ha especulado sobre una fase cefálica de secreción de insulina relacionada con el olor o la visión de la comida. Sería un reflejo de control vagal cuya función más importante es evitar el aumento más precoz de glucosa post-prandial (Bruce DG y cols., 1987). El estímulo colinérgico aumenta la respuesta de la célula beta y podría explicar este efecto.

2.2.4 Ejercicio y obesidad

El ejercicio reduce los niveles basales y post-estímulo de insulina y péptido C. (King DS y cols., 1990) Los sujetos que hacen ejercicio físico muestran una mejor tolerancia a la glucosa como resultado de un aumento de sensibilidad a la insulina.

La obesidad genera una resistencia insulínica que condiciona un aumento en la secreción de insulina.

2.3 Secreción de insulina

La secreción de insulina sigue una respuesta sigmoideal (y no lineal) a las concentraciones de glucosa. El umbral de secreción corresponde a niveles de glucosa en ayunas. La elevación de la curva dosis-respuesta correspondería a los niveles de glucosa postprandiales (Gerich JE y cols., 1974). La distribución

gaussiana del umbral para el estímulo de la célula beta es el origen de la naturaleza sigmoïdal de la curva dosis-respuesta (Schuit FC y cols., 1988).

La infusión intravenosa de glucosa origina una respuesta bifásica en la secreción de insulina. Aparece un pico inicial muy rápido seguida de un segundo pico en el que el aumento de la secreción de insulina es mucho más lento (Rayman G y cols., 1990) (Figura 6).

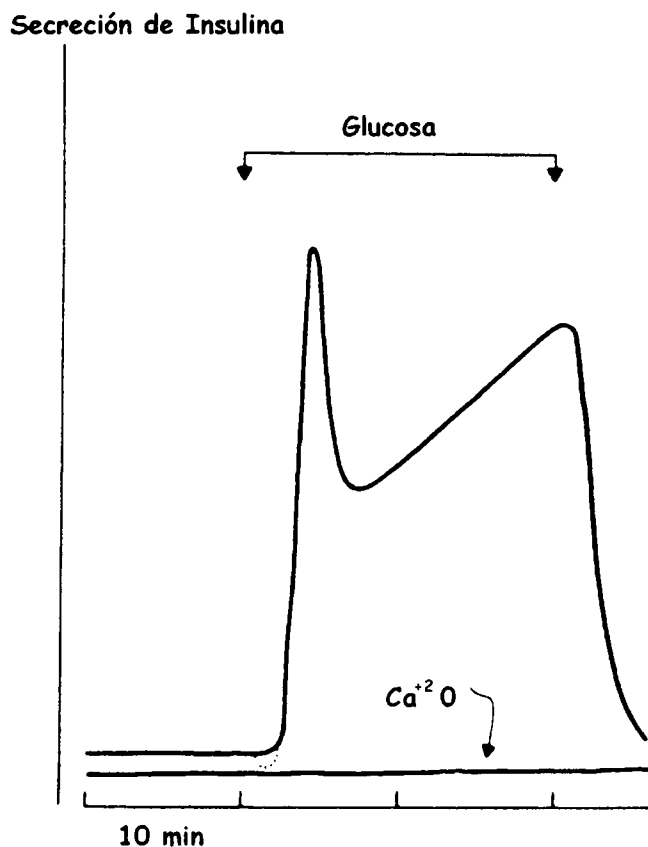


Figura 6. Esquema de la secreción bifásica de insulina, tras la estimulación con glucosa, realizado *in vitro*. Si en el medio extracelular no hay calcio (Ca 0), no se produce secreción de insulina. (Modificado de J. C. Henquin y cols., 1993).

La causa de esta respuesta de dos fases todavía no está aclarada. Las hipótesis que intentan explicar la primera fase de secreción hablan de un compartimento dentro de la célula beta de fácil liberación insulínica o de la existencia de un signo metabólico de vida corta que justificaría el ascenso y descenso bruscos (Grotsky GM, 1972). La segunda fase estaría en relación con los niveles de glucosa. Algunos estudios *in vitro* han demostrado una tercera fase de secreción mucho más lenta que comienza de 1,5 a 3 horas después de la infusión de glucosa y se mantiene durante 48 horas (Grotsky GM, 1989). La respuesta de la insulina depende de la concentración de glucosa pero también de la velocidad con que ésta se modifica. De este modo un aumento lento conlleva que la secreción de insulina se desarrolle de forma lenta, mientras que un aumento más rápido condiciona la respuesta bifásica. Los estadios iniciales de disfunción de célula beta se caracterizan por la pérdida de este patrón de secreción (Brunzell JD y cols., 1976).

La secreción de insulina tiene lugar de manera pulsátil y cíclica, con rápidas oscilaciones cada 8-15 minutos y otras más lentas cada 80-150 minutos (Lang DA y cols., 1982). En un período de 24 horas, el 50 % de la secreción de insulina corresponde a niveles basales y el otro 50 % a la liberación post-estímulo. El páncreas libera al flujo portal 60 mU de insulina por minuto. El hígado retiene un 40 % de la insulina que le llega de tal forma que la circulación general recibe 36 mU de insulina por minuto. Se ha postulado la existencia de un ritmo circadiano de secreción con una menor respuesta nocturna relacionada con la secreción de hormonas contrainsulares (Alparicio NJ y cols., 1974).

El transporte de la glucosa al interior de la célula beta tiene lugar mediante difusión facilitada. Un transportador tipo GLUT2 actúa como sensor de la glucosa y permite una entrada rápida al interior de la célula beta. La glucosa es fosforilada por acción de la glucokinasa y pasa a glucosa 6 fosfato (Newgard CB y cols., 1995). La importancia de esta acción ha supuesto que algunos autores consideren a la glucokinasa el verdadero sensor de la glucosa, si bien es un hecho todavía discutido (Lenzen S y cols., 1988). La glucosa 6 fosfato entra en el ciclo metabólico e inicia la producción de ATP. El ATP se une a los canales de K^+ ATP-dependientes y estos se cierran. El K^+ aumenta en el interior celular y origina una despolarización de la membrana celular. Esta despolarización abre los canales de Ca^{++} que entra en la célula por un efecto de gradiente de concentración (Ashcroft FM y cols., 1989). La representación de los fenómenos bioquímicos implicados en la secreción de insulina se esquematiza en la figura 7.

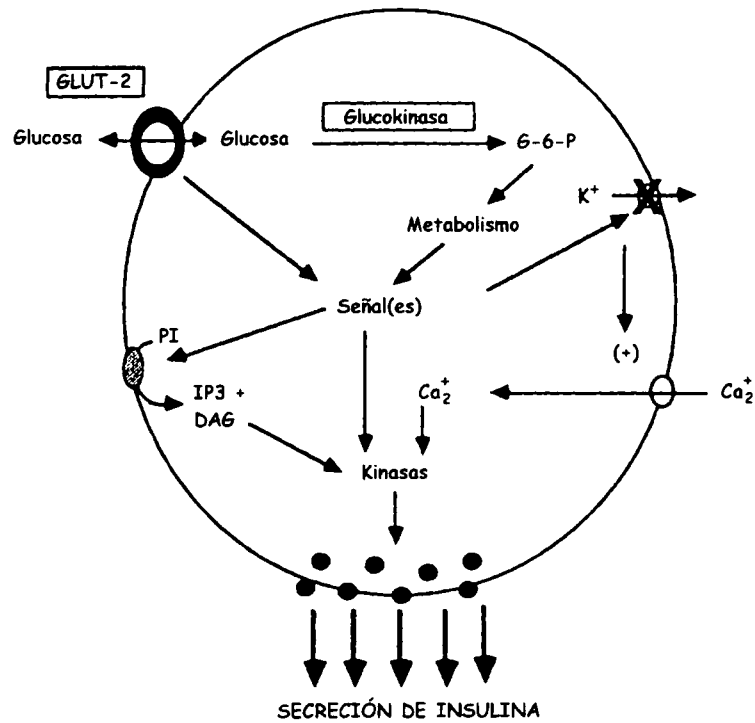


Figura 7. Esquema de la fisiología de la secreción de insulina en la célula beta. (Modificado de C. B. Newgard, 1994).

La elevación de Ca^{++} intracelular activa las proteínquinasas, la calmodulina y la fosforilación de proteínas intracelulares. Esto origina la estimulación de un sistema complejo de microfilamentos y microtúbulos, formados por proteínas contráctiles, para transportar el gránulo de secreción hacia la periferia de la célula beta (Fleischer N, 1989). Probablemente existen otros factores glucosensibles, independientes del Ca^{++} y todavía desconocidos, capaces de poner en marcha este sistema (Henquin JC, 2000). Finalmente la membrana del gránulo y la de la célula se fusionan, disolviéndose ambas en el

punto de contacto y dando lugar a la exocitosis del contenido del gránulo, con la liberación de insulina y péptido C.

3. MASA CELULAR BETA

El peso pancreático medio es de 68 g de los que aproximadamente un 2 % corresponde a tejido endocrino (Bonner-Weir S y cols. (a), 1993). Desde el nacimiento, el páncreas endocrino crece hasta alcanzar 4-5 veces su tamaño inicial. El número y tamaño de las células beta varía en las diferentes etapas de la vida, ajustándose a las necesidades del sujeto.

La cantidad de masa beta es fundamental en el trasplante de islotes. Con el objetivo de obtener la normoglucemia, la masa beta crítica trasplantada debe superar a la esperada (Hering BJ y cols., 1995). Existen factores capaces de reducir la masa beta o inhibir su replicación, empeorando el pronóstico del trasplante. Otros factores, por el contrario, son capaces de estimularla, produciendo el efecto contrario (Tabla 2).

	Inhibidores	Estimuladores
Metabolitos	Glucosa, AGL	Glucosa, AGL, aminoácidos
Citokinas	IL-1, IFN- γ , TNF- α , leptina	GH, PRL, LP
Familia IGF	IGF-I	IGF-I, IGF-II, insulina
Familia EGF		TGF- α , betacelulina, HB-EGF
Familia FGF		aFGF
Familia VEGF/ PDGF		VEGF, PDGF
Familia HGF	HGF	HGF
Familia Glucagón		GLP-1, GIP, glucagón
Familia Somatostatina	Somatostatina	
Familia CGRP	IAPP/ amilina	
Familia Gastrina		Gastrina CCK
Familia TGF- α	TGF- β , folistatina	Activina A
Neurotrofinas		NGF, NT-3
Neurotransmisores	(Nor)epinefrina	Acetilcolina
Proteínas delta-like		pref.-1, FA-1 reg/ INGAP/ PSP/ PTP
Moléculas de adhesión		Integrina $\alpha 6 \beta 1$
Drogas	Diazóxido	Nicotinamida, SU
Toxinas	Streptozotocina, aloxano	

Tabla 2. Lista de factores que inhiben o estimulan el crecimiento y/o la función de la célula beta. (Modificado de Nielsen JH, 1998). AGL: ácidos grasos libres; LP: lactógeno placentario; aFGF: factor ácido de crecimiento fibroblástico; HB-EGF: proteína ligadora de heparina *EGF-like*; HGF: factor de crecimiento hepático; IAPP: polipéptido amiloide de los islotes; IFN: interferón; IL:

interleukina; INGAP: péptido asociado a la neogénesis del islote; NGF: factor de crecimiento nervioso; NT-3: neurotrofina 3; PDGF: factor de crecimiento derivado de las plaquetas; PSP: proteína calcárea pancreática; PTP: proteína filiforme pancreática; SU: sulfonil-ureas, TGF: factor de crecimiento transformante; TNF: factor de necrosis tumoral; VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial.

3.1. Regulación de la masa beta

Durante muchos años se pensó que la masa beta después del nacimiento estaba totalmente diferenciada y permanecía sin cambios. Estudios posteriores han demostrado que la masa beta está expuesta a cambios dinámicos y puede adaptarse según las condiciones fisiológicas. Existen factores capaces de aumentar o reducir su volumen, modificando el tamaño o el número de células beta. La población de células beta guarda un delicado equilibrio entre la formación, (por neogénesis y proliferación), y muerte (por envejecimiento, apoptosis y necrosis) (Nielsen JH y cols., 2001). El incremento de masa beta se produce mediante un mecanismo controlado que no conlleva riesgo de hipoglucemia. En el feto existe un aumento progresivo de células beta por medio de dos mecanismos. El más importante es la diferenciación a partir de células precursoras en el ducto pancreático (Kaung HL y cols., 1994). La situación de anabolismo fetal, con un aumento en la síntesis de insulina, condiciona un

segundo mecanismo de replicación de la célula beta. La muerte celular por mecanismo de apoptosis, es escasa en el período fetal. (Pipeleers D y cols 2001).

En ratas jóvenes, de 10-15 días, existe un llamativo incremento de los procesos de apoptosis sobre el páncreas endocrino. Como la masa beta no cambia, deben existir procesos de formación celular, ya sea vía replicación o neogénesis (Scaglia L y cols., 1997). Un mecanismo de apoptosis similar ocurre en el ser humano, con un aumento del *turn-over* de las células beta en la tercera semana de vida (Torrehave D y cols., 1997). Este proceso se ha atribuido al descenso de los niveles del factor de crecimiento insulina-like-2 (IGF-2) después del nacimiento, justo cuando comienza a aumentar el IGF-1 (Petrik J y cols., 1998).

En el adulto la capacidad de diferenciación a partir de células del ducto pancreático es menos importante. Se ha demostrado la existencia de células precursoras capaces de originar células beta en situaciones especiales (Bonner-Weir S y cols. (b), 1993).

Otro mecanismo regulador es la hipertrofia de la célula beta. En situaciones de demanda metabólica, como una pancreatectomía incompleta (Montana E y cols., 1994) o un trasplante de masa beta insuficiente (Nácher V y cols., 1998), existe una hipertrofia celular compensadora. En la obesidad, las células beta aumentan en número y tamaño (Finegood DT y cols., 2001) Existe también el fenómeno contrario: atrofia celular, consecuencia por ejemplo de una masa beta trasplantada excesiva para mantener la normogluceemia (Montana E y cols., 1994).

3.2. Ciclo vital de la célula beta

La duración del ciclo es el tiempo necesario para que una sola célula origine dos células hijas. En la célula beta de la rata son 14,9 horas. Se diferencian cuatro fases:

- Fase G_1 o previa a la síntesis de DNA: 2,5 horas.
- Fase S o de síntesis de DNA: 6,4 horas.
- Fase G_2 o premitótica: 5,5 horas.
- Fase de mitosis: 0,5 horas.

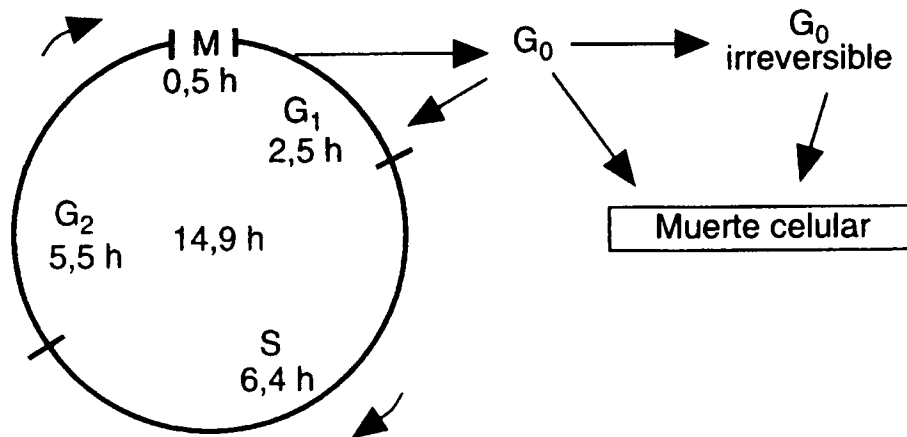


Figura 8. Ciclo de la célula beta en islotes de rata. Las células con carácter proliferativo entran en el ciclo en G_1 continuando hacia el resto de fases. La duración total del ciclo es de 14,9 horas y su duración total y de cada una de las fases no está en relación con el estímulo inicial que condiciona el paso de G_0 a G_1 . (Modificado de E. Montanya, 1996).

Hasta hace pocos años se consideraba que la mayoría de células beta se encontraban en fase G_0 de forma irreversible . Quedaba un pequeño grupo con capacidad para dividirse y entrar en el ciclo celular (Swenne I, 1992). En la actualidad esta teoría está discutida. Se han realizado experimentos sobre células beta *in vitro* utilizando prolactina como estimulante de la replicación, demostrándose la existencia de una activación mitótica por reclutamiento de células beta que se hallan en fase quiescente. Por tanto la célula beta no se encontraría en fase G_0 de forma irreversible sino que poseería una limitada capacidad para la división celular (Rane SG y cols., 2000).

3.3. Estimuladores de la replicación

La replicación del DNA de la célula beta se origina por estímulos diferentes. Los más potente son los nutrientes, en especial la glucosa. Otros factores que intervienen en este proceso son hormonas, péptidos, factores de crecimiento y la propia dotación genética

3.3.1. Nutrientes

La D-glucosa es el estímulo mitogénico más potente para la célula beta. La glucosa no altera la duración del ciclo sino que activa a las células beta para que entren en el mismo. La D-manosa tiene un papel similar. Los mecanismos de

actuación no son bien conocidos (Hellerström C y cols., 1985). Varios aminoácidos, sobre todo ramificados, estimulan la proliferación celular beta por fosforilación de PHAS-1 (proteína fosforilada termoestable y ácidoestable regulada por la insulina). La PHAS-1 tiene un efecto proliferativo mediado por factores de crecimiento, actuando como regulador de la mitogénesis. Este mecanismo es más importante sobre las células fetales (Xu G y cols., 1998). Los ácidos grasos libres pueden ejercer un efecto tanto estimulante como inhibidor de la replicación (Cousin SP y cols., 2001)

3.3.2. Hormonas

Algunas hormonas, como la GH, su mediador IGF-I, IGF-II, la prolactina y el lactógeno placentario, estimulan la replicación de la célula beta. La expresión de receptores pancreáticos para GH y prolactina está aumentado en la vida fetal (Nielsen JH y cols., 1999). En el efecto mitogénico de GH y PRL intervienen además la expresión de diferentes genes y de señales intracelulares como la integrina $\alpha 6\beta 1$ (Nielsen JH y cols., 2001). La insulina y las proteínas ligadoras de IGF (IGFBPs) tienen también un efecto proliferativo sobre la célula beta. Las IGFBPs actúan como transportadoras de IGFs y tienen actividad biológica propia (Romanus JA y cols., 1987; Hogg J y cols., 1993).

3.3.3. Factores de crecimiento

Otros activadores de la replicación celular beta son los factores de crecimiento epidérmicos y hepáticos, TGF- α y algunos péptidos del tracto gastrointestinal como GLP-1 (Nielsen JH y cols., 1999; Drucker DJ y cols., 2001). El factor de crecimiento nervioso o el de los fibroblastos tienen también su papel sobre la célula beta *in vitro* que es objeto de investigación (Hiriart M y cols., 2001). El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) podría estimular un escaso grupo de células capaces de entrar en el ciclo proliferativo. PDGF no actúa sobre la síntesis de insulina (Welsh M y cols., 1990). El cultivo previo de los islotes con factor de crecimiento vascular endotelial mejora la viabilidad de los islotes encapsulados y también aumenta el tiempo de normoglucemia (Sigrist S y cols., 2003). El factor de crecimiento hepático y el IGF-II han mostrado efectos similares en un modelo alogénico, añadiéndose la reducción de la masa beta a trasplantar (López-Talavera JC y cols., 2003; Robitaille R y cols., 2003).

3.3.4. Otros factores

Existen factores genéticos demostrados en ratones (De Gasparo M y cols., 1984). Una nueva familia de genes llamados *Supresores de señal de citokinas* (SOCS) interfiere en la replicación beta. Su papel, inducido por la GH y probablemente por otras moléculas, está todavía por aclarar (Gisselbrecht S,

1999). El embarazo o la obesidad son situaciones en las que se incrementa la masa beta como resultado de una hiperproducción de insulina (Sorenson RL y cols., 1997; Vinik A y cols., 1997).

3.4. Factores inhibidores

El estímulo adrenérgico- α , la pancreastina, la interleuquina- β y TGF- β han demostrado capacidad de inhibir la replicación de la célula beta (Sjoholm A, 1991).

4. ANTECEDENTES DEL TRASPLANTE DE ISLOTES DE PÁNCREAS

Desde que en 1972 se consiguió un adecuado control glucémico en animales diabéticos mediante el trasplante de islotes (Ballinger WF y cols., 1972), esta técnica ha sido objeto de continuas investigaciones. Los resultados, sin embargo, no habían sido los esperados. Los objetivos previstos, conseguir la normoglucemia para evitar la aparición de complicaciones y mejorar la calidad de vida (Lacy PE, 1995), no se consiguieron. La independencia de la insulina no se logró hasta 1990 (Sharp DW y cols., 1990) y hasta el año 2000 los resultados en este sentido fueron muy pobres. El riesgo que conllevaba la inmunosupresión y la reaparición precoz de la hiperglucemia frustró muchas expectativas. Esta situación se ha modificado a partir del año 2000 con la introducción del llamado protocolo de Edmonton.

4.1 Recuerdo histórico

Los primeros trasplantes de islotes en roedores fueron publicados por Lacy y cols. en 1972 (Ballinger WF y cols., 1972). Unos años antes, en 1967, el mismo grupo había descrito la técnica de aislamiento con colagenasa y la obtención de islotes en animales de experimentación. En el páncreas humano se ha empleado el aislamiento con colagenasa durante dos décadas, con escasas variaciones. El sistema de agitación es más agresivo teniendo en cuenta el mayor

contenido fibroso del páncreas humano. En 1988, Ricordi describió un nuevo método semiautomático de aislamiento: la cámara de Ricordi. El desarrollo de esta nueva técnica supuso el inicio de los trasplantes con éxito en humanos durante los años 90 (Ricordi C y cols., 1988). De forma resumida, la cámara de Ricordi permite realizar la digestión enzimática del páncreas, mediante un proceso mecánico, dentro de un sistema cerrado perfundido con una solución de colagenasa. Los islotes atraviesan un filtro o malla que permite su liberación del tejido exocrino y son posteriormente separados y purificados mediante un proceso de centrifugación automatizada. Con el nuevo método se lograban obtener entre 3 000 y 5 000 islotes por gramo de páncreas donante, con una pureza superior al 70 %. Ello suponía en cifras absolutas más de 250 000 islotes por páncreas. Posteriormente una nueva enzima, la liberasa, ha sustituido a la colagenasa en la técnica de aislamiento. Esta enzima no contiene endotoxinas contaminantes, consigue un mayor rendimiento y reproducibilidad del aislamiento, menor toxicidad para los islotes y, por tanto, una mayor supervivencia de los mismos (Linetsky E y cols., 1997).

Uno de los problemas que ha limitado desde siempre el desarrollo de la técnica del trasplante es la obtención de un número suficiente de islotes para lograr la normoglucemia en el receptor. En los animales de experimentación, especialmente roedores, se dispone de un ilimitado número de donantes, lo que evita este problema. Así se ha podido demostrar que la obtención de la normoglucemia se relaciona directamente con la masa beta trasplantada. El término “masa crítica” se refiere al mínimo número de islotes necesarios para lograr la normoglucemia (Warnock GL y cols., 1990).

En el trasplante de todo el páncreas, es suficiente la mitad de los islotes funcionantes (unos 300 000) para conseguir la normoglucemia. Aunque ocasionalmente se ha realizado el trasplante de páncreas como órgano único, el elevado riesgo asociado limita su uso al co-trasplante con otros órganos, especialmente riñón. El riesgo quirúrgico y el coste económico son importantes pero la supervivencia del injerto alcanza el 86 % en el primer año postrasplante. (Farney AC y cols., 2000)

Estos resultados no se conseguían con el trasplante de islotes. En aquellos casos en los que el trasplante había sido exitoso, el número de islotes trasplantados superaba el millón. El aumento en las necesidades de masa beta se ha relacionado con el propio proceso de aislamiento, el rechazo, el fracaso primario o la reaparición del proceso autoinmune en el injerto (Jaeger C y cols., 1997; Tyden G y cols., 1996).

El autotrasplante de islotes se ha realizado en pacientes con pancreatitis crónica dolorosa, neoplasias de páncreas y en patología traumática. En la mayoría de casos se mantiene la funcionalidad total o parcial del injerto (Teuscher AV y cols., 1998; Clayton HA y cols., 2003). Se ha logrado la independencia de la insulina en un 71% con trasplantes de más de 300 000 islotes (Brendel MD y cols., 2001). Son varios los factores que influyen en estos resultados. La ausencia de diabetes previa, la ausencia de rechazo, el nulo efecto de autoinmunidad, el posible efecto de la exéresis de las células α , la ausencia de la toxicidad beta secundaria a la hiperglucemia y probablemente otros mecanismos que aún hoy no conocemos, consiguen que el autotrasplante de islotes sea una técnica efectiva (Pyzdrowski KL y cols., 1992).

Para realizar un trasplante alogénico de islotes con posibilidades de éxito se requiere un número de islotes elevado, que hace necesario más de un aislamiento y más de un páncreas donante. Por ello se agrava el problema del déficit de donantes. El trasplante puede realizarse en días diferentes, trasplantando en cada sesión el número de islotes obtenido de un páncreas donante. Otro modo es efectuar el trasplante de la totalidad de islotes el mismo día. Esto obliga a conservar los islotes en cultivo lo que puede contribuir a pérdidas y alteraciones funcionales en los mismos. Se añade además el riesgo de la contaminación del medio. Para evitar estos problemas Rajotte y cols, en 1988, desarrollaron la criopreservación de islotes (Rajotte RV y cols., 1988). Esta técnica permite mantener los islotes con escasas pérdidas, manteniendo su función una vez descongelados y trasplantados. Se han creado bancos de islotes utilizando este método, lo que permite disponer de ellos durante tiempo indefinido. En la década de los 90 se utilizó la combinación del trasplante de islotes frescos e islotes criopreservados.

4.2 Situación actual del trasplante de islotes

En diciembre del año 2000 el número de alotrasplantes de islotes de páncreas en humanos ascendía a 493. De ellos, 241 se han realizado en Norteamérica, 246 en Europa y 6 en el resto del mundo. En la década de los 90 se produjo un importante auge de los trasplantes de islotes, consecuencia de las mejoras en las técnicas de aislamiento y purificación de islotes y tras la

consecución de la independencia a la insulina en un paciente diabético trasplantado en 1990. Las medidas de control de calidad de los islotes previas al trasplante y los avances en la terapia inmunosupresora contribuyeron a esta mejoría de resultados. Se ha realizado un análisis detallado de los trasplantes realizados entre 1990 y 1999. 237 pacientes, con diabetes tipo 1 y péptido C negativo previo al trasplante, fueron seguidos durante 1 año. El 41 % mantuvo un C-péptido basal mayor o igual de 0,5 ng/mL y el 11 % de los receptores presentaba independencia de la insulina al año del trasplante. El período de independencia de la insulina era mayor si se cumplían los requisitos siguientes:

- El tiempo de preservación de los islotes hasta la fase de aislamiento debe ser menor o igual a 8 horas.
- Deben trasplantarse un mínimo de 6 000 equivalentes de islote por kg de peso del receptor.
- En la inmunosupresión deben utilizarse globulinas antilinfocítica y antitimocítica.
- El trasplante se realiza mediante inyección/infusión vía portal, con acceso percutáneo y bajo monitorización por angiografía, depositándose los islotes en el hígado. No se han descrito otras localizaciones que mejoren los resultados.

De los 67 pacientes trasplantados que cumplieron estas premisas, el 87 % tenía un c-péptido basal mayor o igual de 0,5 ng/mL, el 73 % niveles de HbA1c

menores o iguales a 7 y el 22 % había conseguido la insulín-independencia. Todo ello al año de seguimiento.

Los resultados de los trasplantes realizados entre 1990 y 1999, en cuanto a independencia de la insulina, se muestran en la figura 9.

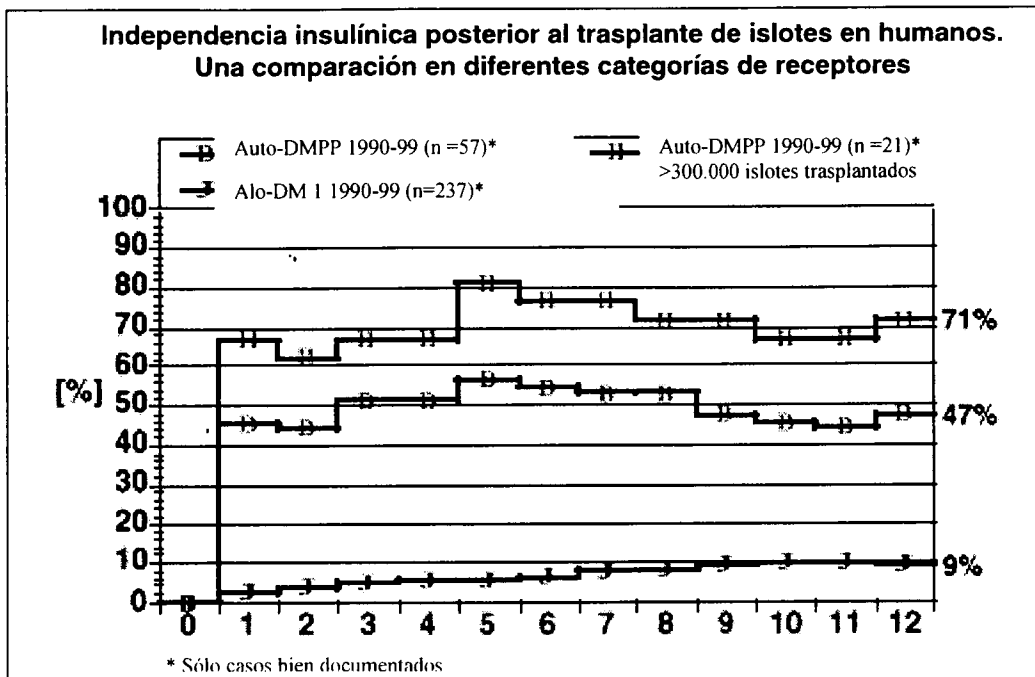


Figura 9. Comparación de resultados con el trasplante de islotes en diferentes categorías de receptores, valorando independencia insulínica con un seguimiento de 1 año. Auto-DMPP: auto trasplante en diabetes secundaria a pancreatoclectomía. Alo-DM 1: alotrasplante en diabetes mellitus tipo 1. (Modificado de: MD Brendel, 2001).

En el año 2000 aparecen publicados por Shapiro y cols. los resultados del Centro de Trasplante de Islotes de Edmonton (Canadá) (Shapiro AMJ y cols., 2000). Al año de seguimiento del trasplante en 7 pacientes con Diabetes Mellitus

tipo 1, todos ellos mantenían la independencia de la insulina y un normal metabolismo de la glucosa. Los receptores elegidos no habían recibido trasplantes de islotes, páncreas u otros órganos previamente. Todos fueron seleccionados según las indicaciones establecidas para el trasplante de islotes: mal control metabólico, con escasa o nula respuesta a la insulina exógena, o hipoglucemias severas repetidas. Las bases para la consecución de estos excelentes resultados fueron las siguientes:

- Utilización del método automatizado de Ricordi para obtener islotes de alta pureza, libres de endotoxinas.
- El trasplante se realizó con islotes frescos, no conservados en medio de cultivo, con un tiempo de isquemia fría corto.
- La masa beta trasplantada superó los 9 000 equivalentes de islote por kg de peso del receptor. La mayoría de pacientes recibió al menos 2 trasplantes.
- La terapia inmunosupresora incluyó daclizumab (anticuerpo monoclonal contra el receptor de la interleukina 2), sirolimus y bajas dosis de tacrolimus. Se excluyeron los glucocorticoides. Tacrolimus y Sirolimus actúan de forma sinérgica in vivo y reducen de modo significativo el proceso de rechazo agudo.

La técnica del trasplante se esquematiza en la figura 10.

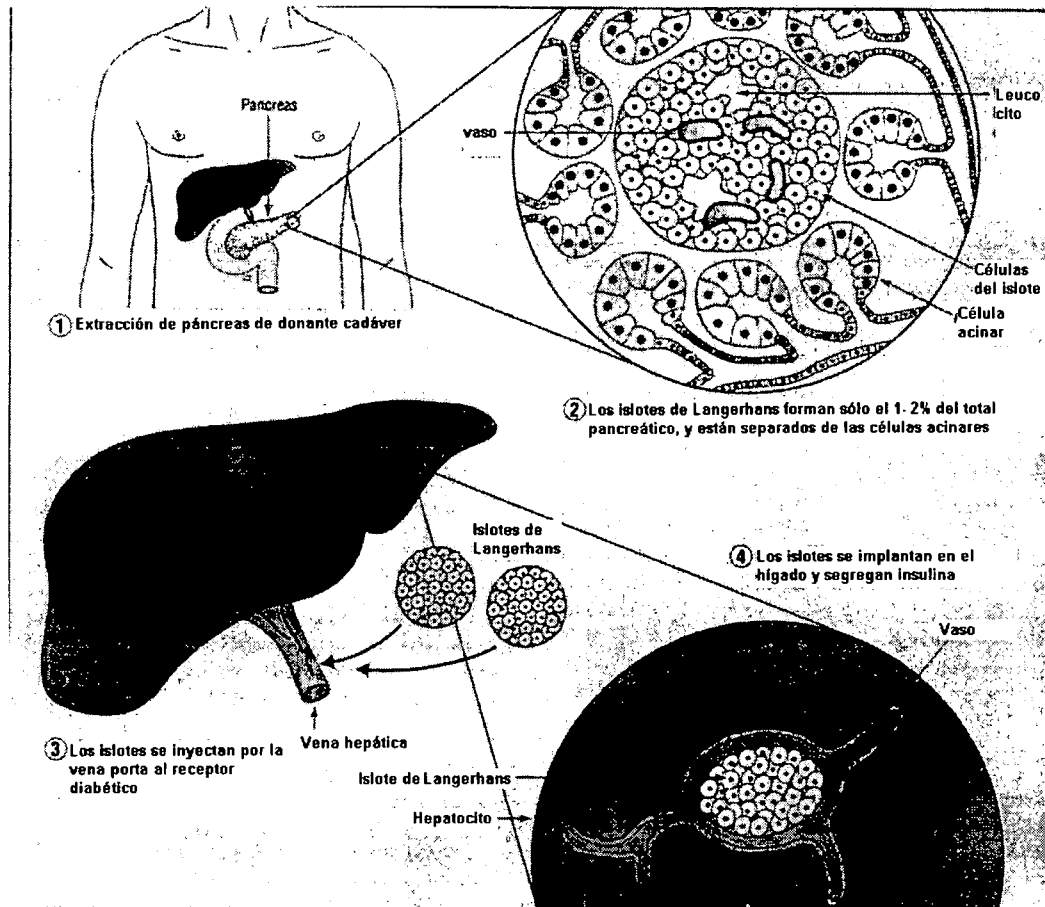


Figura 10. Esquema del trasplante de islotes pancreáticos a través de la vena porta. (Modificado de P. Serup, 2001).

Los islotes se obtuvieron de 2 a 4 donantes y fueron trasplantados de forma secuencial, según se disponía de ellos. Los pacientes fueron dados de alta a las 24 horas del trasplante. A los 20 meses de seguimiento, nueve de los doce pacientes trasplantados estaban libres de insulina. La diabetes post-trasplante que apareció en tres pacientes, se caracterizó por mantener niveles estables de

glucosa, producción endógena de insulina y ausencia de hipoglucemias. Un tercio de los pacientes mostraron una normal tolerancia hidrocarbonada definida por un test de tolerancia oral a la glucosa. Mediante el método HOMA se descartó resistencia a la insulina atribuible al tratamiento inmunosupresor. Todos los pacientes reconocieron que el trasplante había sido beneficioso y ninguno quiso abandonar la inmunosupresión. En una publicación más reciente con seguimiento exhaustivo de 17 pacientes, 6 superaban los 2 años desde el trasplante, 4 de estos 6 permanecían libres de insulina aunque 2 desarrollaron una intolerancia hidrocarbonada. Las hipoglucemias desaparecieron en la mayoría de los pacientes (Ryan EA y cols., 2002).

Después del trasplante se produce un aumento de las transaminasas en más del 50% de los sujetos trasplantados. Sin embargo, los niveles enzimáticos se normalizan a las 4 semanas y no conllevan disfunción hepática ni del injerto (Rafael E y cols., 2003). El problema más relevante se presentó en dos pacientes que presentaban cifras de creatinina elevadas pre-trasplante. La función renal después del trasplante empeoró. Un aspecto a discutir sería la exclusión de estos pacientes de la indicación de trasplante. (Ryan EA y cols., 2001).

Resultados recientes han demostrado la mejoría de la función renal en sujetos diabéticos que han recibido con éxito trasplante renal y de islotes conjuntamente (Fiorina P y cols., 2003). El efecto del trasplante de islotes sobre las complicaciones crónicas de la diabetes deberá ser estudiado en futuras investigaciones.

4.3 Tendencias futuras en el trasplante de islotes

En la actualidad, el tratamiento de la Diabetes mellitus mediante el trasplante de islotes es una alternativa real. No obstante, muchas incógnitas permanecen sin resolver y serán objeto de estudio en los próximos años.

¿Cuánto tiempo puede mantenerse la función de la célula beta trasplantada? Estudios recientes indican que la función del aloinjerto está preservada durante al menos nueve años (Ferreira J y cols., 2000). Avances en los tratamientos anti-rechazo eliminarán las pérdidas de islotes tanto en fase aguda como en la crónica.

Son necesarios estudios a largo plazo que demuestren que los fenómenos de autoinmunidad no reaparecen sobre la masa beta trasplantada a pesar de la inmunosupresión (Braghi S y cols., 2000). Incluso el nuevo protocolo inmunosupresor produce un daño en la estructura del islote. Este efecto negativo se puede reducir disminuyendo la dosis de tacrolimus (Drachenberg CB y cols., 1999).

Las técnicas de aislamiento todavía deben mejorar, ajustando la actividad enzimática al tiempo de digestión y eliminando la contaminación tisular en el trasplante.

El empleo de nuevos tratamientos en el receptor, como fármacos sensibilizadores de insulina (ej. tungstato) o con actividad anti-inflamatoria (anti-TNF alfa, antioxidantes, anticuerpos contra el receptor del complemento...) pueden reducir la pérdida de islotes en el postrasplante inmediato (Bennet W y cols., 2000).

La asociación de terapias adyuvantes de acondicionamiento de la médula ósea y las dosis bajas de inmunosupresores podría reducir los problemas infecciosos o neoplásicos en el receptor.

El trasplante de islotes en la Diabetes tipo 2 es otro apartado objeto de debate. Aunque permanece la incertidumbre, estudios iniciales con trasplante de islotes en el hígado han aportado algunos beneficios. Probablemente no resolverá el problema metabólico pero puede mejorar el control y retrasar las complicaciones en estos pacientes (Ricordi C y cols., 1997).

No obstante, persiste el principal problema que limita la técnica del trasplante: la accesibilidad de los órganos donantes es limitada y actualmente menos del 0.5 % de los pacientes con diabetes tipo 1 podrían beneficiarse de recibir un trasplante de islotes. Las soluciones alternativas pasan por el trasplante de células madre, el empleo de péptidos que estimulan la neogénesis del islote, la ingeniería tisular para conseguir secreción de insulina a partir de células no beta y el desarrollo del xenotrasplante libre de problemas infecciosos ligados a la transmisión viral (Shapiro AMJ y cols., 2000).

4.3.1 Inmunomodulación

Se ha demostrado la existencia de diferentes terapias inmunomoduladoras que permiten la viabilidad del trasplante sin necesidad de tratamiento inmunosupresor. Para ello se han utilizado modelos experimentales, sobre todo

roedores. La aplicabilidad en humanos es discutible y lo que parece claro es que estas técnicas no evitan la inmunosupresión.

La mayor supervivencia del alotrasplante de islotes se ha demostrado, en experimentación animal, manteniendo los islotes en cultivos *in-vitro* en condiciones controladas de temperatura o atmósfera antes del trasplante (Jaeger C y cols., 1994). El empleo de radiación ultravioleta, gamma o rayos X, el tratamiento de los islotes con anticuerpos monoclonales específicos o el bloqueo del complejo de histocompatibilidad de tipo 1 también ha dado resultados positivos.

La Mitomicina C es un agente alquilante ampliamente utilizado para inhibir la proliferación celular en cultivos de leucocitos. El estudio histológico de trasplantes utilizando Mitomicina C ha demostrado una menor infiltración inflamatoria (Gotoh M y cols., 2000).

La utilización de células anérgicas obtenidas *in vitro*, que bloquean la respuesta estimuladora de los CD28/B7, evita el rechazo del injerto *in vivo* (Luo Z y cols., 2000) Siguiendo esta línea, el uso de anticuerpos monoclonales anti-CD3 o anti-CD154 para evitar la activación de las células T, pretende demostrar la mayor tolerancia del injerto a la reacción inmune.

La inducción de un quimerismo asociado, mediante infusiones de médula ósea de donantes específicos, permitiría obtener receptores capaces de aceptar órganos o células diferentes de un mismo donante.

El trasplante de islotes en localizaciones que presentan menor respuesta inmune como el testículo o el cerebro, o en el timo para inducir una tolerancia inmune, han conseguido la supervivencia del injerto sin necesidad de

inmunosupresión (Barker CF y cols., 1985; Lakey JRT y cols., 1996; Dufour JM y cols., 2003).

Estudios en varios modelos de diabetes mediada por inmunidad en animales han mostrado la destrucción de la célula beta por apoptosis. Macrófagos y linfocitos T CD4 y CD8 originan insulinitis y diabetes. Estos linfocitos expresan el ligando de *Fas*, una proteína de la superfamilia de TNF (factor de necrosis tumoral) capaz de producir apoptosis en la célula beta. El cotrasplante de mioblastos genéticamente manipulados para expresar el ligando de *fas*, evita la reacción de rechazo (Lau HT y cols., 1996). La síntesis de radicales de óxido nítrico y citocinas como IL-1 β , TNF- α e interferón- γ (INF- γ) produce destrucción de los islotes in vitro por fenómenos de inflamación crónica. (Suarez-Pinzon W y cols., 1999). La expresión de receptores solubles que se unen a TNF y anticuerpos frente a la IL-1 y anti-INF- γ evitan esta respuesta y ejercen un efecto protector contra la diabetes (Hunger RE y cols., 1997; Mandrup-Poulsen T, 2001). La sobre-expresión de XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein o proteína inhibidora de la apoptosis ligada a X) en las células del islote trasplantadas en un roedor diabético, las hace más resistentes al proceso de rechazo (Plesner A y cols., 2002). La terapia génica, utilizando adenovirus como mediadores, modifica la acción inmunoreguladora de algunas citocinas, y previene la recurrencia del proceso autoinmune de la diabetes (Zhang YC y cols., 2003). Estos estudios sugieren que los islotes modificados genéticamente pueden aumentar la supervivencia del injerto.

4.3.2 Inmunoaislamiento

Los efectos secundarios y el riesgo del tratamiento inmunosupresor ha condicionado el desarrollo del inmunoaislamiento de islotes. Se trata de dispositivos con membranas de diferentes materiales capaces de aislar el injerto del sistema inmune del receptor (Hill RS y cols., 1997). Aunque existen diferentes sistemas de aislamiento, todos ellos se caracterizan por la existencia de membranas capaces de garantizar una liberación adecuada de insulina y permitir el acceso de nutrientes y oxígeno a los islotes.

Los sistemas de inmunoaislamiento están formados por una membrana que actúa de barrera contra el sistema inmune, manteniendo el intercambio de sustancias propio del islote, y un núcleo o hidrogel, generalmente formado por alginato o agar, que fija los islotes al tiempo que evita su agregación. Se han utilizado tres dispositivos de aislamiento de los islotes: los implantes vasculares, las cámaras de difusión o macroencapsulación y la microencapsulación. Los sistemas tipo implante vascular se caracterizan por la anastomosis entre una membrana que recubre la cámara de los islotes y un vaso arterial. Estudios experimentales demostraron el mantenimiento de la normoglucemia durante casi un año en perros tratados mediante este sistema. Los islotes fueron posteriormente recuperados sin signos de infiltración linfocitaria. Sin embargo, se demostró una considerable pérdida de masa beta (Lanza RP y cols., 1995). La dificultad de la intervención quirúrgica, produciéndose incluso la muerte, y la frecuencia de infecciones fueron las mayores complicaciones de este sistema. Las cámaras de difusión son dispositivos en forma de disco o tubo en cuyo

interior se coloca un número elevado de islotes (Lanza RP y cols., 1992). La microencapsulación de islotes es el método de inmunoaislamiento más utilizado. Consiste en colocar uno o unos pocos islotes dentro de cámaras esféricas de pequeño tamaño, formadas por una cubierta membranosa de material permeable. La membrana suele estar compuesta por poli-l-lisina y alginato. Las partículas de alginato se licúan para formar un gel en el interior de la cápsula, que rodeará al islote (Fritschy WM y cols., 1991). El fracaso de la encapsulación de islotes se ha asociado a una reacción extraña del receptor, no bien conocida, que ocasiona una fibrosis alrededor de la cápsula con isquemia y posterior necrosis de los islotes. (Fritschy WM y cols., 1994) La fibrosis puede afectar a la totalidad de las cápsulas o sólo a una parte de ellas, bien a las pocas semanas o después de varios meses de la implantación (De Vos P y cols., 1993). Otra causa de fallo del injerto encapsulado es la impureza del alginato utilizado o la inadecuada formación y tamaño de la cápsula, que induce una falta de biocompatibilidad (De Vos P y cols., 1996).

Con el aislamiento de islotes no sólo se evita el tratamiento inmunosupresor en receptores diabéticos, sino que ofrece la posibilidad de trasplantar islotes animales. Esto podría acabar con la limitación en cuanto al número de islotes por falta de donantes humanos. El trasplante de islotes de cerdo encapsulados ha conseguido la normoglucemia en monos y ratones diabéticos sin tratamiento inmunosupresor (Sun Y y cols., 1996; Wang W y cols., 2003).

El xenotrasplante de islotes de rata microencapsulados y trasplantados conjuntamente con células de Sertoli purificadas, ha demostrado mantener de

forma más prolongada la normoglucemia en ratones diabéticos (Calafiore R y cols., 2001).

Aunque los estudios en humanos son escasos, se ha confirmado la viabilidad de islotes encapsulados en tejido subcutáneo de pacientes diabéticos, así como la independencia de la insulina de un sujeto que recibió un trasplante de islotes microencapsulados en peritoneo (Soon-Shiong P y cols., 1992). Sin embargo, los avances en el campo de la inmunosupresión han limitado el desarrollo de la encapsulación de islotes para su trasplante.

4.3.3 Xenotrasplante

La falta de páncreas donantes para la obtención de masa beta ha contribuido a la búsqueda de alternativas en el trasplante de islotes. Una de las líneas más estudiadas es el xenotrasplante, utilizando islotes de cerdo. La fuente celular permite la obtención de un número ilimitado de islotes productores de insulina. El principal problema radica en el efecto inmunógeno del injerto xenogénico, mucho mayor que en el trasplante de islotes humanos (Groth CG y cols., 1996). El rechazo hiperagudo está mediado por anticuerpos contra un alfa-galactosil-xenoepitopo, pre-existente en los cerdos. El rechazo más tardío está mediado por otro xenoantígeno todavía no definido (Karlsson-Parra A y cols., 1996). El desarrollo de cerdos transgénicos que expresen genes humanos y los avances en las técnicas de clonación porcina prometen un futuro cercano de cerdos “humanizados”. Cada animal carecería de un xenoantígeno de

importancia inmunológica pero no esencial para la supervivencia. La tecnología permitirá incluso la producción de cerdos para receptores individualizados por su HLA.

El mayor problema del xenotrasplante a partir de cerdos transgénicos es el riesgo potencial de infecciones propias del animal, como retrovirus endógenos, que pueden afectar al receptor humano. Los retrovirus producen infección de forma casi permanente. Existen estudios *in vitro* que demuestran la capacidad infectiva de los retrovirus porcinos sobre células humanas. (Patience C y cols., 1997). La transmisión de la infección se ha confirmado también en estudios *in vivo* sobre un modelo experimental. En ratones genéticamente modificados, diabéticos e inmunodeprimidos, que recibían un xenotrasplante de islotes de origen porcino, se hallaba infección de varios tejidos por retrovirus porcinos (Van der Laan LJ y cols., 2000). Hasta que la ausencia de riesgo de transmisión se confirme, en USA se han detenido los xenotrasplantes de islotes. Por el contrario, se han publicado datos de 10 pacientes suecos que recibieron injertos xenogénicos sin objetivarse signos de infección tras analizar sus linfocitos (Heneine W y cols., 1998). En cualquier caso, deben establecerse normativas estrictas para evitar el posible riesgo de transmisión de patógenos en este tipo de trasplante.

4.3.4 Expansión y diferenciación de células ductales pancreáticas

Las células epiteliales del ducto pancreático, mantenidas en medio de cultivo durante largos períodos, tienen capacidad de crecimiento y diferenciación, obteniéndose islotes funcionantes que contienen células α , β y δ (Ramiya VK y cols., 2000). Los islotes obtenidos, una vez trasplantados en ratones diabéticos, logran reducir los niveles de glucemia hasta casi la normalidad. Los animales mantuvieron las cifras glucémicas durante los tres meses que duró el estudio. Las células humanas del ducto pancreático poseen también la capacidad de crecer y diferenciarse. La capacidad de estas células de reducir los niveles glucémicos debe de comprobarse en sucesivos estudios (Bonner-Weir S y cols., 2000). Se han iniciado varias líneas de investigación en este sentido. Otra posibilidad también abierta es el empleo de células ductales fetales para la obtención de islotes productores de insulina.

4.3.5 Células madre o “Stem-cells”

Las células madre son unidades potenciales que se han empleado durante años en diferentes campos de la biología. El organismo de un mamífero está formado por más de 200 tipo celulares que derivan del inicial óvulo fecundado. Divisiones progresivas de este óvulo fecundado originan el estadio de blástula. La blástula contiene un grupo de células totipotentes de las que derivan las células madre embrionarias. Cada célula madre puede crecer *in vitro* y

diferenciarse en varias líneas celulares. Utilizando células madre embrionarias transfectadas con un promotor de insulina, se han diferenciado de forma selectiva células productoras de insulina (Soria B y cols., 2000).

En la actualidad existe gran expectación con los estudios que se están desarrollando utilizando células madre adultas procedentes de la médula ósea, con capacidad para diferenciarse en la producción de insulina. De este modo se solucionan algunos problemas de tipo ético relacionados con la utilización de embriones y que habían suscitado controversias en los últimos años.

Quedan todavía aspectos por dilucidar, como el potencial efecto neoplásico de una proliferación celular de este tipo. En cualquier caso, es evidente que se trata de líneas de investigación con enormes posibilidades terapéuticas.

4.3.6 GLP-1 y células madre adultas productoras de insulina.

Diferentes investigaciones habían demostrado que la hormona intestinal GLP-1 (péptido 1 natural glucagón-like) puede provocar la proliferación de células beta y la secreción de insulina. Habener y cols han identificado un tipo de células madre en los islotes, las progenitoras derivadas de islotes nestin positivas (NIP), y han demostrado que podían diferenciarse en células secretoras de insulina. El mismo grupo investigador ha publicado que las NIP expresan un receptor proteico que se une al GLP-1 y éste, al activarse, induce a que las NIP se diferencien en células secretoras de insulina (Habener y cols., 1998). Por

tanto, la GLP-1 generada localmente puede estimular el desarrollo de células beta productoras de insulina al hacer que las células madre del islote se diferencien.

4.3.7 Células madre de páncreas fetal y precursores de célula beta

El conocimiento del desarrollo del páncreas endocrino ha sido fundamental para intentar producir células del islote *in vitro*. La identificación de los precursores del páncreas endocrino y la regulación de su diferenciación (vía Delta Notch) permite modular esa diferenciación de precursores a partir de páncreas fetales o células ductales.

4.3.8 Terapia génica

La alta diferenciación de las células beta hace difícil su proliferación en medios de cultivo. Los islotes fetales poseen gran capacidad proliferativa pero su diferenciación está limitada. El desarrollo de líneas celulares pancreáticas en roedores ha progresado espectacularmente en los últimos años, utilizando oncogenes para reactivar el ciclo celular y la replicación del DNA en células beta. Entre las líneas celulares empleadas se encuentran las de insulinomas espontáneos, insulinomas inducidos por carcinógenos, insulinomas inducidos por virus oncogénicos, insulinomas inducidos por la combinación de carcinógenos y

virus oncogénicos e insulinomas inducidos en ratones transgénicos que expresan oncogenes dominantes, particularmente SV40-antígeno T (Demeterco C y cols., 2001). Sin embargo, una inducción forzada de la proliferación conduce a diferentes grados de dediferenciación. Las líneas celulares beta transformadas mediante la oncoproteína SV40 T-antigen (*Tag*), producen y secretan bajas cantidades de insulina, pero producen insulina como respuesta a glucemias bajas y con el tiempo van dediferenciándose (Soldevila G y cols., 1991).

Se ha conseguido crear una línea celular beta a partir de células de ratones transgénicos que expresan un oncogen regulador de la tetraciclina (Efrat S y cols., 1995). Estas células beta transformadas (llamadas β TC-tet) dependen de la expresión de *Tag* para su capacidad proliferativa. Poseen capacidad para producir y secretar insulina en respuesta a concentraciones fisiológicas de insulina. En un modelo de ratón singénico, diabético mediante estreptozotocina (STZ) y tratado con tetraciclina, se demostró la normalización glucémica. Este tratamiento evita una expansión celular anormal mientras parece mantenerse la funcionalidad del injerto durante meses (Fleischer N y cols., 1998). Con el empleo de un sistema de regulación “*tet-on*” se ha conseguido la normogluceemia en ratones sin necesidad de mantener el tratamiento con tetraciclina después del trasplante (Milo-Landesman D y cols., 2001). Sin embargo, en contraste con lo que ocurre en roedores, la inducción de proliferación beta en islotes humanos conduce a una pérdida de la expresión de insulina. Además, la replicación de las células humanas está limitada por el tamaño de los telómeros, mucho más cortos en comparación con los de los ratones.

En humanos, la respuesta inflamatoria de las citocinas y la respuesta de los factores de crecimiento, como los hepáticos, muestran diferencias muy relevantes. Es muy difícil adaptar células normofuncionantes a partir de insulomas humanos, por ello el desarrollo de líneas celulares se produce mediante oncogenes inductores de la replicación beta (Wang S y cols., 1997). La primera línea celular beta humana para el tratamiento de la diabetes fue la llamada betalox5, obtenida de células beta adultas purificadas y capaz de secretar insulina en respuesta a glucosa tanto *in vitro* como *in vivo* (De la Tour D y cols., 2001).

Otra posibilidad es la transferencia genética utilizando virus como vector. Así, se han empleado vectores adenovirus para transferir genes a diferentes células endocrinas, entre ellas las células beta. Los vectores pueden producir una potente respuesta inflamatoria con la producción de anticuerpos y esto ocasiona una reducción en la expresión transgénica (Anderson WF, 1998). También se han utilizado RNA virus como vectores de la transducción de islotes pancreáticos, como el virus de la leucemia murina Moloney que ha demostrado su utilidad *in vitro*. Algunos lentivirus, como el virus de la inmunodeficiencia humana, poseen la ventaja de no ser prácticamente inmunógenos si los comparamos con los adenovirus, pero la infección de los islotes no ha demostrado mejoría de la glucemia a partir de secreción insulínica (Giannoukakis N y cols., 1999). La transferencia génica usando sistemas no virales se considera más segura pero menos eficiente que estos. Se han aplicado la co-precipitación calcio-fosfato y la lipofección entre otros.

La modificación genética de células no-beta para reproducir la secreción de insulina es muy compleja. Se requiere la expresión de la proteína GLUT2 y una actividad glucoquinasa. Se han empleado células adenohipofisarias productoras de ACTH (obteniéndose las llamadas células *atT-20*), células del epitelio gastrointestinal, miocitos y hepatocitos, pero aunque los resultados son prometedores, quedan lejos de plantearse como una alternativa actual (Moore HP y cols., 1985; Bartlett RJ y cols., 1997 ; Goldfine ID y cols., 1997; Kolodka TM y cols., 1995).

La principal ventaja de todos estos métodos es la capacidad de producir células secretoras de insulina a un bajo coste, sin la limitación del número de donantes.

5 EFECTO DE LA HIPERGLUCEMIA SOBRE LA CÉLULA BETA TRASPLANTADA.

Numerosos estudios han puesto de manifiesto el efecto tóxico de la hiperglucemia sobre el islote pancreático. Este efecto ha sido estudiado sobre los islotes trasplantados (Merino JF y cols., 2000). Los mecanismos que lo originan parecen ser múltiples. La hiperglucemia inhibe la replicación de la célula beta y reduce la masa beta total (Montana E y cols., 1993). Afecta también a la irrigación del injerto trasplantado, reduciendo el flujo sanguíneo y retrasando la vascularización (Menger MD y cols., 1992). La presión de oxígeno en el islote pancreático de un roedor sano es de aproximadamente 40 mm Hg. En el islote trasplantado dicha presión se reduce a 6-7 mm de Hg y no se modifica en los meses siguientes al trasplante. En ratas diabéticas con hiperglucemia se ha demostrado un descenso en la presión de oxígeno del islote trasplantado (Carlsson PO y cols., 2000). Se ha descrito un efecto de la hiperglucemia sobre el sistema nervioso vegetativo, que afecta la respuesta normal de la célula beta a la glucosa (Gardemann A y cols., 1994).

En conclusión, se conoce que la hiperglucemia produce un deterioro de la función de la célula beta (Jansson y cols., 1995). Este hecho tiene una especial trascendencia en el caso del trasplante de islotes pancreáticos, que alcanza una importancia pronóstica para la supervivencia del injerto.

5.1. Crecimiento de los islotes trasplantados

La hiperplasia e hipertrofia de la masa beta bajo determinadas circunstancias ha sido ampliamente demostrada. Los ratones *ob/ob* son obesos y presentan hiperglucemia e hiperinsulinemia. En estos animales la masa beta alcanza un volumen hasta 10 veces mayor del de otros roedores de su misma familia (Andersson A y cols., 1994). Si un ratón *ob/ob* recibe un trasplante de islotes de un animal singénico delgado, la situación de hiperglucemia conlleva un incremento de 5 veces el diámetro de los islotes trasplantados, por hipertrofia e hiperplasia de la célula beta trasplantada (Andersson A y cols., 1981).

En roedores diabéticos, un trasplante de islotes incapaz de conseguir la normoglucemia por masa beta insuficiente supone que la hiperglucemia inicial estimule la replicación celular del injerto. Este aumento de la replicación puede mantenerse durante varios días como respuesta a una situación de aumento de demanda metabólica. No obstante, la hiperglucemia mantenida acaba afectando la funcionalidad del islote y limita de forma progresiva la replicación de la célula beta. La consecuencia final es una disminución global de la masa beta trasplantada (Montana E y cols., 1993).

5.2. Revascularización de los islotes trasplantados

Los islotes trasplantados han perdido la relación normal con los accesos vasculares. En los días posteriores al trasplante se produce un fenómeno de

revascularización que influye de manera primordial en la funcionalidad del injerto. La microcirculación de los islotes trasplantados juega un importante papel en la restauración de la homeostasis de la glucosa (Dionne KE y cols., 1993). La regulación de la secreción insulínica pasa por una irrigación adecuada de los islotes que garantice su normal oxigenación. En 1977, Griffith y cols. demostraron la revascularización de los islotes trasplantados vía porta. El estudio de la revascularización del injerto trasplantado se desarrolló años más tarde mediante un modelo de inyección de microesferas que permitía analizar el flujo sanguíneo (Jansson L y cols., 1981). Este modelo, utilizado con posterioridad, evidenció que la revascularización del trasplante de islotes vía porta se originaba a partir de nuevos vasos derivados de la arteria hepática. El día 4 postrasplante ya existían evidencias de revascularización. Estudios recientes han confirmado que los primeros signos de angiogénesis aparecen a los 2-3 días del trasplante y el proceso de vascularización es completo después de 10-14 días (Menger MD y cols., 2001).

La relación del proceso de revascularización con los niveles de glucemia todavía está discutida. Utilizando el modelo de microesferas en animales que habían recibido un trasplante insuficiente para conseguir la normoglucemia se demostró una menor captación. Esto indicaba un menor grado de revascularización y demostraba el efecto perjudicial de la hiper glucemia sobre la normal vascularización del islote trasplantado (Andersson A y cols., 1989). En el trasplante realizado bajo cápsula renal en roedores las conclusiones fueron similares. Manteniendo la normoglucemia los islotes trasplantados alcanzaron un flujo sanguíneo comparable al de los islotes de un páncreas sano. Los animales

trasplantados con una masa beta insuficiente permanecieron hiperglucémicos y el flujo sanguíneo del injerto se demostró reducido a las cuatro semanas del trasplante. Si estos animales recibían tratamiento con insulina y normalizaban las cifras de glucemia, también el flujo sanguíneo del islote trasplantado se normalizaba. Con esto parecía demostrado el papel de los niveles glucémicos en la revascularización y en la regulación del flujo sanguíneo de los islotes trasplantados (Jansson L y cols., (b) 1989 ; Sandler S y cols., 1987). Si la hiperglucemia acontece meses después del trasplante, cuando la revascularización es completa, el flujo sanguíneo no se modifica (Jansson L y cols., 1992). Esto orienta a que la elevación glucémica podría influir en la regulación del flujo sanguíneo en los vasos sanguíneos inmaduros. Sin embargo, algunos estudios posteriores realizados con trasplantes de islotes en músculo estriado y bajo cápsula renal no lograron demostrar el efecto de la hiperglucemia sobre la revascularización (Menger MD y cols., 1992 ; Menger MD y cols., 2001).

La técnica de aislamiento puede influir en la revascularización del injerto. La contaminación de los islotes con tejido exocrino interfiere en la vascularización del trasplante sobre músculo estriado, demostrándose una menor densidad de capilares funcionantes (Heuser M y cols., 2000).

Recientes trabajos con algunos nuevos inmunosupresores, como el RS-61443, o con suplementos diarios de antioxidantes, como la vitamina E, parecen ejercer un papel protector sobre la microcirculación del injerto (Menger MD y cols., 2001).

5.3. Reinervación de los islotes trasplantados

Ya se ha comentado la relación de los islotes pancreáticos con las fibras nerviosas. La inervación normal del islote permite modular la influencia de otros secretagogos sobre la liberación de insulina. Al igual que ocurre con la vascularización, el trasplante de islotes supone la pérdida de la conexión entre el islote y las fibras nerviosas. El proceso de reinervación del injerto de islotes singénicos bajo cápsula renal ha sido estudiado por Korsgren y cols. Se ha demostrado la existencia de fibras nerviosas a las seis semanas del trasplante y la diferenciación de fibras simpáticas y parasimpáticas a las 14 semanas. La glucemia también parece modificar el proceso de reinervación, retrasándose el mismo si se mantiene una situación de hiper glucemia (Korsgren O y cols., 1992).

La hiper glucemia altera la regulación del sistema vegetativo, estimulando el tono parasimpático e inhibiendo el simpático. Como consecuencia de ello se producen modificaciones en la secreción normal de insulina (N'Guyen JM y cols., 1994).

5.4. Funcionalidad de los islotes trasplantados

La función secretora de insulina en el trasplante singénico de islotes bajo cápsula renal ha sido estudiada por Korsgren y cols. Para ello utilizó un efluente de una perfusión en el conjunto de injerto y riñón (Korsgren O y cols., 1989). La extracción del riñón que contenía el injerto se siguió de la perfusión del mismo

utilizando una solución con diferentes concentraciones de glucosa y arginina. Cuando el trasplante era efectivo se demostró una respuesta de insulina normal al estímulo con glucosa bifásica a las cuatro semanas del trasplante. La hiperglucemia mantenida alteraba la secreción insulínica. En estudios a largo plazo también se demostró que la hiperglucemia mantenida durante 10 semanas producía una disminución de la funcionalidad del injerto para producir insulina (Korsgren O y cols., 1990). La recuperación de la normoglucemia se seguía del restablecimiento de la secreción de insulina por los islotes trasplantados. Se conoce, sin embargo, que pueden existir factores genéticos implicados en la respuesta de la célula beta al estímulo con glucosa. El efecto deletéreo de la hiperglucemia sobre islotes humanos fue demostrado por Jansson y cols en 1995 (Jansson L y cols., 1995).

Hipótesis y objetivos

Hipótesis y objetivos

La hiperglucemia tiene un efecto perjudicial sobre la célula beta y los islotes pancreáticos que se hace extensiva al trasplante alogénico de islotes. Este efecto puede condicionar un peor pronóstico e incluso un fracaso del trasplante.

La corrección de la glucemia, mantenida con tratamiento insulínico los días que preceden y siguen al trasplante alogénico de islotes pancreáticos podría mejorar el pronóstico del mismo y disminuir el número de islotes necesarios para conseguir la normoglucemia.

Los objetivos concretos se resumen en dos:

1. Determinar si la normoglucemia conseguida mediante tratamiento insulínico y mantenida desde los días previos al trasplante hasta el día 10 post-trasplante, mejora la evolución del trasplante alogénico de islotes de páncreas.
2. Determinar si el tratamiento con insulina permite reducir la masa beta necesaria para conseguir la normoglucemia en el trasplante alogénico de islotes pancreáticos.

Material y métodos

Material y métodos

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN, INDUCCIÓN DE LA DIABETES EXPERIMENTAL Y DETERMINACIÓN DE LA GLUCOSA

Para el desarrollo del estudio se utilizaron ratones macho Swiss cepa MNRI como donantes y receptores del trasplante de islotes. Se trata de un modelo alogénico de animales y, por tanto, con diferente dotación genética entre ellos. Al inicio del estudio la edad de los ratones fue de 4 semanas. Los animales permanecieron, durante el tiempo que duró el estudio, en habitaciones climatizadas con control de los ciclos de luz y temperatura y con libre acceso a agua y comida (A 04 Rata ratón Panlab. Panlab S.L. Barcelona. España)

En los animales receptores, la diabetes se indujo mediante inyección intraperitoneal de estreptozotocina (Streptozocin, Sigma Chemical, Germany). Para ello se preparó una solución de 22,5 mg de estreptozotocina y 1 ml de tampón citrato con pH de 4,5. Se utilizó una dosis de 180 mg/kg de peso. La mezcla se preparó inmediatamente antes de su administración y se inyectó vía intraperitoneal utilizando una jeringuilla de insulina. La confirmación de la presencia de diabetes se realizó con la detección de hiperglucemia y pérdida de peso. Únicamente se consideraron diabéticos los animales que presentaron una glucemia superior a 360 mg/dL, confirmada al menos en dos determinaciones de días diferentes. Los ratones diabéticos eran subsidiarios de recibir tratamiento con insulina, trasplante, o ambos.

La glucemia se determinó a días alternos entre las 9: 00 y las 11: 00 horas sin ayuno previo. Para ello se practicó un pequeño corte en la cola del ratón.

La glucemia se midió utilizando un glucómetro portátil (Glucometer Elite, Bayer, Japan). A continuación se pesó el animal con ayuda de una balanza digital de precisión.

2. GRUPOS EXPERIMENTALES

Para estimar el tamaño de la muestra se utilizará la ecuación de Arkin para comparar dos proporciones independientes, teniendo en cuenta que se cumplen las condiciones de aplicación de la prueba de χ^2 para una tabla de dos por dos:

$$n = \frac{[Z_{\alpha 1} \sqrt{2p(1-p)} + Z_{\beta 1} \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)}]^2}{(p_1 - p_2)^2}$$

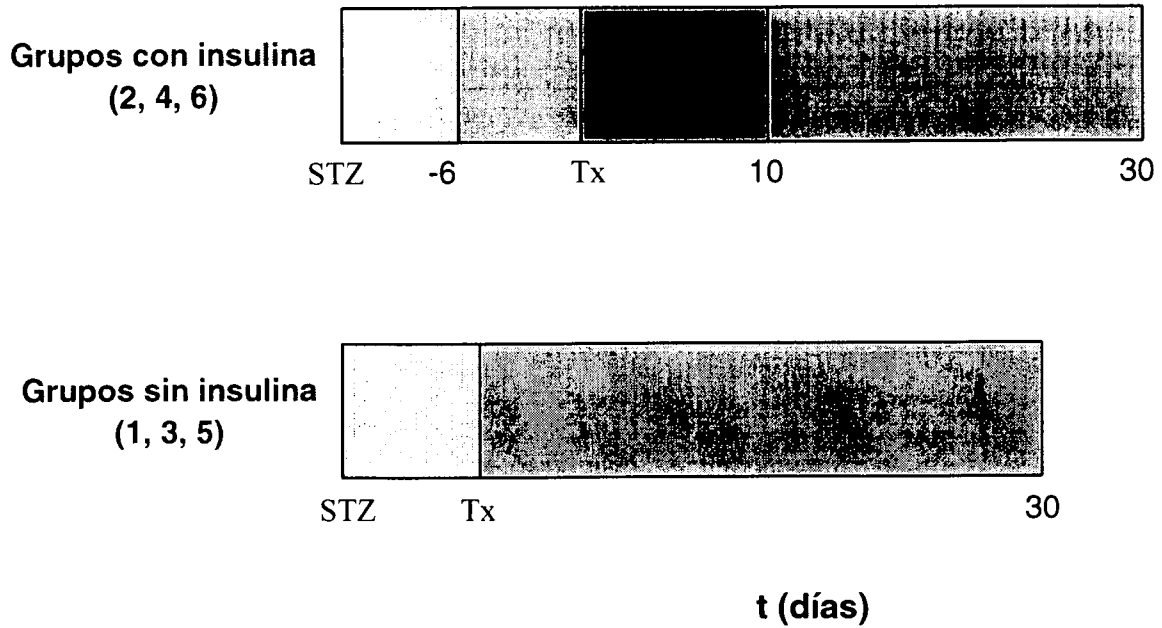
Donde se considera un $\alpha 1 = 0,05$ one tail, y por tanto, $Z_{\alpha 1} = 1,65$. Así como una potencia del 80%: $\beta 1 = 0,20$ y, por tanto, $Z_{\beta 1} = 0,842$. Estimando una diferencia del 35 % entre el grupo no tratado con insulina (curación del 0-5%, y por tanto $p_1 = 5\%$) y el grupo tratado con insulina (curación del 35-40 %, y por tanto $p_2 = 40\%$), y sabiendo que $p = (p_1 + p_2)/2$, tenemos que el tamaño de la muestra es de aproximadamente 21 para cada grupo (grupo tratados con insulina y grupo no tratados con insulina).

Para el desarrollo del estudio se analizaron 6 grupos de animales diabéticos tras la inyección de estreptozotocina. Cuando se confirmó la diabetes, a los 3-10 días de la administración de estreptozotocina, los animales fueron trasplantados o tratados con insulina según el grupo al que pertenecieran. Una vez confirmada la diabetes, los ratones se distribuyeron de forma aleatoria en cada uno de los grupos en función del número de islotes trasplantados y de si recibieron o no tratamiento con insulina. Cada grupo de animales trasplantados estuvo formado por 8 ratones. La distribución de los grupos fue la siguiente:

- a. Grupo 1: animales diabéticos mediante estreptozotocina intraperitoneal, no tratados con insulina y trasplantados con 300 islotes bajo cápsula renal izquierda.
- b. Grupo 2: animales diabéticos mediante estreptozotocina intraperitoneal, trasplantados con 300 islotes bajo cápsula renal izquierda y tratados con insulina desde el día 4-6 antes del trasplante hasta el día 10 después del mismo.
- c. Grupo 3: animales diabéticos mediante estreptozotocina intraperitoneal, no tratados con insulina y trasplantados con 400 islotes bajo cápsula renal izquierda.
- d. Grupo 4: animales diabéticos mediante estreptozotocina intraperitoneal, trasplantados con 400 islotes bajo cápsula renal izquierda y tratados con insulina desde el día 4-6 antes del trasplante hasta el día 10 postrasplante.
- e. Grupo 5: animales diabéticos mediante estreptozotocina intraperitoneal y trasplantados con 500 islotes bajo cápsula renal izquierda.
- f. Grupo 6: animales diabéticos mediante estreptozotocina intraperitoneal, trasplantados con 500 islotes bajo cápsula renal izquierda y tratados con insulina desde el día 4-6 antes del trasplante hasta el día 10 después del mismo.

El esquema de los grupos se representa en la figura 11.

GRUPOS EXPERIMENTALES



 Tratamiento con insulina

Figura 11. Diseño experimental. Los números indican el día del estudio en relación con el día del trasplante. STZ: día de inyección de la estreptozotocina. Tx: día del trasplante. T: tiempo (días)

A estos grupos se añadieron 2 grupos controles, también formado por 8 animales cada uno:

- Grupo control de animales sanos no diabéticos, no trasplantados y no tratados con insulina.
- Grupo control de animales diabéticos y tratados con insulina, pero no trasplantados.

La edad, las condiciones de habitabilidad, el aporte de agua y comida, las determinaciones glucémicas y del peso no difirieron en estos animales con respecto a los trasplantados.

3. TRATAMIENTO CON INSULINA

En los ratones que recibieron tratamiento con insulina se utilizaron implantes subcutáneos de liberación sostenida (LinBit, Linshin Canada, Inc), que contienen una mezcla de insulina y ácido palmítico cristalizado. Este tratamiento proporciona un aporte de insulina más continuo que permite un control metabólico más estable que la inyección de insulina (Wang PY, 1991).

Para la colocación de los implantes de insulina, los ratones fueron anestesiados ligeramente con éter. Se practicó un pequeño corte en la región cervico-dorsal del animal, accediendo a nivel subcutáneo a la grasa de esta zona, lugar donde fueron colocados los implantes. Como paso previo, los implantes fueron mantenidos durante 2 minutos en una solución de povidona yodada al 2% (Betadine, Asta Médica, Lab. Sarget Burdeos, Francia) para evitar la posible contaminación bacteriana. Los animales recibieron tratamiento con un número mínimo de 2 implantes, incrementándose el número de los mismos según control glucémico y peso, de esta forma se aseguró el período de normoglucemia. Una vez finalizado el tratamiento, el animal fue nuevamente anestesiado del modo ya comentado, para retirar los implantes. En todos los animales los implantes fueron localizados sin dificultad y retirados en una sola pieza.

Para asegurar la estabilidad de la normoglucemia a lo largo de todo el día, en aquellos animales que recibieron tratamiento con insulina se determinó la glucemia dos veces al día a días alternos (entre las 9: 00 y las 11: 00 y entre las 15: 00 y las 17: 00 horas).

4. AISLAMIENTO DE ISLOTES

Para el aislamiento de islotes pancreáticos se preparó una solución de colagenasa (Colagenase, Boehringer Mannheim, USA) de 2 mg/ml en medio de cultivo M-199 (Medium 199, Life Technologies, Scotland) sin suero bovino fetal. El ratón donante fue anestesiado con Tiopental (Tiobarbital Braun, Braun Medical, España), 100 mg/kg de peso mediante inyección intraperitoneal. Posteriormente se realizó una laparotomía media, se localizó el conducto biliar común y se pinzó el mismo a nivel de la ampolla de Vater. Después se procedió a la canalización del colédoco con una aguja de 30 G (Microlance 3, Becton Dickinson, España) y a la inyección de 2 ml de la solución de colagenasa. Tras sacrificar al animal se extrajo el páncreas que fue sometido a una incubación en baño termostático a 37° C durante 10-12 minutos. Una vez concluida la digestión se lavó utilizando medio de cultivo M-199 a 4° C. Se realizaron tres lavados consecutivos centrifugando a 800-1.000 r.p.m. A continuación el digerido se pasó por un filtro de 800 µm (Sigma, Immunochemicals, St Louis, MO) para eliminar restos de tejido. Posteriormente se separaron los islotes realizando un gradiente de densidad con 10 ml de Histopaque (Histopaque 1077, Sigma Aldrich, USA) y 10 ml de M-199. Dicho gradiente se centrifugó a 2.300 r.p.m. durante 15 minutos a 4 -8° C para extraer la interfase donde se encuentran los islotes. Para los tres lavados posteriores se utilizó M-199 con suero bovino fetal al 10% (Gibco, BRL Life Technologies, South Africa) centrifugando en cada paso a 1.000 r.p.m.

La solución final que contenía los islotes se depositó en una placa de Petri y con ayuda de un estereomicroscopio se procedió a su identificación y pesca manual en dos ocasiones para eliminar cualquier resto de tejido exocrino. Se escogieron únicamente aquellos islotes cuyo tamaño se encontrara entre 75 y 250 μm . Se desecharon islotes desflecados o aquellos cuyo aspecto pudiera sugerir sobredigestión. Los islotes puros permanecieron en medio de cultivo RPMI (RPMI 1640 Medium, Life Technologies, Scotland) con antibiótico (Penicilina G sódica 50.000 UI y estreptomina 50.0000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en una estufa con atmósfera controlada a una temperatura de 37 ° C y una pCO₂ del 5% durante 24 horas para su posterior trasplante.

5. TRASPLANTE DE ISLOTES

El día del trasplante se pescaron los islotes con una punta de pipeta de 200 μ l utilizando una jeringa de precisión Hamilton de 1 ml (Hamilton, Reno, NE). Los islotes se pasaron a un microtubo de polietileno PE50 (Beckton Dickinson, Sparks, MD) que fue centrifugado a 700 r.p.m. durante 1 minuto. Al finalizar este paso, los islotes formaban un aglomerado en el microtubo y estaban preparados para su trasplante.

El ratón receptor fue anestesiado con éter. Se practicó una lumbotomía para exponer el riñón izquierdo. Tras realizar una pequeña incisión en el polo inferior de la cápsula renal, se introdujeron los islotes bajo la misma con ayuda de la jeringa de precisión Hamilton. Se roció la zona expuesta con un combinado antibiótico que incluía Penicilina G sódica (5.000 UI/ ml) y estreptomicina (5.000 μ g/ ml). Se cauterizó la capsulotomía mediante una pinza eléctrica a baja temperatura para finalizar suturando la incisión lumbar.



Figura 12. Técnica del trasplante: introducción de islotes. Con el riñón expuesto y una vez realizada la incisión en la cápsula renal, se van introduciendo los islotes bajo la misma utilizando un tubo de polietileno desde el polo inferior renal hacia el superior. La flecha indica el “pellet” de islotes en el interior del tubo.



Figura 13. Técnica del trasplante: implantación del injerto. Los islotes han quedado depositados en el polo superior del riñón, bajo la cápsula. Lentamente se procede a retirar el tubo de polietileno para no dañar la cápsula. La flecha indica el lugar del injerto.

6. INMUNOSUPRESIÓN

Como inmunosupresor se utilizó ciclosporina en solución oleosa, administrada mediante inyección subcutánea en tres dosis (30 mg/kg/día), el día del trasplante y el día 1 y 2 postrasplante. Con este pauta se garantizan niveles de inmunosupresión en rango terapéutico durante todo el período de seguimiento (Álvarez Gómez S y cols., 1997).

7. EXTRACCIÓN DEL INJERTO Y DEL PÁNCREAS

Una vez finalizado el período de seguimiento del estudio se procedió a la retirada del injerto. Para ello se sometió al ratón a anestesia ligera con éter, practicándose posteriormente una lumbotomía con exposición del riñón izquierdo. Se ligaron la arteria y vena renal y se realizó una nefrectomía izquierda. De esta manera se identificó el injerto. Tras la extracción se suturó la lumbotomía. La pieza quirúrgica permaneció en solución de formaldehído para su posterior análisis histológico.

Durante los días siguientes a la extracción del injerto se determinaron glucemia y peso para confirmar la reaparición de la diabetes en los animales normoglucémicos. En estos ratones la extracción del páncreas se realizó 4-9 días después de la retirada del injerto.

En los animales que no permanecieron normoglucémicos al finalizar el estudio, la extracción del injerto y del páncreas se realizó en un mismo tiempo, dado que no fue necesario confirmar la reaparición de la diabetes.

Para la extracción del páncreas se realizó una laparotomía media exponiendo el órgano. Se sacrificó al animal mediante disección de aorta y vena cava. Posteriormente se extrajo el páncreas, diseccionándolo de los tejidos vecinos, y se incluyó en solución de etanol ácido, manteniéndose a -20°C hasta su homogeneizado.

8. TEST DE TOLERANCIA INTRAPERITONEAL A LA GLUCOSA

Los animales que mantuvieron la normoglucemia durante todo el período de seguimiento fueron sometidos a un test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa. Esta prueba se realizó el día 30 post-trasplante. Para ello, los ratones permanecían en ayunas durante 2 horas. A las 10: 00 horas recibieron una solución de glucosa al 10% (Laboratorios ERN, España) inyectada vía intraperitoneal a una dosis de 1,5 g/kg de peso. La glucemia se determinó en el momento de la inyección y 30, 60, 90, 120 y 180 minutos después. Los resultados obtenidos se analizaron considerando la glucosa en cada punto y el área bajo la curva calculada por un método trapezoidal (Le Floch JP y cols., 1990).

9. CONTENIDO DE INSULINA

Los páncreas extraídos fueron pesados en una balanza de precisión. Para realizar la determinación del contenido pancreático de insulina, los páncreas fueron homogeneizados en 500 μ l de etanol ácido y mantenidos durante un tiempo variable (2-6 días) a una temperatura de -20°C . Posteriormente el homogeneizado se centrifugó a 2 400 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C , almacenando el sobrenadante a -20°C hasta que se determinó el contenido de insulina mediante enzimo inmunoanálisis. Para ello se utilizó un estándar de insulina de rata (Merodia Rat Insulin Elisa, Uppsala, Suecia).

El contenido de insulina pancreático se midió en $\mu\text{g/g}$ de tejido.

10. ESTUDIO HISTOLÓGICO

Todas las muestras biópsicas se procesaron según el mismo método, una vez realizadas las distintas secciones paralelas de las muestras, éstas fueron incluidas en parafina mediante un procesador automático de tejidos (autoprocador Technicon), pasando previamente por una serie de baños consecutivos:

Fijación:	Formol neutralizado al 10%	2 horas
	Alcohol de 70 ⁰	1 hora
Deshidratación:	Alcohol de 96 ⁰	1 hora
	Alcohol de 100 ⁰	1 hora
	Alcohol de 100 ⁰	1 hora
	Alcohol de 100 ⁰	1 hora
	Alcohol de 100 ⁰	1 hora
Aclaramiento:	Alcohol de 100 ⁰ /Tolueno	1 hora
	Tolueno	1 hora
	Tolueno	1 hora
Impregnación en parafina:	Parafina a 60 ⁰	2 horas
	Parafina a 60 ⁰	2 horas

Una vez formado el bloque de parafina se realizaron cortes histológicos de 6 a 8 micras de espesor con microtomos histológicos convencionales, que se extendieron sobre un baño de flotación de agua caliente a 45⁰, siendo recogidos sobre el portaobjetos.

Las secciones obtenidas fueron desparafinadas manteniéndose en estufa a 60⁰ durante 30 minutos y sometiéndose a tres baños de xilol de 10 minutos, y por último para deshidratarlas se realizaron tres baños de alcohol de 96⁰ de 10 minutos y uno de alcohol absoluto, para finalmente lavarlas en agua corriente.

Posteriormente se realizó la tinción de las secciones histológicas con hematoxilina-eosina, según técnica habitual, de acuerdo con el siguiente procedimiento:

Hematoxilina de Harris	15 minutos
Dos lavados de agua corriente	
Alcohol clorhídrico	3 seg
Agua corriente (2 baños)	5 min
Eosina-Floxina	3 min
Alcohol de 96 ⁰ (lavar)	3 seg
Alcohol de 96 ⁰	2 min
Alcohol de 100 ⁰	2 min
Xilol (2 baños)	3 seg
Montaje con medio sintético (“Eukit”, “Entellan”)	

El estudio histológico que realizamos inicialmente se verificó sobre las secciones histológicas originales teñidas con hematoxilina-eosina. En todos los casos obtuvimos los bloques de parafina correspondientes, procediendo a realizar entre 8 y 10 secciones histológicas seriadas, teñidas con hematoxilina-eosina.

El análisis microscópico de los cortes se realizó con un microscopio Olympus BH2.

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados se procesaron con el programa estadístico SPSS/PC versión 10.0, y se expresaron como media y error estándar de la media (EEM) salvo que se indique lo contrario. Cuando las variables fueron cuantitativas, la comparación entre variables paramétricas de dos grupos se realizó mediante el *t-test* de Student y la comparación entre variables no paramétricas de dos grupos mediante la U de Mann-Whitney o la W de Wilcoxon según fuesen independientes o apareadas. Cuando se compararon más de dos grupos y las variables fueron paramétricas se utilizó el test de análisis de la varianza, y para variables no paramétricas la H de Kruskal-Wallis. En el análisis de la varianza la identificación de los grupos diferentes se realizó utilizando la prueba de Scheffé y la corrección de Bonferroni.

Para la comparación de variables cualitativas se utilizó la χ^2 .

Se consideró significativa la $p < 0.05$.

Resultados

Resultados

1. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON INSULINA EN LA EVOLUCIÓN DEL TRASPLANTE

1.1. Estudios preliminares

1.1.1. Valores de normalidad de la glucosa en sangre

El valor de normalidad de la glucemia en el ratón Swiss cepa MNRI, en condiciones de no ayuno, fue de $150,2 \pm 18,8$ mg/dL (n= 122). Considerando un intervalo de confianza del 95%, el límite inferior de la glucemia en condiciones de no ayuno fue de 117,0 mg/dL y el superior de 225,0 mg/dL.

1.1.2. Inducción de diabetes experimental

Se inyectó estreptozotocina a un total de 115 ratones. En el momento de la inyección no existían diferencias significativas en cuanto al peso (peso medio $32,5 \pm 2,8$ g) o la glucemia. Se consideró instaurada la diabetes cuando la glucemia superó los 360 mg/dL en dos determinaciones medidas en días diferentes. El porcentaje de éxito en la inducción de diabetes experimental fue del 79,1 % . Fue precisa una segunda dosis de estreptozotocina en un 21,7 % de los animales (25 ratones). En estos 25 animales se reinyectó la estreptozotocina $6,4 \pm 2,6$ días después de la primera inyección. El tiempo medio de la

confirmación de diabetes fue de $7,3 \pm 3,5$ días post-estreptozotocina. Se produjeron 4 fallecimientos (3,5 % de ratones), dos de los animales murieron durante la inyección de STZ y otros dos por causas desconocidas, antes de instaurarse la diabetes.

1.1.3 Efectividad del tratamiento con insulina

Para comprobar la normalización de las cifras de glucemia mediante el tratamiento con insulina, se realizó un estudio con 6 animales diabéticos no trasplantados, con un período de seguimiento de 30 días desde la inyección de STZ.

La administración de insulina se realizó a los $8,5 \pm 3,0$ (5-15) días de la inyección de STZ. A los dos días ya se comprobó la normogluemia en los animales ($79,5 \pm 9,9$ mg/dL). Al final del seguimiento ($31 \pm 9,1$ días post-STZ y $19 \pm 8,2$ días después de iniciar el tratamiento con insulina), la glucemia media del grupo diabético no trasplantado y tratado con insulina fue de $170,1 \pm 54,4$ mg/dL (figura 14).

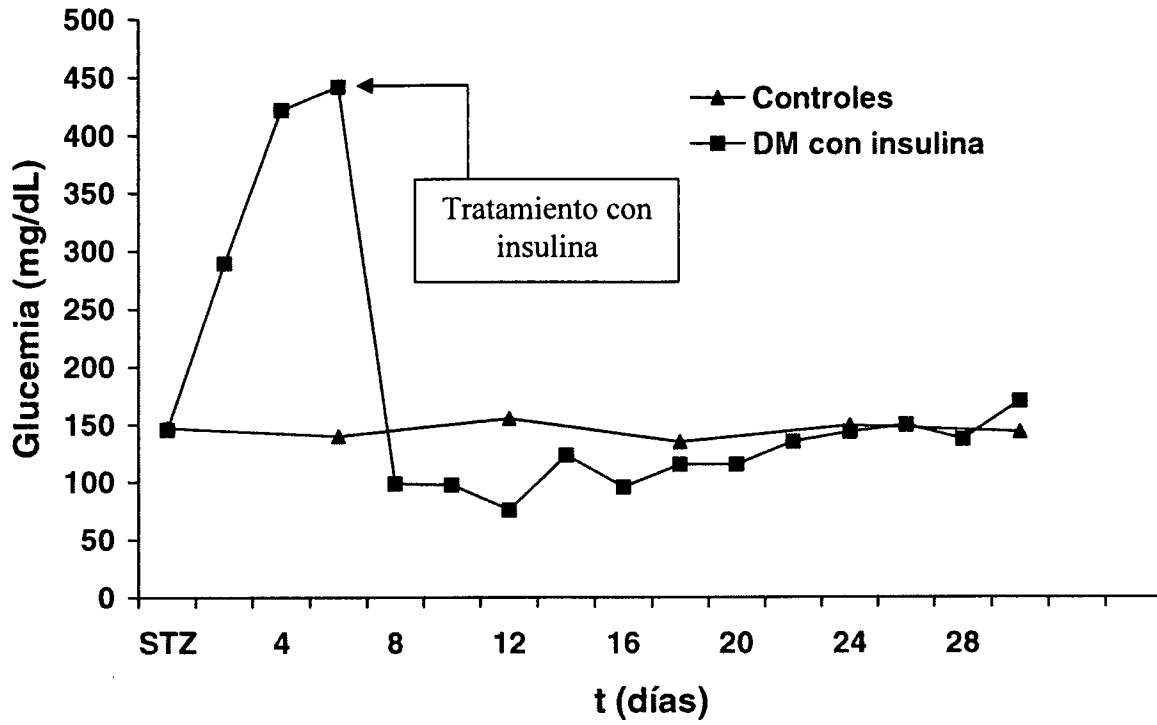


Figura 14. Evolución de la glucemia en animales diabéticos no trasplantados y tratados con insulina durante un período de 30 días desde la inyección de estreptozotocina. STZ: día de inyección de estreptozotocina

1.2. Evolución metabólica

Tras la confirmación de la diabetes, los animales fueron distribuidos de forma aleatoria en cada uno de los grupos según se ha descrito en el apartado de material y métodos.

A estos grupos se les añadió un grupo control (n=8) de animales no diabéticos, no trasplantados y no tratados con insulina, de edad comparable a la del resto de grupos y sometido a las mismas condiciones de habitabilidad. A estos ratones se les determinó glucemia y peso una vez por semana durante cinco semanas consecutivas.

En la tabla 3 quedan reflejados los días desde la inyección de STZ al trasplante o tratamiento con insulina según se trate, y desde el tratamiento con insulina al trasplante.

Grupo	N	Días desde STZ a trasplante	Días desde STZ a insulina	Días desde insulina a trasplante
1	8	10,7 ± 7,2	-	-
2	8	15,2 ± 3,6	7,0 ± 1,8	8,5 ± 4,2
3	8	6,9 ± 4,5	-	-
4	8	15,5 ± 3,5	7,6 ± 2,5	8,0 ± 3,1
5	8	9,8 ± 4,7	-	-
6	8	11,7 ± 3,2	6,1 ± 2,1	5,9 ± 1,5

Tabla 3. Intervalos entre la inyección de STZ y el trasplante, entre la inyección de STZ y la colocación de los implantes de insulina y entre la colocación de insulina y el trasplante. Los números de los grupos corresponden a los ya indicados con anterioridad.

En la tabla 4 quedan reflejadas las características metabólicas de los grupos trasplantados y del grupo control. Todos los grupos fueron comparables en edad, peso y glucemia en el momento de administrar STZ. Los grupos que recibieron tratamiento con insulina fueron comparables, en cuanto a edad, glucemia y peso, tanto en el momento de administración de la misma como en el día del trasplante. Los grupos que no fueron tratados con insulina también fueron comparables en el día del trasplante.

Grupo (n)	Trat. con insulina	STZ		Insulina		Trasplante		Extracción injerto	
		Glucemia (mg/dL)	Peso (g)	Glucemia (mg/dL)	Peso (g)	Glucemia (mg/dL)	Peso (g)	Glucemia (mg/dL)	Peso (g)
1	No	161,0 ± 9,9	25,3 ± 0,4	-	-	533,0 ± 12,1	26,2 ± 0,6	582,4 ± 7,3	33,3 ± 1,1
2	Sí	156,9 ± 7,1	25,1 ± 0,3	488,6 ± 27,1	27,1 ± 1,1	156,0 ± 22,3	33,6 ± 0,8	357,6 ± 74,3	38,7 ± 1,1
3	No	140,0 ± 7,5	24,6 ± 0,3	-	-	519,3 ± 22,3	24,0 ± 1,0	592,1 ± 8,8	33,0 ± 1,5
4	Sí	148,5 ± 3,8	24,7 ± 0,4	509,6 ± 31,7	25,8 ± 1,4	107,5 ± 14,2	33,0 ± 2,3	431,5 ± 66,6	37,5 ± 2,2
5	No	141,8 ± 4,6	24,2 ± 0,3	-	-	488,1 ± 15,4	27,1 ± 1,0	534,9 ± 43,1	34,3 ± 0,9
6	Sí	158,5 ± 6,6	24,7 ± 0,5	462,0 ± 14,2	26,5 ± 0,8	119,5 ± 14,7	30,7 ± 0,7	377,4 ± 78,0	36,7 ± 1,1
Control	No	147,0 ± 7,1	23,7 ± 0,1	140,3 ± 7,0	30,7 ± 0,3	155,3 ± 8,1	36,0 ± 0,4	143,3 ± 6,7	44,1 ± 0,8

Tabla 4. Características metabólicas de los grupos experimentales y del grupo control. En el grupo control se muestran la glucemia y el peso en tiempos similares a los de los grupos trasplantados.

El injerto fue retirado el día 30 post-trasplante. En ese momento, de los animales que habían sido tratados con insulina, el 50 % del grupo 2 (n=4) y del grupo 6 (n=4), y el 37,5 % del grupo 4 (n=3) mantenían la normoglucemia. El día 30 post-trasplante sólo 1 de los animales no tratados con insulina del grupo 5 permanecía normoglucémico. Ninguno de los animales no tratados con insulina del grupo 1 y 3 consiguieron este objetivo (Figura 15).

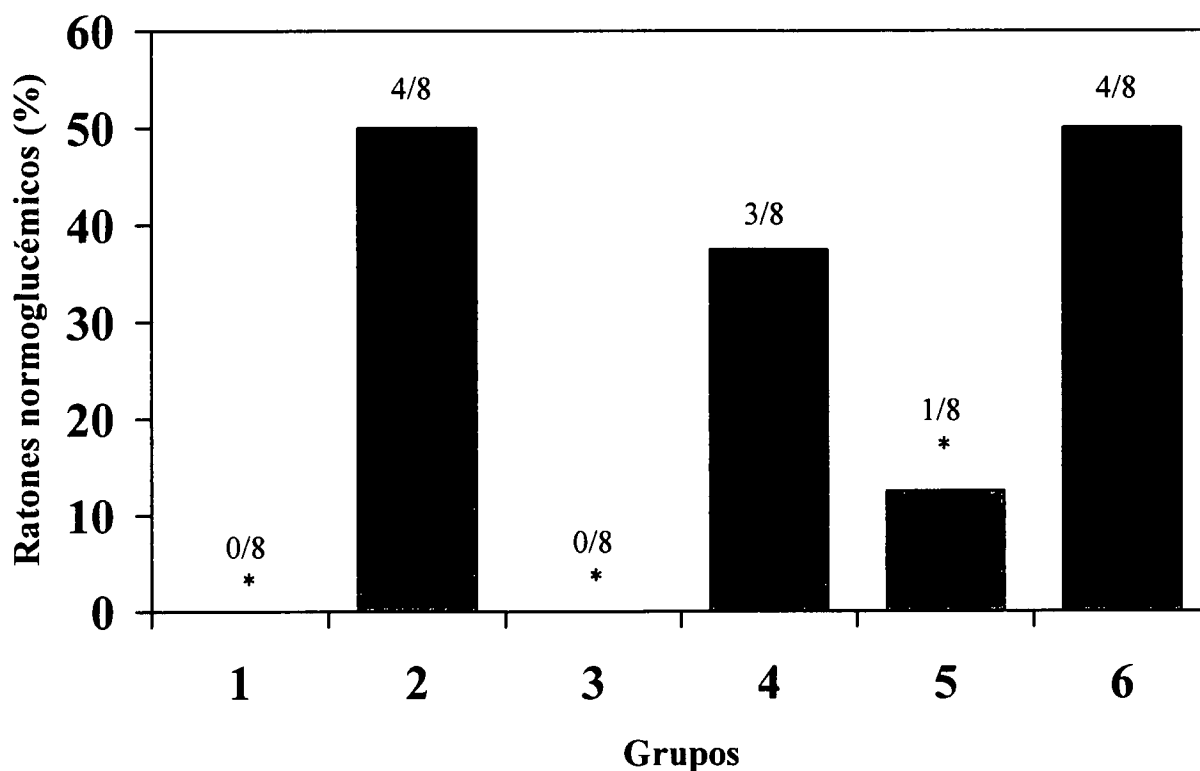


Figura 15. Animales normoglucémicos al final del período de seguimiento (30 días post-trasplante). En el eje X se reflejan los grupos descritos en las tablas 1 y 2. Los números sobre las columnas indican el número de animales de cada grupo que permaneció normoglucémico al final del estudio. * $p < 0,05$ versus los otros grupos.

La figura 16 muestra la evolución de la glucemia en los animales trasplantados y tratados con insulina, con respecto a los animales trasplantados y no tratados con insulina. La figura 17 muestra la evolución del peso en estos mismos animales.

Las figura 18 muestra la evolución de la glucemia en los animales trasplantados y tratados con insulina, diferenciando cada grupo en normo/hiperglucémicos según el resultado al final del estudio.

La figura 19 muestran la evolución de la glucemia en los animales diabéticos trasplantados y no tratados con insulina y en los animales trasplantados y tratados con insulina que permanecieron normoglucémicos al final del estudio.

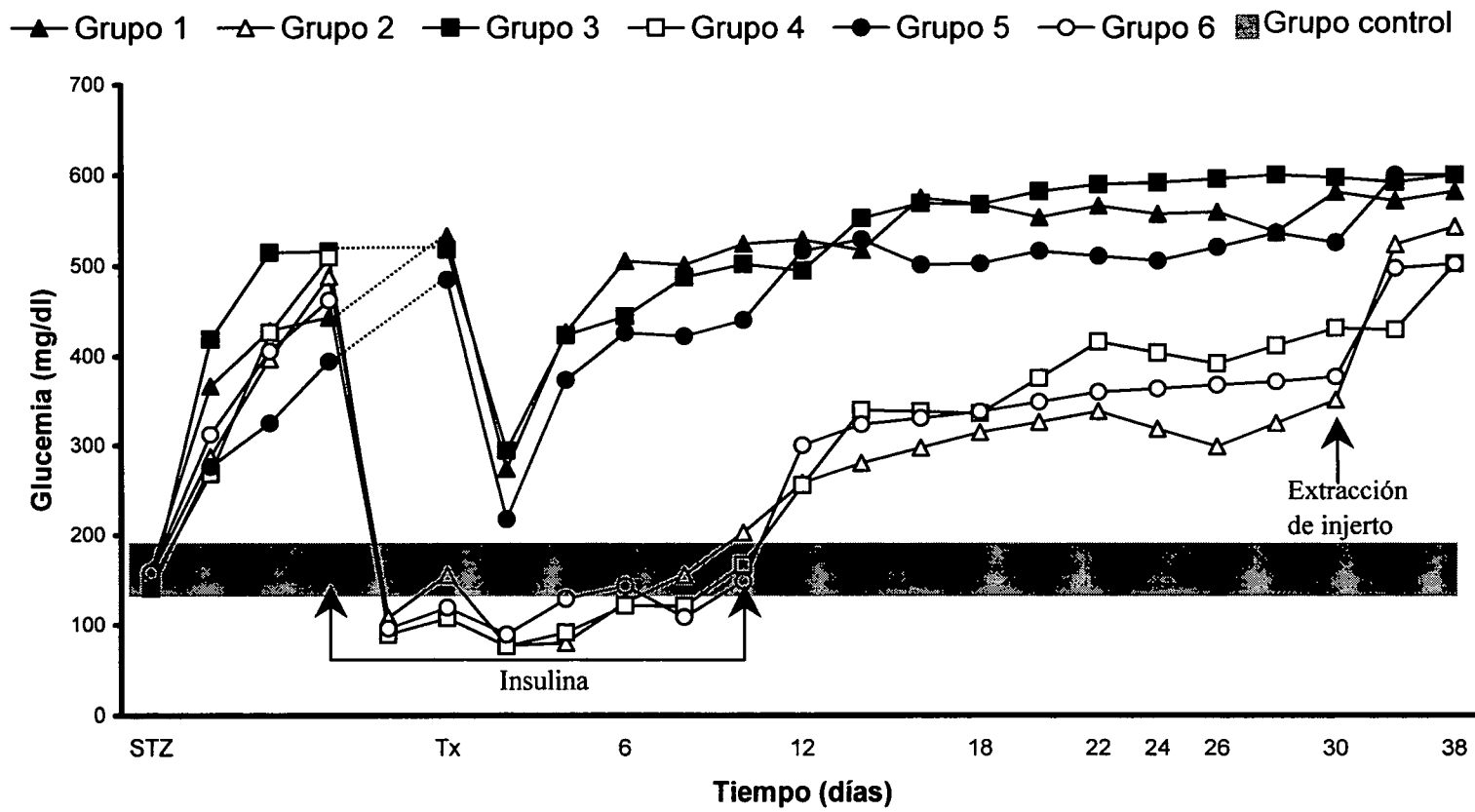


Figura 16. Evolución de la glucemia en los grupos experimentales. STZ: día de inyección de estreptozotocina. Tx: día de inyección de trasplante. Cada grupo corresponde a los grupos trasplantados que se muestran en las tablas 3 y 4.

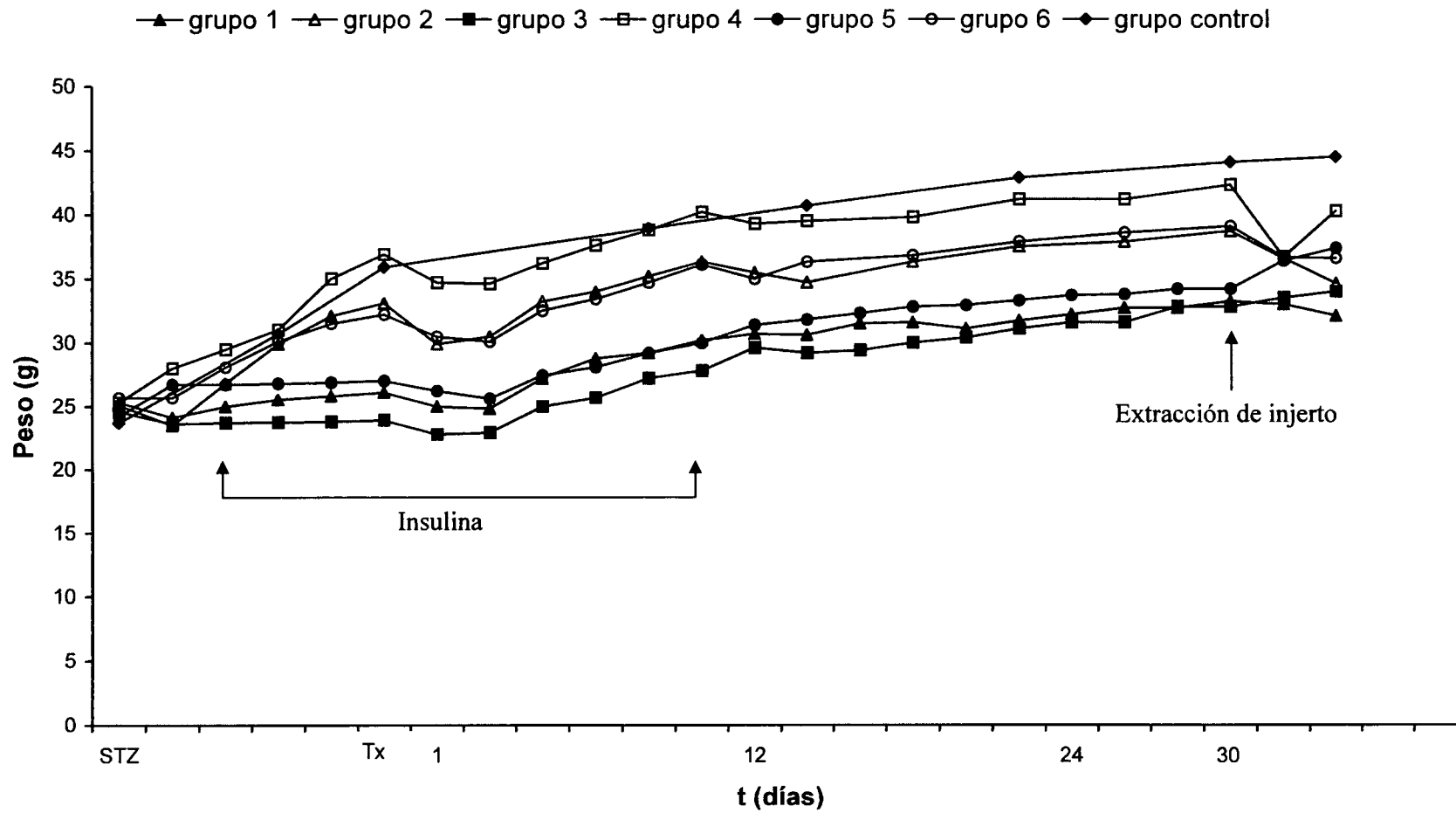


Figura 17. Evolución de peso en los animales diabéticos trasplantados y en un grupo control no diabético y no trasplantado. Los grupos 2, 4 y 6 fueron tratados con insulina. STZ corresponde con el día de administración de la estreptozotocina. El día del trasplante (Tx) corresponde con el día 0. El número de los grupos corresponde con los descritos en las tablas 3 y 4.

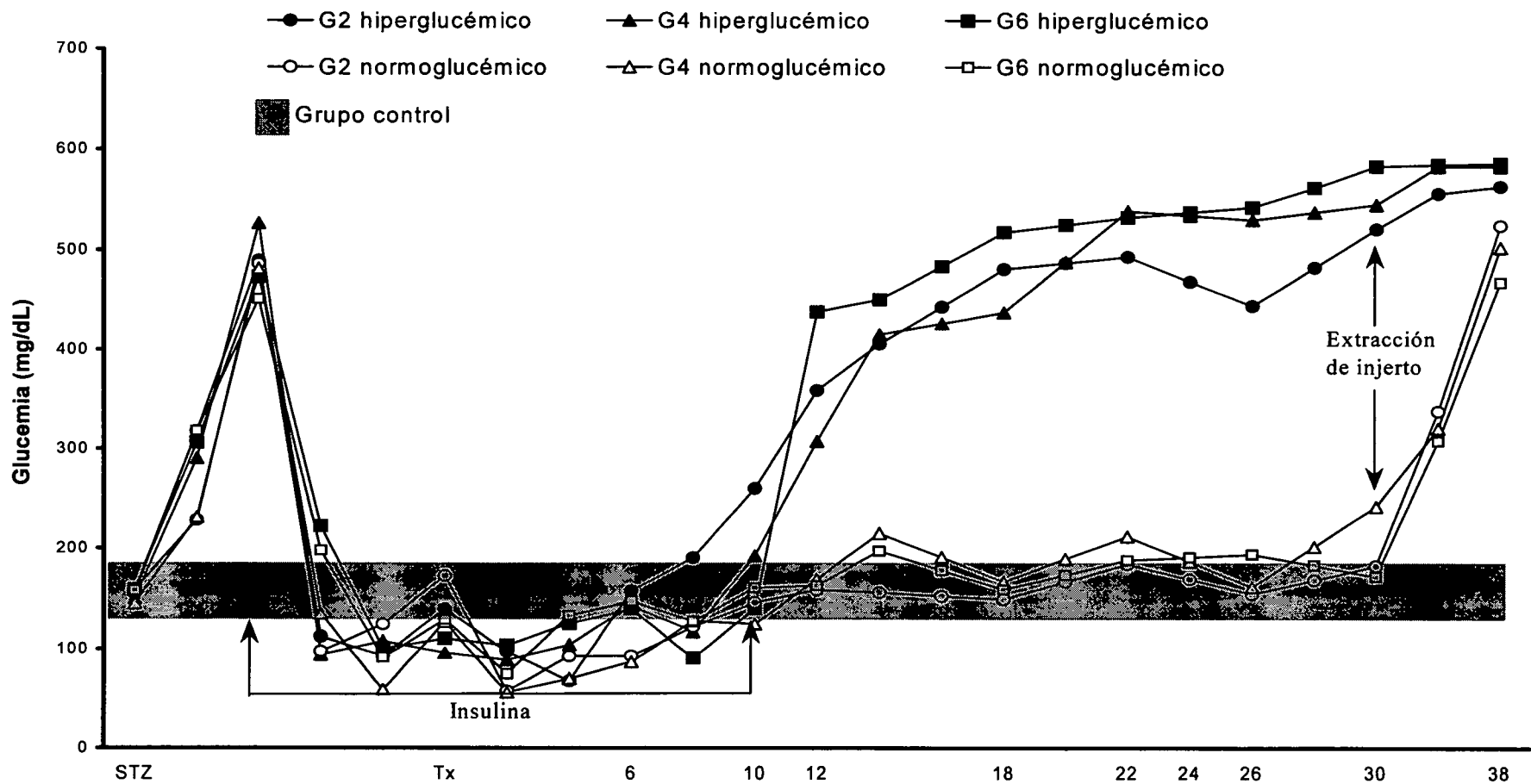


Figura 18. Evolución de la glucemia en los grupos trasplantados y tratados con insulina. STZ: día de inyección de estreptozotocina. Tx: día del trasplante. Cada grupo, que se corresponde con los descritos en las tablas 3 y 4, se ha dividido en normo/hiperglucémico según se obtuviera o no la normoglucemia al final del estudio.

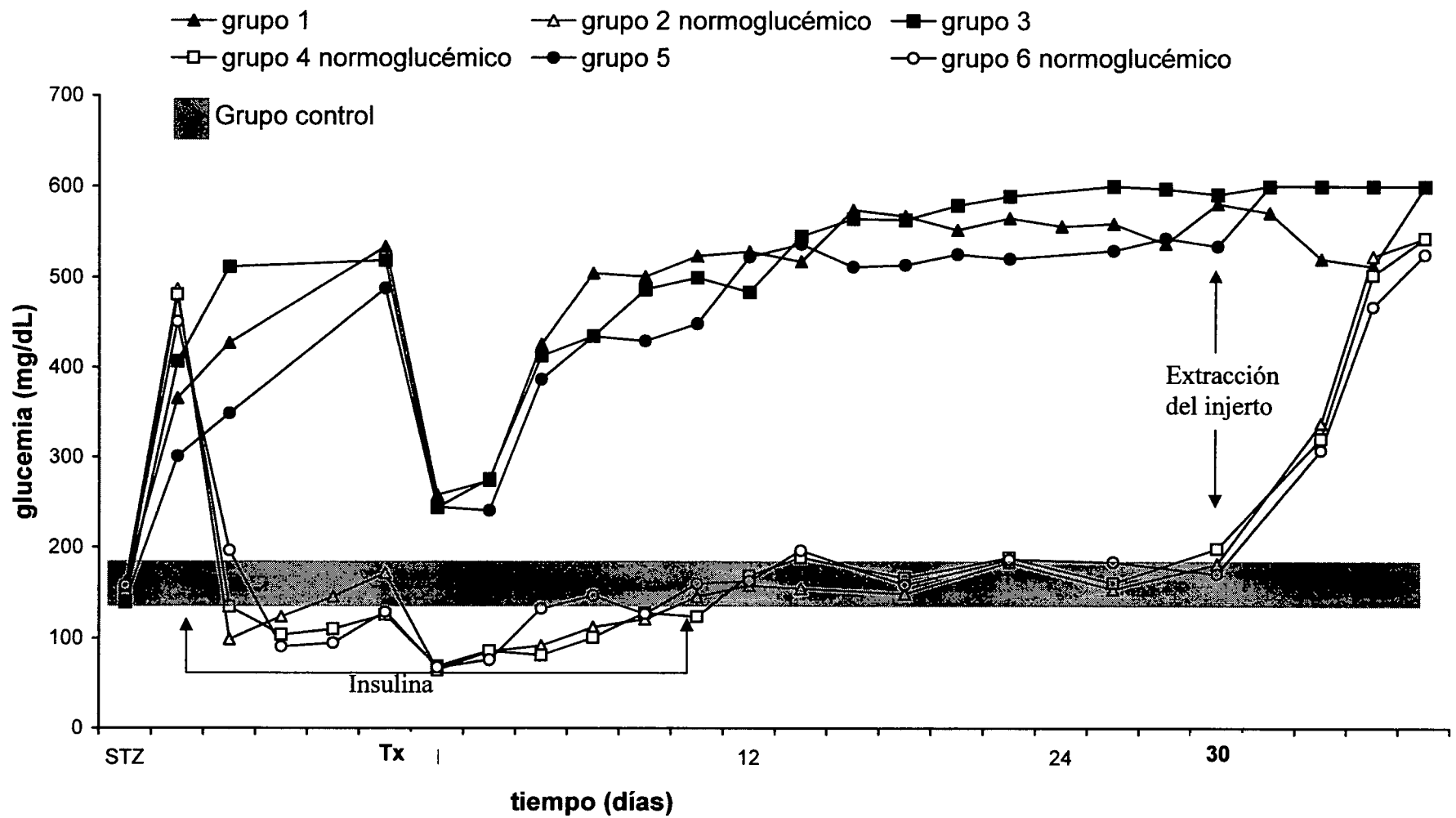


Figura 19. Evolución de la glucemia en los grupos no tratados con insulina y en los animales que recibieron tratamiento con insulina y permanecieron normoglucémicos al final del estudio. STZ corresponde con el día de administración de la estreptozotocina. El día del trasplante (Tx) corresponde con el día 0. El número de los grupos corresponde con los descritos en las tablas 3 y 4.

1.3. Test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa

Al final del período de seguimiento, en el día 30 post-trasplante, se realizó un test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa (TTIPG) en aquellos animales que mantuvieron la normogluceemia (figura 20).

La respuesta fue similar en los animales diabéticos trasplantados que se mantuvieron normogluicémicos y el grupo control. Si se analizan punto por punto las glucemias resultantes del test se obtiene:

- No existieron diferencias entre la respuesta del grupo 2 y la del grupo control.
- Al comparar la respuesta del grupo 4 con la del control, existieron diferencias en las glucemias de los tiempos basal (grupo 4: $206,3 \pm 18,4$; grupo control: $150,3 \pm 9,7$; $p < 0,05$) y 60 minutos (grupo 4: $299,3 \pm 44,3$; grupo control: $166,9 \pm 20,0$; $p < 0,05$).
- Al comparar las respuestas del grupo 6 con la del control, existieron diferencias en los tiempos 90' (grupo 6: $244,7 \pm 25,6$; grupo control $164,0 \pm 15,8$; $p < 0,05$), 120' (grupo 6: $256,5 \pm 32,9$; grupo control: $152,1 \pm 15,1$; $p < 0,05$) y 180 minutos (grupo 6: $210,0 \pm 19,1$; grupo control: $125,0 \pm 15,0$; $p < 0,05$).
- No existieron diferencias en las respuestas de los grupos de animales trasplantados al compararlas entre sí.

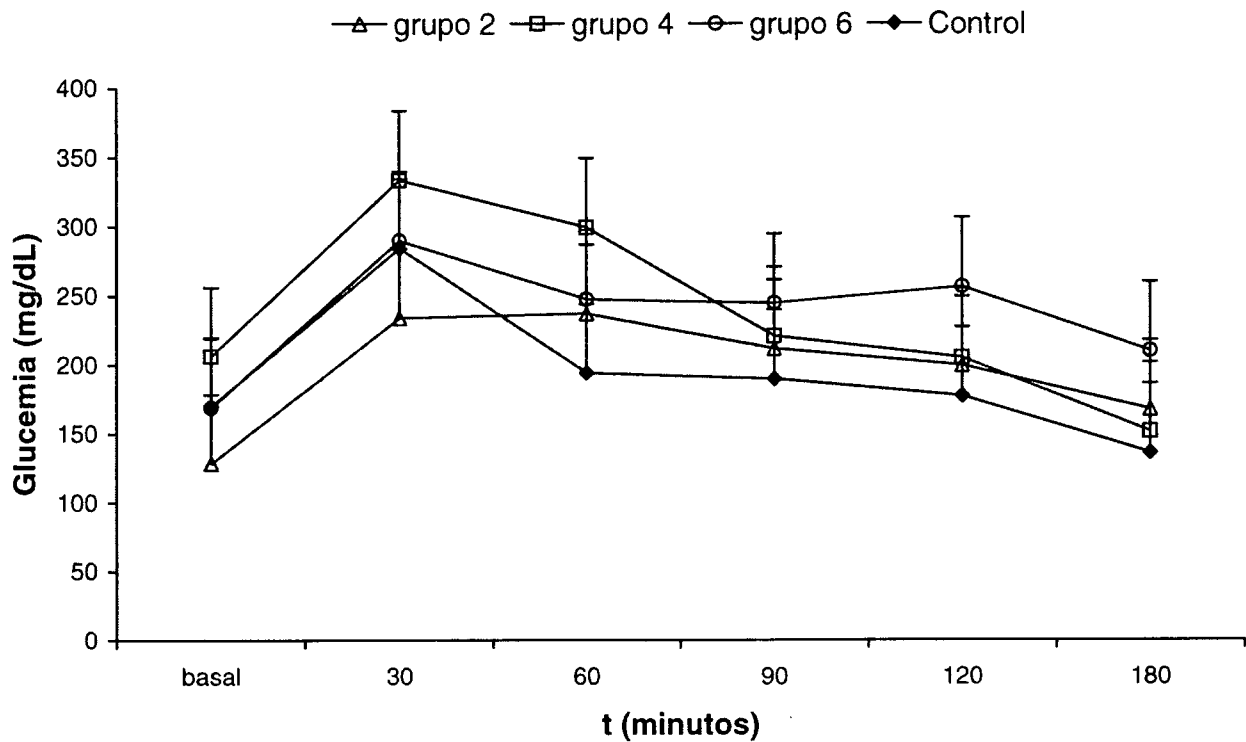


Figura 20. Test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa en los grupos de animales normoglucémicos al finalizar el período de seguimiento y su comparación con la respuesta del grupo control. Los números de los grupos corresponden a los descritos en las tablas 3 y 4.

Cuando se analizaron los resultados mediante el área bajo la curva (ABC) no hubieron diferencias al comparar el grupo 2 ($ABC = 36\,408,7 \pm 2\,830,9$) con el grupo control ($ABC = 30\,756,4 \pm 2\,454,7$). Por el contrario, existieron

diferencias entre los grupos 4 (ABC = 36 408,7 \pm 2 832,9) y 6 (ABC = 47 340,0 \pm 1 741,3) con respecto al grupo control ($p < 0,05$) (Figura 21).

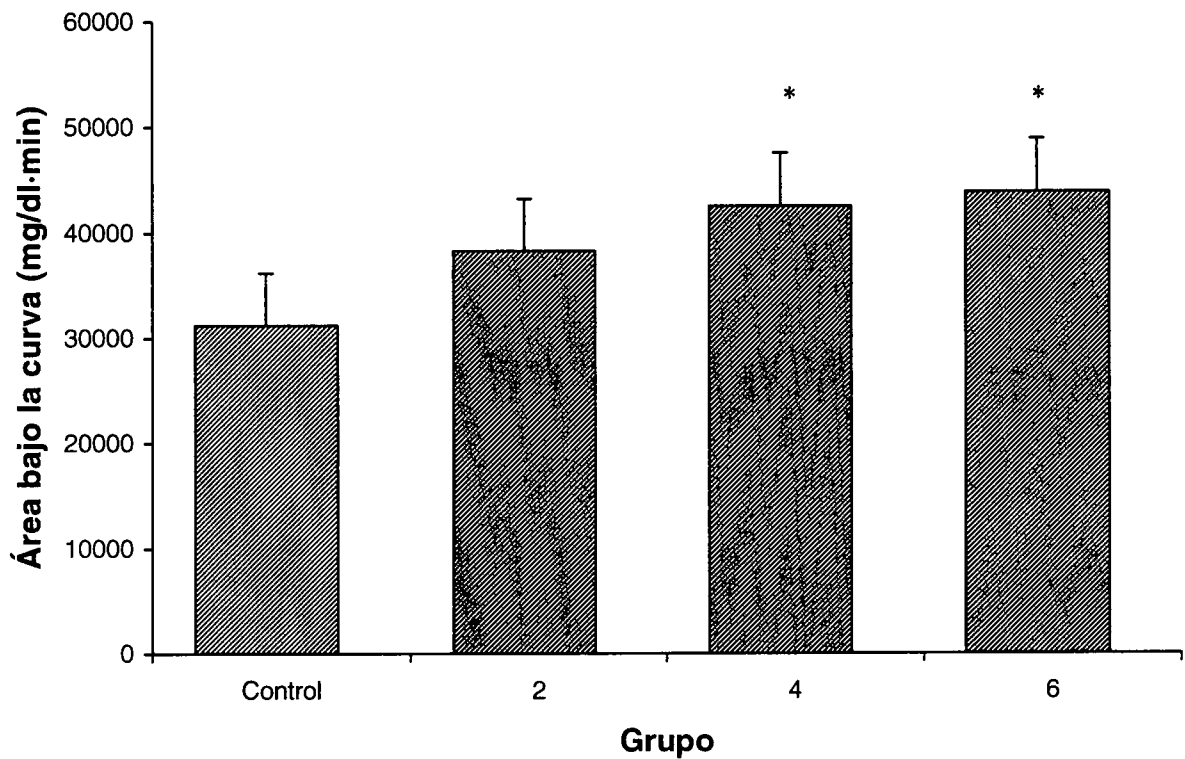


Figura 21. Área bajo la curva del test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa en los grupos de animales normoglucémicos al finalizar el período de seguimiento y su comparación con la respuesta del grupo control. Los números de los grupos corresponden a los descritos en las tablas 3 y 4. * $p < 0,05$ versus el grupo control.

1.4 . Hemoglobina glicosilada

La hemoglobina glicosilada se determinó al inicio del estudio (situación basal) y a los 10 y 30 días post-trasplante en cada uno de los grupos. En el grupo control de animales no diabéticos y no trasplantados la medición se realizó ajustando los tiempos a los de los grupos trasplantados. En los grupos tratados con insulina, la determinación de HbA1c corresponde a los animales que permanecieron normoglucémicos al final del estudio. Los resultados se presentan en la tabla 5.

Grupo	HbA1c basal	HbA1c día 10	HbA1c día 30	D (días 30-10)
Control	2,5 ± 0,3	2,9 ± 0,5	3,3 ± 0,1	0,4 ± 0,4
1	2,4 ± 0,2	6,2 ± 0,7	8,7 ± 0,5	2,5 ± 0,4
2	2,5 ± 0,4	3,2 ± 0,2	2,7 ± 0,2	-0,5 ± 0,3
3	2,6 ± 0,2	5,0 ± 0,7	8,8 ± 1,1	3,8 ± 0,5
4	2,4 ± 0,2	3,2 ± 0,1	3,2 ± 0,2	0,00 ± 0,3
5	2,4 ± 0,4	5,9 ± 0,5	7,9 ± 0,7	2,0 ± 0,5
6	2,7 ± 0,2	3,6 ± 0,2	3,6 ± 0,2	0,1 ± 0,2

Tabla 5. Hemoglobinas glicosiladas. HbA1c basal corresponde al inicio del estudio, antes de someter al animal a ningún procedimiento. HbA1c día 10: día 10 pos-trasplante. HbA1c día 30: día 30 post-trasplante. D (días 30-10): diferencia entre la hemoglobina glicosilada del día 30 y la del día 10 post-trasplante. Los grupos corresponden a los descritos en las tablas 3 y 4.

En los animales trasplantados y no tratados con insulina (grupos 1, 3 y 5) la HbA1c se incrementó ya en el día 10 post-trasplante. Los grupos 1 y 5 mostraron diferencias significativas con respecto a los grupos trasplantados y tratados con insulina (grupos 2, 4 y 6) y al grupo control. Estas diferencias se hacen más acusadas si analizamos la HbA1c en el día 30 post-trasplante, donde los grupos no tratados con insulina mostraron niveles estadísticamente superiores a los de los grupos tratados con insulina. Por el contrario, los animales trasplantados y tratados con insulina presentaron niveles normales de HbA1c, comparables con la del grupo control (Figura 22).

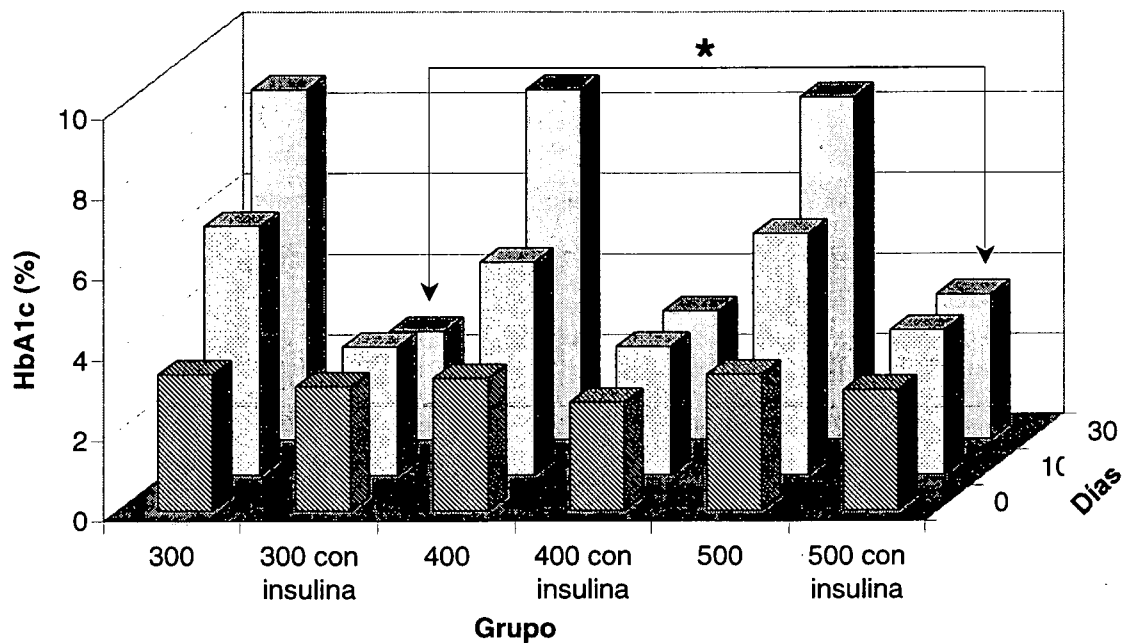


Figura 22. Evolución de la HbA1c en los grupos trasplantados. Los grupos en el eje X corresponden a los mostrados en las tablas 3 y 4. Los grupos tratados con insulina incluyen exclusivamente los que consiguieron la normoglucemia a los 30 días del trasplante. * $p < 0,05$ entre la HbA1c del día 30 después del trasplante en los grupos tratados con insulina y trasplantados con 300 y 500 islotes.

2. CONTENIDO DE INSULINA

El contenido de insulina pancreático fue superior en los animales que consiguieron la normoglucemia al final del estudio con respecto a los ratones hiperglucémicos (ratones normoglucémicos $3.6 \pm 0.8 \mu\text{g/ g}$ de páncreas vs ratones hiperglucémicos $1.4 \pm 0.7 \mu\text{g/ g}$ de páncreas; $p < 0.05$). En cualquier caso fue notablemente inferior al grupo control sano grupo control $99.8 \pm 12.2 \mu\text{g/ g}$ de páncreas).

El contenido de insulina pancreático en los diferentes grupos de animales se representa en la tabla 6.

Grupo	n	Contenido de insulina ($\mu\text{g/ g de páncreas}$)
1	8	1.2 ± 0.2
2 hiperglucémico	4	1.8 ± 0.4
2 normoglucémico	4	3.1 ± 1.9
3	8	1.4 ± 0.3
4 hiperglucémico	5	1.2 ± 0.2
4 normoglucémico	3	4.7 ± 1.2
5	8	2.1 ± 0.3
6 hiperglucémico	4	1.2 ± 0.3
6 normoglucémico	4	3.6 ± 1.2
Control	8	99.8 ± 12.2

Tabla 6. Contenido de insulina pancreático (expresado en $\mu\text{g/ g de páncreas}$) en los grupos experimentales

3. ESTUDIO HISTOLÓGICO

El análisis de los cortes efectuados mostró claras diferencias entre los trasplantes de los animales tratados con insulina normoglucémicos al final del estudio y los injertos de los animales hiperglucémicos. En los primeros se puede visualizar la presencia de células endocrinas localizadas entre la cápsula y el parénquima renal, agrupadas y de contornos homogéneos, con un discreto componente inflamatorio a expensas de células mononucleadas. En los cortes de los animales hiperglucémicos la zona correspondiente a los islotes ha quedado sustituida por áreas de fibrosis, calcificaciones y abundante componente inflamatorio. En las figuras 23 y 24 se pueden comprobar las diferencias existentes entre ambos grupos.



Figura 23. Estudio histológico I. Corte histológico correspondiente a un trasplante con 300 islotes en un animal tratado con insulina en el peritrasplante, que permaneció normoglucémico hasta el final del estudio. **a:** cápsula renal; **b:** células endocrinas; **c:** parénquima renal. (x 1 200)



Figura 24. Estudio histológico de los injertos II. Corte histológico de un trasplante de 300 islotes realizado en un animal no tratado con insulina que permaneció hiperglucémico durante todo el estudio. No se observan células endocrinas. **a:** infiltrado inflamatorio; **b:** áreas de fibrosis y destrucción tisular. **c:** calcificaciones heterotópicas. (x 1 200)

Discusión

Discusión

En el estudio presentado se demuestra cómo la normoglucemia durante el peritrasplante, conseguida mediante tratamiento con insulina, mejora la evolución del trasplante alogénico de islotes de páncreas en un modelo experimental de ratón diabético. Los animales fueron trasplantados en diferentes grupos con masas beta comparables entre sí, obteniéndose la normoglucemia en ratones que recibieron tratamiento insulínico desde el día 6 pre-trasplante al día 10 post-trasplante. Los resultados en cuanto a la hemoglobina glicosilada y al test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa son comparables a un grupo de animales sanos, no diabéticos y no trasplantados. El 95.8% de los animales no tratados con insulina permanecieron hiperglucémicos tras el trasplante y a lo largo de todo el estudio.

1. MODELO EXPERIMENTAL

1.1. Inducción de diabetes

Para completar el estudio de la diabetes autoinmune se han desarrollado modelos animales de diabetes de mediación inmunitaria. El desarrollo de diabetes en animales se ha realizado mediante técnicas diversas, desde la pancreatometomía más antigua a los modelos transgénicos. Es posible establecer una diabetes experimental comparable a la Diabetes tipo 1 de los humanos. En 1976 se describió por primera vez la rata BB, derivada de Wistar, que desarrolla de forma espontánea una diabetes insulino-deficiente y proclive a la cetosis, asociada a características histológicas de insulinitis (Nakhooda AF y cols., 1976). La expresión transgénica de moléculas B7 sobre células beta de roedor produce insulinitis y secundariamente diabetes (Harlan DM y cols., 1994). El ratón NOD (non obese diabetic mice o ratón diabético no obeso) desarrolla de manera espontánea un estado de diabetes tras la destrucción autoinmune selectiva de las células beta del páncreas (Itoh A y cols., 1996).

Otro modelo clásico es el que induce la diabetes a partir de la inyección de estreptozotocina. La estreptozotocina es un potente agente alquilante, altamente tóxico y carcinogénico, con un efecto diabetógeno secundario a su acción selectiva sobre las células beta pancreáticas que produce una necrosis rápida de las mismas (Elsner M y cols., 2000). En este trabajo se ha utilizado estreptozotocina en una sola dosis concentrada. Los trabajos publicados hasta el momento actual parecen estandarizar la dosis de estreptozotocina para conseguir

la inducción de diabetes en un modelo de roedor: 180 mg/kg de peso (Preston AM, 1985). Dosis inferiores pueden inducir diabetes sólo de forma transitoria, con recuperación parcial de las células beta. También fue descrita una variante de este modelo en la que se administran múltiples dosis subdiabetógenas, provocando una insulinitis con el efecto adicional de la replicación de ciertos virus murinos dentro de células beta susceptibles (Like AA y cols., 1976). La heterogeneidad en el tiempo de instauración de la diabetes, la coexistencia con fenómenos de replicación y regeneración y la transitoriedad del proceso según las dosis hacen de éste un modelo menos recomendable.

En el presente estudio se ha utilizado la estreptozotocina a dosis de 180 mg/kg de peso para inducir diabetes, con un aceptable porcentaje de éxito (80 % aproximadamente) comparable con otras series. Al finalizar el período de seguimiento, el análisis del contenido pancreático de insulina en los animales trasplantados corroboró la acción efectiva de la estreptozotocina.

1.2. Lugar de implantación del injerto

La localización ideal del injerto está todavía en discusión. En modelos roedores se han utilizado riñón, hígado, bazo, testículo, cerebro, cavidad peritoneal y omento (Kin T y cols., 2003). Un estudio realizado en ratas Lewis comparando el control glucémico de un grupo de animales trasplantados bajo cápsula renal y otro grupo bajo cápsula esplénica demostró una mejor evolución metabólica en el primero. No está claro si las ventajas obtenidas al trasplantar en

esta localización son inmunológicas o locales (vascularización o inervación) (Weitgasser R y cols., 1996). El trasplante en cápsula renal consigue un hiperinsulinismo derivado de la secreción de insulina a la vena cava, evitando el aclaramiento hepático debido a la secreción vía porta que sucedería en el trasplante esplénico (Jara-Albarrán A y cols., 1995; Jara-Albarrán A y cols., 1997).

En base a estos resultados y a la bibliografía de referencia se eligió para este trabajo el trasplante bajo cápsula renal. Al evitar el contacto directo con un gran vaso se eliminan problemas mecánicos como la trombosis y se reducen reacciones sistémicas severas secundarias al fenómeno inflamatorio. En la cápsula derecha se evitan adherencias del injerto con el hígado que pudieran dañarlo en el momento de la retirada del injerto.

En estudios con animales, los islotes trasplantados intraperitoneo o bajo cápsula renal muestran una respuesta de glucagón intacta, mientras dicha respuesta se encuentra disminuida en los islotes trasplantados en hígado. Estos hallazgos han cuestionado la idoneidad de este último órgano como lugar de implantación. En humanos, los sujetos diabéticos tipo 1 trasplantados mediante el protocolo de Edmonton han mostrado un enlentecimiento de la respuesta del glucagón y epinefrina a la hipoglucemia (Paty BW y cols., 2002). Esto no sucede en los trasplantes pancreáticos, donde la respuesta contrarreguladora está intacta. (Paty BW y cols., 2001) En conclusión, los síntomas de hipoglucemia pueden estar atenuados en diabéticos receptores de un trasplante de islotes, al compararlos con los controles.

1.3. Número de islotes trasplantados

La importancia de la masa beta en el trasplante de islotes de páncreas es un hecho conocido y estudiado. En los modelos animales la masa crítica necesaria para conseguir la normoglucemia en el receptor es variable según la especie. Así por ejemplo en el perro se necesitan aproximadamente 5 000 islotes/kg de peso. (Warnock GL y cols., 1990) En mamíferos de menor tamaño como la rata se requieren unos 1 000 islotes (Beattie GM y cols., 1993). Existen diferencias para el número de islotes según se trate de modelos singénicos o alogénicos. La pérdida de islotes derivada de la reacción autoinmune y el efecto de fármacos inmunosupresores, entre otros, hacen necesario un mayor número de islotes para modelos alogénicos. En un modelo singénico de ratones B6AF1 se ha conseguido la normoglucemia con un trasplante mínimo de 200 islotes. Para modelos alogénicos de roedor, 300 islotes serían insuficientes (Gotoh M y cols., 1988).

En nuestro trabajo se trasplantaron un mínimo de 300 islotes, una cantidad *a priori* escasa para la consecución de la normoglucemia al final del estudio.

1.4. Trasplante alogénico

En este trabajo se ha utilizado un modelo de ratón alogénico como donante y receptor del trasplante. Por tanto los animales que participaron en el experimento

mostraban diferencias genéticas entre ellos, a diferencia del modelo singénico. El trasplante singénico de islotes en ratones C57Bl/6 diabéticos mediante estreptozotocina, consigue la normoglucemia con sólo 100 islotes cuando se utiliza insulina en el peritrasplante (Merino JF y cols., 2000).

El modelo alogénico se aproxima más al trasplante de islotes pancreáticos que se realiza en los seres humanos. En el trasplante alogénico están presentes los factores inmunológicos que pueden producir el fracaso del trasplante. Como consecuencia del trasplante de una masa beta no propia en un receptor diabético se produce un fenómeno de rechazo, con una respuesta inmune específica, y la recurrencia del proceso autoinmune. La respuesta inmune está inicialmente inducida por las células presentadoras de antígeno y seguida de la acción citotóxica de las células T. Un trasplante alogénico conlleva la necesidad de una masa beta mayor para conseguir la normoglucemia en el animal diabético.

En este estudio se realizaron trasplantes de 300, 400 y 500 islotes, pretendiendo hallar la masa beta idónea en animales receptores según recibieran o no tratamiento con insulina en el peritrasplante.

1.5. Inmunosupresión

Existen numerosos estudios experimentales que han demostrado la mejoría de la evolución del trasplante de islotes al modificar la terapia inmunosupresora. En la actualidad los trabajos están centrados en el uso de anticuerpos monoclonales capaces de bloquear los ligandos CD de las células T (Molano RD

y cols., 2001; Ferrari-Lacraz S y cols., 2001), el empleo de nuevos inmunosupresores (Wennberg L y cols., 2001) o la combinación de técnicas de inmunosupresión antes y después del trasplante (Kenyon NS y cols., 1990).

En la mayoría de trasplantes de islotes realizados en humanos se ha incluido la ciclosporina A como fármaco inmunosupresor, combinado con otras drogas (Brendel MD y cols., 2001). La ciclosporina inhibe la citotoxicidad sobre el islote y la secreción de óxido nítrico por los macrófagos (Burkart B y cols., 1992). Se ha observado un efecto de preservación sobre la célula beta frente a los fenómenos de autoinmunidad en la diabetes (Skyler JS y cols., 1992). Estos efectos se traducen en un aumento de la supervivencia del trasplante de islotes, si bien ésta no alcanza los resultados del trasplante singénico (Dibelius A y cols., 1986).

El efecto adverso de la ciclosporina sobre la célula beta se ha demostrado *in vitro* y sobre modelos animales (Stegall MD y cols., 1989). La ciclosporina disminuye la síntesis (Gillison SL y cols., 1989) y la transcripción génica de la insulina (Oetjen E y cols., 2003). Además, el tratamiento con ciclosporina puede alterar levemente el proceso final de revascularización del injerto, habiéndose demostrado una discreta reducción en la densidad capilar funcionante en los animales que reciben la droga durante el post-trasplante inmediato. No modifica la perfusión del injerto una vez que se ha completado el proceso de angiogénesis. (Vajkoczy P y cols., 1999). En un modelo de ratón NOD se ha demostrado que dosis bajas de ciclosporina (5 mg/kg/día) producen una concentración pancreática capaz de disminuir la expresión de ciertos antígenos en el islote (que se unen a anticuerpos frente a células del islote – ICA – o frente a ácido

glutámico decarboxilasa 67 – GAD-67 -) durante varias semanas. Sin embargo sólo dosis mayores (40 mg/kg/día) logran un efecto inmunosupresor duradero con la reducción de parámetros inmunológicos. Estas concentraciones deterioran la secreción de insulina (el Mansour A y cols., 1996).

Otras drogas inmunosupresoras utilizadas en la actualidad en distintos protocolos de trasplante (corticoides, tacrolimus, serolimus y micofenolato-mofetil) han demostrado también un efecto deletéreo en diferentes fases de la síntesis y secreción de insulina (Robertson RP, 2004).

En el presente estudio se ha utilizado ciclosporina en solución oleosa a una dosis estandarizada de 30 mg/kg/día vía subcutánea, el día del trasplante y el primer y segundo día post-trasplante, lo que garantiza la inmunosupresión durante el período de seguimiento post-trasplante (Álvarez Gómez S y cols., 1997). Se asumió que unos adecuados niveles de inmunosupresión conllevan cierto deterioro funcional de la célula beta trasplantada si bien éste es inferior a tacrolimus, sustancia del mismo grupo farmacológico de reciente introducción.

2. PROBLEMÁTICA RELACIONADA CON EL NÚMERO DE DONANTES HUMANOS.

El número de islotes trasplantados es esencial en los resultados esperados con el trasplante de islotes. Existe una masa beta crítica, mayor de lo que se esperaba, necesaria para conseguir la normoglucemia tras el trasplante. El adecuado funcionamiento o, por el contrario, el fallo del injerto depende en gran medida de la cantidad de islotes inicialmente trasplantados (Weir GC y cols., 1990).

El éxito obtenido en los últimos trasplantes de islotes ha actualizado el desequilibrio existente entre la oferta y la demanda de páncreas donantes de cadáver, para ser utilizados en futuros trasplantes (Robertson RP, 2000).

En el ser humano se conoce, a tenor de los últimos resultados en trasplante, que para conseguir un trasplante con éxito que implique una insulín-dependencia, se hacen necesarios de 2 a 4 páncreas donantes y cerca de un millón de islotes (Brendel MD y cols., 2001). En el momento actual se hace imposible conseguir semejante número de islotes para tratar a los pacientes diabéticos (García-Ocaña A y cols., 2001). En USA, la prevalencia de la Diabetes mellitus tipo 1 es del 0,5 % de la población: cerca de un millón de diabéticos tipo 1. Anualmente se diagnostican unos 30 000 nuevos casos de Diabetes tipo 1 (LaPorte R y cols., 1995). A estos potenciales receptores de trasplantes de islotes hay que añadir un considerable número de pacientes con Diabetes mellitus tipo 2 dependiente de insulina que podrían ser candidatos a este tipo de terapia. En este mismo país, el número de donantes/ año es de 5 000 y sólo algunos de ellos pueden ser utilizados como fuente de tejido pancreático

(Hauptman PJ y cols., 1997). Esta problemática se agrava por el hecho de que, en la actualidad, para conseguir un trasplante de islotes pancreáticos con posibilidad de éxito se necesitan de dos a tres páncreas donantes.

España posee la cifra de donantes más alta del mundo (aproximadamente 34 donantes/ millón de habitantes) y se podría disponer de unos 1 400 páncreas por año. Si consideramos útiles sólo los páncreas obtenidos de donantes de menos de 60 años, la cifra se reduce a 900-950 donantes/ año. Incluso si se alcanzara el objetivo de normalizar la glucemia de un diabético tipo 1 con un solo donante, nunca podrá disponerse del adecuado número de donantes para tratar a los 123 000 diabéticos tipo 1 que existen actualmente en nuestro país. Ni siquiera existirían órganos suficientes para tratar a los nuevos pacientes diagnosticados de Diabetes tipo 1 cada año (aproximadamente 4 500 nuevos casos) (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2002).

Analizando los datos anteriores queda clarificado un aspecto: los avances en el trasplante de islotes pueden revolucionar esta alternativa terapéutica pero el principal problema va a seguir siendo la masa beta a trasplantar. Dos objetivos son cruciales para mejorar la función del injerto y obtener la normoglucemia en el receptor:

1. Evitar la pérdida de islotes tras el trasplante.
2. Reducir la cantidad de islotes necesarios para controlar la hiperglucemia.

De este modo se podría optimizar el número de trasplantes a realizar con el limitado número de islotes disponible (Biarnés M y cols., 2002).

La búsqueda de fuentes alternativas de células productoras de insulina como el xenotrasplante, las células madre adultas y/o embrinarias, la “expansión del

islote” a partir de células ductales diferenciadas y la obtención de líneas celulares mediante terapia génica han dado resultados que permanecen todavía en el ámbito experimental (Robertson RP, 2004). En cualquier caso, la necesidad de reducir la masa beta trasplantada se ha convertido en un objetivo primordial dentro de las actuales y futuras técnicas de trasplante para la corrección de la Diabetes mellitus.

En nuestro trabajo, el trasplante alogénico de 300 islotes en un modelo de ratón Swiss diabético tratado con insulina ha conseguido mejores resultados que el obtenido mediante el trasplante de 500 islotes en condiciones de hiperglucemia. Hemos demostrado cómo la normoglucemia conseguida mediante tratamiento con insulina permite reducir el número de islotes necesarios para obtener el éxito en el trasplante alogénico de islotes pancreáticos. En igualdad de condiciones ambientales, sólo los animales que consiguieron un buen control glucémico tras el tratamiento insulínico permanecieron normoglucémicos al final del estudio. Probablemente estos resultados puedan influir en los protocolos de trasplante. Esta tesis demuestra que un estricto control glucémico en los días que preceden y siguen al trasplante alogénico de islotes de páncreas puede mejorar los resultados obtenidos mediante esta técnica empleando un menor número de islotes. Algunos datos han aparecido ya en humanos: un centro ha obtenido un 14.3 % de insulín-independencia en los receptores trasplantados desde un sólo donante, gracias a un ajustado protocolo del paciente en el peritrasplante. Dentro de este protocolo se incluyó el control estricto de la glucemia en el receptor mediante el tratamiento con insulina, que

no se retiró hasta 10.6 meses después del trasplante (Bretzel RG y cols., 1999).

El llamado protocolo de Minnesota incluye los siguientes requisitos:

- Selección de donante y receptor.
- Adecuada preservación del páncreas.
- Adecuado procesamiento de los islotes pancreáticos.
- Cultivo de islotes durante 48h para inactivar/deplecionar las células T antes del trasplante.
- Potente inducción de la inmunosupresión.
- Tratamiento peritrasplante antiinflamatorio.
- Estricto control glucémico en el peritrasplante.
- Tratamiento de mantenimiento sin esteroides ni inhibidores de la calcineurina.

Estos resultados se han confirmado en posteriores trabajos que han mostrado la independencia de la insulina en trasplantes procedentes de un sólo donante con una única infusión de islotes (Markmann JF y cols., 2003).

3. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON INSULINA SOBRE LA EVOLUCIÓN METABÓLICA.

En trabajos previos se ha demostrado que el tratamiento con insulina, manteniendo la normoglucemia, condiciona una mejor evolución del trasplante singénico de islotes pancreáticos. Este efecto beneficioso depende en gran medida del momento en que comienza el tratamiento insulínico y de la duración del mismo. Así por ejemplo, en ratones que fueron tratados de forma exclusiva antes del trasplante sólo se demostró una cierta protección mientras que en aquellos tratados durante 6 días post-trasplante no se objetivaron beneficios en la evolución al compararlos con un grupo de animales trasplantados y no tratados con insulina. Si el tratamiento con insulina se iniciaba el día 10 post-trasplante y se mantenía durante 14 días, los animales permanecían normoglucémicos al final del estudio si bien presentaban una tolerancia anormal a la glucosa. Los mejores resultados se consiguieron cuando el tratamiento con insulina comenzaba antes del trasplante, manteniendo la normoglucemia durante 7 días pre-trasplante y hasta 14 días después del mismo, es decir, incluyendo el período de revascularización del injerto. El día 14 post-trasplante se retiraba la insulina. (Merino JF y cols., 1997).

El efecto beneficioso del control glucémico se ha comprobado también en seres humanos diabéticos que recibieron un trasplante de islotes pancreáticos. Estos pacientes, trasplantados de riñón previamente o de forma simultánea al trasplante de islotes, se incluyeron en un protocolo para mejorar la viabilidad del injerto. Una de las principales características del mismo era el control estricto de

la glucemia en el momento del trasplante. Se confirmó la mayor supervivencia del injerto en estos pacientes, si bien el resto de factores incluidos en este protocolo (cultivo previo de los islotes durante 72 horas, uso de nicotinamida, inmunosupresión con anticuerpos frente a la célula T desde el día -3, pentoxifilina como inhibidor de TNF) dificulta definir exactamente el papel del control glucémico en el resultado obtenido (Bretzel RG y cols., 1999).

El protocolo de Minnesota, ya comentado en el apartado anterior, que incluye un estricto control glucémico en el período peritrasplante, es el primer paso en humanos para reducir el número de islotes trasplantados obteniendo la independencia de la insulina.

Cabe comentar como peculiaridad, que la menor respuesta contrarreguladora que parecen presentar los sujetos diabéticos sometidos a un trasplante de islotes mediante el protocolo de Edmonton obliga a un seguimiento más estrecho, si cabe, de aquellos pacientes que estén recibiendo tratamiento insulínico, por el riesgo de hipoglucemias inadvertidas (Paty BW y cols., 2002).

A tenor de resultados previos en roedores, los animales que participaron en nuestro estudio recibieron tratamiento con insulina durante los días previos al trasplante y hasta el día 10 después del mismo (una media de 16 días en total). De este modo se intentó optimizar el papel que ejerce la insulina en la evolución del trasplante.

En este estudio sólo uno de los animales trasplantados con 500 islotes y no tratados con insulina consiguió la normoglucemia al final del seguimiento. El resto de animales trasplantados con 500 islotes y todos los trasplantados con 300

y 400 islotes, que no recibieron tratamiento con insulina y permanecieron hiperglucémicos en los días previos al trasplante, mantuvieron la diabetes al final del estudio. En los animales trasplantados y tratados con insulina se consiguió que el 50 % de los ratones trasplantados con 300 y 500 islotes y el 37,5 % de los trasplantados con 400 islotes permanecieran normoglucémicos al final del período de seguimiento. Estos resultados reafirman los comentados previamente y obligan a mantener un estricto control glucémico durante el peritrasplante de islotes pancreáticos.

4. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON INSULINA SOBRE EL PROCESO DE REVASCULARIZACIÓN DEL INJERTO

Los islotes trasplantados carecen de vascularización en los días que siguen al trasplante y este proceso no comienza hasta el 2º-4º día post-trasplante, completándose sobre el día 10 (Andersson A y cols., 1989). Numerosos trabajos demuestran que la hiperglucemia reduce el flujo sanguíneo y el aporte de oxígeno a los islotes (Jansson L y cols., (b) 1989; Sandler S y cols., 1987) Este efecto ha sido, sin embargo, cuestionado por otros autores (Mendola JF y cols., 1994). Las necesidades de oxígeno del islote aumentan en un ambiente hiperglucémico y no pueden completarse por la falta de vascularización. La presión parcial de oxígeno en los islotes trasplantados es menor que en el páncreas incluso hasta el día 30 post-trasplante, pero aún se reduce más si los islotes permanecen en un ambiente hiperglucémico (Carlsson PO y cols., 1998). La corrección de la hiperglucemia mediante el tratamiento con insulina conseguiría mejorar la revascularización del injerto evitando las pérdidas de islotes trasplantados secundarias a la necrosis por hipoxia.

Los estudios sobre angiogénesis y perfusión de la masa beta trasplantada se han realizado en general sobre modelos singénicos (Menger MD y cols., 1992; Vajkoczy P y cols., 1995).

En el trasplante alogénico se ha demostrado que la microcirculación del órgano trasplantado es la primera localización donde se inicia el proceso de rechazo (Heemann UW y cols., 1993). La posibilidad de que la reacción inmune modifique el tiempo de revascularización del injerto se desconoce.

En nuestro estudio se mantuvo el tratamiento con insulina hasta el décimo día post-trasplante. Este tiempo sería suficiente para garantizar una correcta revascularización del injerto en un ambiente glucémico adecuado, suponiendo que no existan diferencias con el modelo singénico. La masa beta trasplantada correctamente revascularizada es capaz de responder de forma adecuada a las oscilaciones glucémicas que presentaron los animales.

5. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON INSULINA SOBRE LA CÉLULA BETA TRASPLANTADA.

La hiperglucemia modifica la respuesta normal de la célula beta en humanos. La infusión de altas concentraciones de glucosa de forma aguda condiciona un defecto en el sensor de la glucosa y un deterioro de la respuesta insulínica incluso en sujetos considerados sanos (Meyer J y cols., 2002). La inhibición de la primera fase de la secreción insulínica se ha demostrado incluso con hiperglucemias moderadas. La segunda fase de la secreción de insulina aumenta de modo lineal con la hiperglucemia (Toschi E y cols., 2002). Alteraciones similares se habían descrito previamente en sujetos diabéticos, donde la hiperglucemia ejerce además una insulín-resistencia (Vuorinen-Markola H y cols., 1992). La acción de la hiperglucemia afecta de modo similar a la célula beta trasplantada.

El efecto deletéreo de la hiperglucemia sobre la masa beta trasplantada se ha demostrado en un modelo de ratón C57BL/6 singénico. En dicho estudio se demostró que la masa celular beta de los islotes trasplantados se incrementaba en aquellos animales que recibieron tratamiento con insulina a partir del momento en el que se retiraba la misma. La masa beta posee la capacidad de modificarse, según las necesidades metabólicas, para mantener la normoglucemia. Este efecto se ha demostrado en roedores sanos tras la infusión de glucosa, en animales sometidos a pancreatectomía parcial y en islotes trasplantados (Montana E y cols., 1994; Merino JF y cols., 2000). La hiperglucemia produce una reducción

de la masa beta trasplantada que puede recuperarse tras un nuevo trasplante que incremente el número de islotes y mantenga la normoglucemia o una discreta hiper glucemia (Nácher V y cols., 1998).

En otro estudio con un modelo singénico de trasplante sobre ratones diabéticos se ha demostrado que, incluso realizando el trasplante en condiciones óptimas, más de la mitad de la masa beta trasplantada se pierde en los primeros días post-trasplante. Esta muerte de células beta se produce por fenómenos de necrosis y apoptosis. La muerte celular por apoptosis en los días iniciales post-trasplante fue independiente de la normoglucemia conseguida mediante tratamiento con insulina, de tal modo que no hubo diferencias entre los animales tratados y los no tratados. En los animales que fueron tratados, los implantes de insulina se retiraron el día 10 post-trasplante, tras objetivarse la normoglucemia en los días previos y posteriores al mismo. En el día 30 post-trasplante se demostró que los animales que permanecieron hiper glucémicos mantenían un índice de apoptosis elevado, mientras que en los ratones que permanecieron normoglucémicos se había normalizado esta muerte celular por apoptosis.

Más recientemente y sobre modelos alogénicos de ratón (NOD y BALB/c), se ha demostrado el deterioro de la función del injerto en condiciones de hiper glucemia. La prevención de la respuesta inmune, utilizando bloqueadores de CD28:B7 y CD40L:CD40 no fue suficiente para revertir la diabetes en condiciones de hiper glucemia severa (Makhlouf L y cols., 2003).

Estos resultados parecen aclarar el papel de los niveles glucémicos sobre la masa beta, dejando de lado el posible efecto *per se* del tratamiento con insulina. La toxicidad de la hiper glucemia se ha comprobado en fases tan precoces como

el tercer día post-trasplante, generándose pérdidas de hasta el 60 % de la masa trasplantada, por necrosis y apoptosis.

El aumento de los fenómenos de apoptosis y la reducción de la masa beta trasplantada también se presenta con la exposición de los islotes a una hiperglucemia crónica (Biarnes M y cols., 2002).

La corrección de la hiperglucemia mejora la sensibilidad a la insulina (Rossetti L y cols., 1989) y reduce la pérdida por apoptosis de la célula beta trasplantada, (Biarnes M y cols., 2002), mejorando la evolución del trasplante de islotes. La apoptosis inducida por la hiperglucemia se ha demostrado también en varios modelos de Diabetes tipo 2 (Federici M y cols., 2001; Laybutt DR y cols., 2002; Maedler K y cols., 2002).

Existen diferentes estudios que demuestran la necesidad de menores requerimientos de masa beta para mantener la situación de normoglucemia que para corregir la hiperglucemia ya existente. Así, en modelos experimentales con trasplantes singénicos se obtienen mejores resultados al trasplantar un determinado número de islotes y realizar a los 14 días una pancreatectomía casi total que si se realiza en primer lugar la pancreatectomía para trasplantar el mismo número de islotes a los 14 días de la misma (normoglucemia al final del estudio de 100 % vs 83 %) (Montana E y cols., 1994).

Se ha descrito cierta recuperación de la masa beta endógena al tratar con insulina a roedores diabéticos que recibieron un trasplante de islotes pancreáticos (Hamamoto Y y cols., 2001). No obstante, esta recuperación es insuficiente para mantener la normoglucemia en animales diabéticos una vez se retira el tratamiento insulínico.

El contenido de insulina pancreático al final de nuestro estudio no mostró diferencias significativas entre el grupo tratado y no tratado con insulina subcutánea, aunque fue superior en el grupo tratado, lo que podría confirmar cierto efecto “regenerador” del tratamiento con insulina sobre la célula beta endógena. El contenido de insulina fue, en cualquier caso, claramente inferior al del grupo control. La hiper glucemia reapareció en todos los animales trasplantados una vez se retiró el injerto, lo que descarta la regeneración pancreática endógena como responsable de la normogluccemia final.

6. OTROS FACTORES QUE MODIFICAN LA EVOLUCIÓN DEL TRASPLANTE DE ISLOTES

En el fallo del trasplante no intervienen únicamente factores inmunológicos. El fracaso del injerto se ha presentado también en el autotrasplante de islotes (Alejandro R y cols., 1986), lo que sugiere la existencia de otros procesos que condicionan el resultado final del trasplante.

Los islotes trasplantados son especialmente vulnerables en los primeros días después del trasplante (Davalli AM y cols., 1996). Existen diferentes factores que pueden deteriorar la evolución en este momento crítico: problemas técnicos secundarios al proceso de trasplante (Kaufman DB y cols., 1988), la reacción inflamatoria en la localización del injerto, que puede agravarse por el deterioro de los islotes durante el aislamiento (Rosenberg L y cols., 1999), una masa beta insuficiente (Montana E y cols., 1993), la hipoxia de los islotes (Dionea KE y cols., 1993), la hiperglucemia mantenida en el receptor, la ausencia de factores del páncreas exocrino, cuya función es todavía desconocida y que podrían aumentar la supervivencia del islote trasplantado (Ilieva A y cols., 1999).

6.1. Problemas derivados de la técnica de trasplante

En estadios iniciales del post-trasplante de islotes vía porta se han demostrado efectos adversos relacionados con la contaminación exocrina de los islotes, como la hipertensión portal, el infarto hepático e incluso la muerte del

receptor. En la actualidad estas complicaciones constituyen un hecho excepcional (Mehigan DG y cols., 1980; Froberg MK y cols., 1997). La contaminación exocrina de los islotes deteriora, además, el proceso de vascularización del injerto (Heuser M y cols., 2000).

La implantación del injerto bajo la cápsula renal evita el riesgo de trombosis o hipertensión de la vena porta, aunque no la pérdida de islotes como consecuencia del propio proceso de trasplante. La técnica de aislamiento empleada en este trabajo, así como la pesca manual de islotes realizada de forma repetida, garantiza aceptables condiciones de pureza de los islotes trasplantados, minimizando los efectos de la contaminación exocrina.

6.2. Efecto inflamatorio sobre el injerto

6.2.1. Reacción inflamatoria inmediata

En diferentes modelos de trasplante de islotes se ha demostrado una reacción inflamatoria inespecífica en la que los macrófagos y el óxido nítrico actúan como mediadores y participan diversas citocinas (Stevens R y cols., 1996; Bottino R y cols., 1998). Los islotes trasplantados son considerados un cuerpo extraño por el organismo del receptor y se genera un fenómeno inmune casi de forma inmediata. En un modelo de trasplante porcino intraportal se ha observado la adhesión de plaquetas a la superficie de los islotes con un descenso en los niveles

de plaquetas circulantes, la secreción de β -tromboglobulina y la regulación de P-selectina, lo que indica activación plaquetaria. Se forma una pseudocápsula de fibrina alrededor del injerto. Tras la activación plaquetaria se ponen en marcha las células polimorfonucleadas y los monocitos, se activan la cascada de coagulación (a través de la vía intrínseca) y el complemento, con una elevación sérica de C3a y C5b-9. La activación del complemento estimula la secreción de citocinas a partir de granulocitos y monocitos y produce la afluencia de estas células en el lugar de implantación (Baldwin WM y cols., 1995). Estos efectos conducen a una rápida liberación de insulina. En este proceso se ha implicado a mediadores de la activación plaquetaria como el Ca^{2+} , ATP y ADP que son reconocidos estimuladores de la secreción insulínica, y al efecto producido por el complemento. A los 15-30 minutos del trasplante ya puede observarse la infiltración de células CD11b y la condensación de los núcleos de algunas células beta trasplantadas. Los neutrófilos y monocitos liberan enzimas y radicales de efecto tóxico para el islote (Rabinovitch A y cols., 1996).

En el trasplante intraportal, la reacción inflamatoria producida cuando los islotes contactan con la sangre del receptor tiene un efecto deletéreo para el islote, con un potente efecto inflamatorio inicial seguido de la presentación del antígeno y, en una fase más tardía, la reacción inmune celular reforzada y acelerada. La utilización de heparina y el inhibidor de complemento sCR-1 (complement inhibitor soluble complement receptor 1) parece inhibir la cascada de coagulación y la activación del complemento, preservando en parte la morfología del islote.

Un estudio secuencial de la histología de los injertos en ratones ha mostrado un grado similar de infiltrado monocítico en los trasplantes alogénico y singénico durante los primeros cuatro días post-trasplante. A partir del cuarto día, la respuesta inmune se hace más acusada en los aloinjertos. Se concluye afirmando que la reacción inflamatoria inespecífica tiene lugar en el post-trasplante inmediato, mientras que el fenómeno de rechazo actuaría más tardíamente (Steiniger B y cols., 1990).

El diseño de estrategias que eviten la reacción inmunitaria post-trasplante inmediato puede tener su importancia en la mejoría de los resultados del trasplante de islotes pancreáticos (Bennet W y cols., 1999). Así por ejemplo el cultivo previo al trasplante de los islotes podría aumentar la viabilidad de los islotes al reducirse el fenómeno inflamatorio inmediato (Johansson U y cols., 2003).

Utilizando la cápsula renal como localización del implante, el contacto directo de los islotes con la sangre del receptor es mínimo, reduciéndose en cierta medida algunos de los efectos sistémicos comentados previamente.

6.2.2. Rechazo del injerto

Los mecanismos que rodean el rechazo agudo del aloinjerto son complejos, y el papel exacto de las subpoblaciones de células T que participan no está todavía aclarado. Varios estudios han demostrado que las células CD4 son claves en la inducción del rechazo, mientras que otros han identificado la

activación de CD8 y células T citotóxicas, por un mecanismo CD4 dependiente, como efectoras del fenómeno de rechazo de aloinjertos incompatibles MHC clase I y II (Gill RG y cols., 1989; May BM y cols., 1985).

La ausencia de marcadores clínicos de rechazo agudo hace difícil reconocer este fenómeno e intervenir sobre él, modificando el régimen inmunosupresor (Pileggi A y cols., 2001). La hiperglucemia y el aumento de los requerimientos de insulina podrían ser indicadores de rechazo pero su inespecificidad los hace poco útiles. Mediante PCR se ha demostrado que el aumento en la transcripción de citocinas como IL-2 e IFN- γ intrainjerto se correlaciona perfectamente con la intensidad de la infiltración leucocitaria y el grado de destrucción histológica de los islotes. Este proceso es más evidente en el día 8 post-trasplante, confirmando su acción posterior a la reacción inflamatoria inicial. La disminución del mRNA de preproinsulina en el aloinjerto podría ser otro parámetro indicador del rechazo (O'Connell PJ y cols., 1993).

Sobre un modelo de primate, se ha demostrado que la expresión génica de linfocitos citotóxicos en sangre periférica se correlaciona con la disminución en la secreción de péptido C, prediciendo el rechazo del aloinjerto de islotes (Han D y cols., 2002).

6.2.3. Importancia de la inmunogenicidad sobre la respuesta metabólica

La inmunogenicidad de los islotes trasplantados condiciona el ataque de

células inmunocompetentes y mediadores inflamatorios. Estos procesos contribuyen a la reducción del número de islotes tras el trasplante. En modelos experimentales se han practicado diferentes estrategias para disminuir el efecto inmunógeno del trasplante: el cultivo a 24° C durante 7 días, la irradiación ultravioleta B, la microencapsulación de islotes y las células beta manipuladas mediante transferencia génica (bcl-2, adenovirus E3, catalasa, HSP70) son algunas de ellas (Benhamou PY y cols., 1998).

La masa beta trasplantada tiene una destacada importancia sobre la inmunogenicidad. Sobre modelos de roedores diabéticos se ha demostrado que un menor número de islotes trasplantados condiciona una menor respuesta inmune, reduciéndose la posibilidad de un rechazo agudo del injerto. Se ha postulado además, que si los islotes proceden de donantes diferentes se obtienen mejores resultados, como consecuencia de una reacción inmune atenuada (Gotoh M y cols., 1988; Kanai T y cols., 1989). Lacy y cols. demostraron que 50 islotes de rata trasplantados bajo cápsula renal de ratones diabéticos presentaban mayor supervivencia que 100-300 islotes (Lacy PE. y cols., 1990). Más recientemente, y también sobre un modelo de ratón diabético, se comparó el efecto de trasplantar 200 islotes bajo cápsula renal manteniendo los 200 islotes hasta el final del seguimiento *versus* 200 islotes con la retirada de 150 islotes una vez se restablecía la normoglucemia post-trasplante. Al final del estudio se verificó la mayor supervivencia de los 50 islotes remanentes en comparación con la de los trasplantes de 200 islotes (Ohzato H y cols., 1993).

En este trabajo, si comparamos los grupos de animales trasplantados y tratados con insulina, se verificó que:

- Los grupos de 300 y 500 islotes normalizaron la glucemia en el mismo número de animales,
- Analizando la prueba de sobrecarga intraperitoneal con glucosa, el grupo de 300 islotes obtuvo la mejor respuesta, no encontrándose diferencias con el grupo control. Los animales trasplantados con 400 y 500 islotes mostraron diferencias significativas con los controles al analizar diferentes puntos de la curva. Además, en el grupo de 500 islotes, el área bajo la curva mostró diferencias con el grupo control, no así los otros 2 grupos de 300 y 400 islotes.
- El grupo de 500 islotes mostró también mayores niveles de HbA1c que el grupo de 300.

Esta peor respuesta de los animales trasplantados con mayor número de islotes confirma las teóricas ventajas del trasplante a partir de varios donantes utilizando un menor número de islotes. Probablemente el trasplante de una menor masa beta, suficiente para conseguir la normoglucemia, condiciona una menor pérdida de islotes como consecuencia de una respuesta inmunógena reducida, y conlleva una mayor supervivencia del injerto.

6.3. Hipoxia

In vivo los islotes están ricamente vascularizados. Tras su aislamiento

mediante digestión con colagenasa, la difusión de oxígeno y nutrientes depende de la periferia del islote, ya sea medio de cultivo o tejido. Inmediatamente después del trasplante, esta función la ocupan los pequeños capilares que rodean al injerto y, aunque comienza el proceso de angiogénesis, éste no se completa hasta los días 7-10 post-trasplante. Este fenómeno de hipoxia tiene una gran importancia sobre la supervivencia de los islotes y un efecto inhibitorio sobre la secreción de insulina. Los islotes de mayor tamaño desarrollan áreas de necrosis más extensas en la zona central, que reducen el umbral de secreción de insulina frente a la hipoxia, aunque inicialmente pueda ser compensado por las células beta de la periferia del islote (Dionea KE y cols., 1993). El trasplante de islotes de ratón con un tamaño inferior a 250 μm por islote limita el proceso de necrosis central.

Por otro lado, los islotes sometidos a una mayor concentración de oxígeno – hiperoxia – muestran mayor supervivencia y se consiguen la normoglucemia con trasplantes con menor masa beta (Hughes SJ y cols., 2003).

El trasplante de una menor cantidad de tejido beta reduce la hipoxia de los islotes (Sayegh MH y cols., 2000). Esto sería una razón más para explicar los mejores resultados obtenidos en nuestro estudio al trasplantar 300 islotes frente al trasplante de 500 islotes.

La biosíntesis de insulina depende del metabolismo oxidativo de la glucosa, muy sensible a la hipoxia. El consumo de oxígeno por las células beta próximas a los capilares puede incrementarse en situaciones de hiperglucemia

produciendo una hipoxia severa en los islotes del centro del injerto (Davalli AM y cols., 1996).

El tratamiento con insulina, evitando la hiperglucemia, reduce la hipoxia de los islotes y contribuye a la mayor supervivencia del injerto.

En resumen, en ratones alogénicos mantenidos normoglucémicos en el peritrasplante mediante tratamiento con insulina, se consigue la normoglucemia con el trasplante de un número de islotes claramente insuficiente si los animales permanecen hiperglucémicos. Los resultados metabólicos obtenidos con la determinación de HbA1c y el test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa muestran una mejor evolución del grupo tratado con insulina y trasplantado con menos islotes. Según diversos estudios esto podría deberse a una menor inmunogenicidad del injerto.

Conclusiones

Conclusiones

Las conclusiones derivadas del presente estudio son:

1. El *pronóstico* del trasplante alogénico de islotes de páncreas (expresado como la corrección de la hiper glucemia al final del estudio), en ratones diabéticos tras estreptozotocina, mejoró cuando los islotes se trasplantaron en ratones mantenidos normoglucémicos desde el día 6 pretrasplante hasta el día 10 postrasplante con tratamiento insulínico.
2. La normoglucemia en el peritrasplante mantenida con tratamiento insulínico, permitió reducir el *número de islotes* necesarios para conseguir la normoglucemia mantenida en un modelo alogénico de trasplante de islotes.
3. La *función beta del injerto*, determinada mediante el test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa, en los animales que finalizaron el estudio en situación de normoglucemia mostró mejores resultados cuando se trasplantó un menor número de islotes, es decir, 300 islotes frente a 500.
4. La *evolución metabólica a largo plazo*, medida mediante la determinación de HbA1c, mostró mejores resultados cuando se trasplantó un menor número de islotes, es decir, 300 islotes frente a 500.

5. El mejor control glucémico y la mejor función beta en los animales mantenidos normoglucémicos en el peritrasplante y trasplantados con *menor número de islotes*, hace pensar en factores como una menor inmunogenicidad que puedan influir en los resultados.

6. El *contenido de insulina pancreático* en los animales trasplantados y tratados con insulina fue claramente inferior al grupo control e insuficiente para conseguir niveles normales de glucemia al final del estudio.

Comunicaciones a Congresos y Publicaciones

Comunicaciones a Congresos y Publicaciones

- “Diabetes mellitus experimental y aislamiento de islotes de páncreas en un modelo animal”. Pérez G, Merino JF, Ferrer JC, Herrera C, Piñón F. XIII Congreso de la Sociedad Valenciana de Endocrinología, Diabetes y Nutrición. Valencia. Noviembre de 2001.
- “El tratamiento con insulina mejora la evolución del trasplante alogénico de islotes de páncreas”. Ferrer JC, Merino JF, Pérez G, Herrera C, Piñón F. XIII Congreso de la Sociedad Valenciana de Endocrinología, Diabetes y Nutrición. Valencia. Noviembre de 2001.

Comunicación ganadora del premio extraordinario de la Sociedad Valenciana de Endocrinología, Diabetes y Nutrición.

- “La normoglucemia en los días que preceden y siguen al trasplante mejora la evolución del trasplante alogénico de islotes pancreáticos”. Ferrer JC, Merino JF, Pérez G, Herrera C, Piñón F. XVI Congreso de la Sociedad Española de Diabetes. Cádiz. Marzo de 2002.
- “La normoglucemia en los días que preceden y siguen al trasplante reduce el número de islotes necesario para conseguir la normoglucemia tras el trasplante alogénico de islotes de páncreas en el ratón diabético”. Ferrer JC, Pérez G, Herrera C, Ponce JL, Piñón F, Merino JF. XV Edición de la Reunión Nacional de la Asociación Española de Cirujanos. Valencia. Octubre de 2003.
- “Insulin treatment allows to reduce the number of islets in allogeneic pancreatic islet transplantation”. Ferrer JC, Merino JF, Pérez-Bermejo G, Herrera C, Piñón F. Cell Transplant 2003, 12: 849-57.

- “Efecto de la hiperglucemia y su corrección sobre la célula beta trasplantada”. JC Ferrer García, JF Merino Torres, A Herrera Ballester, F Piñón Sellés. Av Diabetol 2004, 20 (3). En prensa.

Referencias bibliográficas

Referencias bibliográficas

1. Ahren B, Taborsky GJ Jr, Porte D Jr. Neuropeptidergic versus cholinergic and adrenergic regulation of islet hormone secretion. *Diabetologia* 1986, 29: 827-36.
2. Ahren B, Ostenson CG, Efendic S. Other islet peptides. En Samols E (eds). *The Endocrine Pancreas*, New York, Raven Press, 1991, pp 153-73.
3. Alberti KG, Christensen NJ, Christensen SE, Hansen AP, Iversen J, Lundbaek K, et al. *Lancet* 1973, 2: 1299-301.
4. Alejandro R, Cutfield RG, Shienvold FL, Polonsky KS, et al. Natural history of intrahepatic canine islet cells autografts. *J Clin Invest* 1986, 78: 1339-48.
5. Alparicio NJ, Puchulu FE, Gadliardino JJ, et al. Circadian variation of the blood glucose, plasma insulin, and human growth hormone levels in response to an oral glucose load in normal subjects. *Diabetes* 1974, 23: 132.
6. Álvarez Gómez S, Soto Montenegro ML, Martínez Valenzuela B, Arranz Martín A, Martín-Scapa MC, Jara Albarrán A. Reversión de la diabetes mediante el alotrasplante de islotes previo cultivo en RPMI 7-8 días frente a 1-2 días. *Endocrinología* 1997, 44 (4): 119-21.
7. American Diabetes Association. Economic consequences of diabetes mellitus in the US in 1997. *Diabetes Care* 1998, 31: 296-309.

8. Amos AF, McCarthy D, Zimmet P. The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010. *Diabetic Med* 1997, 14 (suppl 15): S1-S85.
9. Anderson WF. Human gene therapy. *Nature* 1998, 392: 25-30.
10. Andersson A, Eriksson U, Petersson B, Reibring L, Swenne I. Failure of successful intraesplenic transplantation of islets from lean mice to cure obese-hyperglycemic mice, despite islet growth. *Diabetologia* 1981, 20: 237-41.
11. Andersson A, Korsgren O, Jansson L. Intraportally transplanted pancreatic islets revascularized from hepatic arterial system. *Diabetes* 1989, 38 (suppl 1): 192-5S.
12. Andersson A, Jansson L, Sandler K, Korsgren O, Sundler F. Cell biology of the transplanted pancreatic islet: impact of hyperglycemia. En Flatt PR and Lenzen S (eds). *Insulin secretion and pancreatic b-cell research*. Ed. Smith-Gordon. UK 1994: 605-11.
13. Ashcroft FM, Rorsman P. Electrophysiology of the pancreatic β -cell. *Prog Biophys Molec Biol* 1989, 54: 87-143.
14. Baldwin WM 3rd, Pruitt SK, Brauer RB, Daha MR, Sanfilippo F. Complement in organ transplantation: contributions to inflammation, injury and rejection. *Transplantation* 1995, 59: 797-808.
15. Ballinger WF, Lacy PE. Transplantation of intact pancreatic islets in rats. *Surgery* 1972, 72: 175-86.
16. Barker CF, Billingham RE. Immunologically privileged sites. *Adv Immunol* 1977, 25: 1-54.

17. Bartlett RJ, Secore SL, Denis M, et al. Toward the biologic release of human insulin from skeletal muscle. *Transplant Proc* 1997, 29: 2199-200.
18. Beattie GM, Hayek A. Islet cell mass and the longevity of islets grafts in diabetic rats. *Cell Trasplant* 1993, 2: 119-22.
19. Beck P, Daughaday WH. Human placental lactogen: Studies of its acute metabolic effects and disposition in normal man. *J Clin* 1967, 46: 103.
20. Bell GI, Santerre RF, Mullerbach GT. Hamster preproglucagon contains the séquense of glucagon and two related peptides. *Nature* 1983, 302 (5910): 716-18.
21. Benhamou PY, Moriscot C, Badet L, Halimi S. Strategies for graft immunomodulation in islet transplantation. *Diabetes Metab* 1998, 24 (3): 215-24.
22. Bennet W, Sundberg B, Groth CG, Brendel MD, et al. Incompatibility between human blood and isoltaded islets of Langerhans. *Diabetes* 1999, 48: 1907-14.
23. Bennet W, sundberg B, Lundgren T, et al. Damage to porcine islets of Langerhans after exposure to human blood in vitro, or after intraportal transplantation to cynomologus monkeys: protective effects of sCR1 and heparin. *Transplantation* 2000, 69: 711-9.
24. Biarnés M, Montolio M, Nácher V, Raurell M, Soler J, Montanya E. β -cell death and mass in singeneically transplantated islets exposed to short and long-term hyperglycemia. *Diabetes* 2002, 51: 66-72.

25. Blundell T, Dodson G, Hogdkin D, Mercola D. Insulin: the structure in the cristal and its reflection in chemistry and biology. *Adv Protein Chem* 1972, 26: 279-402.
26. Bonner-Weir S, Orci L. New perspectives on the microvasculature of the islets of Langerhans in the rat. *Diabetes* 1982, 31: 883-9.
27. Bonner-Weir S, Smith FE. Islets of Langerhans: morphology and its implications. En Kahn CR, Weir GC, eds. *Joslin's Diabetes mellitus*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1993: 15-28. (a)
28. Bonner-Weir S, Baxter LA, Schuppin GT, Smith FE. A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas. *Diabetes* 1993, 42: 1715-20. (b)
29. Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, et al. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97: 7999-8004.
30. Bottino R, Fernández L, Ricordi C, Lehmann R, Tsan MF, Oliver R, Inverardi L. Transplantation of allogeneic islets of Langerhans in the rat liver: effect of macrophage depletion on graft survival and microenvironment activation. *Diabetes* 1998, 47: 316-23.
31. Braghi S, Bonifacio E, Secchi A, Di Carlo V, Pozza G, Bosi E. Modulation of humoral islet autoimmunity by pancreas allotransplantation influences allograft outcome in patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 2000, 49: 218-24.
32. Brendel M, Hering B, Schulz A, Bretzel R. International Islet Transplant Registry report. Giessen, Germany: University of Giessen, 1999: 1-20.

33. Brendel MD, Hering BJ, Schultz AO, Bretzel RG (eds). International Islet Transplant Registry 2001, Newsletter 9, vol 8 (1).
34. Bretzel RG, Brandhordt D, Brandhorst H, Eckhard M, Ernst W, Friemann S, Rau W, Weimar B, Rauber K, Hering BJ, Brendel MD. Improved survival of intraportal pancreatic islet cell allografts in patients with type-1 diabetes mellitus by refined peritransplant management. *J Mol Med* 1999, 77: 140-3.
35. Briaud I, Kelpe CL, Jonson LM, Tran PO, Poitout V. Differential effects of hyperlipidemia on insulin secretion in islets of Langerhans from hyperglycemic versus normoglycemic rats. *Diabetes* 2002, 51: 662-8.
36. Bruce DG, Storlein LH, Furler SM, et al. Cephalic phase metabolic response in normal weight adults. *Metabolism* 1987, 36: 721.
37. Brunzell JD, Robertson RP, Lerner RL, Hazzard NR, Ensinnck JW, Bierman EL, Porte D Jr. Relationships between fasting plasma glucose levels and insulin secretion during intravenous glucose tolerance tests. *J Clin Endocrinol Metab* 1976, 42: 222-9.
38. Burkart B, Imai Y, Kallman B, Kolb H. Cyclosporin A protects pancreatic islet cells from nitric oxide-dependent macrophage cytotoxicity. *FEBS Lett* 1992, 313 (1): 56-8.
39. Calafiore R, Luca G, Calvitti M, Neri LM, Basta G, Capitán S, Becchetti E, Brunetti P. Cellular support systems for alginate microcapsules containing islets, as composite bioartificial pancreas. *Ann N Y Acad Sci* 2001, 944: 240-51.

40. Carlsson PO, Liss P, Andersson A, Jansson L. Measurements of oxygen tension in native and transplanted rat pancreatic islets. *Diabetes* 1998, 47: 1027-32.
41. Carlsson PO, Palm F, Andersson A, Liss P. Chronically decreased oxygen tension in rat pancreatic islets transplanted under the kidney capsule. *Transplantation* 2000, 69(5): 761-6.
42. Chan SJ, Keim P, Steiner DF. Cell-free synthesis of rat preproinsulins: Characterization and partial amino acid sequence determination. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976, 73: 1964.
43. Chen M, Porte D Jr. The effect of rate and dose of glucose infusion on the acute response to insulin in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1976, 42: 1168.
44. Clayton HA, Davies JE, Pollard CA, White SA, Musto MM, Dennison AR. Pancreatectomy with the islet autotransplantation for the treatment of severe chronic pancreatitis: the first 40 patients at the Leicester general Hospital. *Transplantation* 2003, 76 (1): 92-8.
45. Cousin SP, Hugl SR, Wrede CE, Kajio H, Myers MG Jr, Rodees CJ. Free fatty acid-induced inhibition of glucose and insulin-like growth factor I-induced deoxyribonucleic acid synthesis in the pancreatic beta-cell line INS-1. *Endocrinology* 2001, 142 (1): 229-40.
46. Davalli AM, Scaglia L, Zanger DH, Hollister J, Bonner-Weir S, Weir GC. Vulnerability of islets in the immediate posttransplantation period: dynamic changes in structure and function. *Diabetes* 1996, 45: 1161-7.

47. De Gasparo M, Desaulles PA. Fetal pancreatic anatomy and late adaptation to the environment. En Shafir E, Renold AE (eds): Lesson from Animal Diabetes. London, John Libbey, 1984, pp 685-94.
48. De la Tour D, Halvorsen T, Demeterco C, Tyrberg B, Itkin-Ansari P, Loy M, Yoo SJ, Hao E, Bossie S, Levine F. Beta-cell differentiation from a human pancreatic cell line in vitro and in vivo. *Mol Endocrinol* 2001, 15 (3): 476-83.
49. Demeterco C, Levine F. Gene therapy for diabetes. *Front Biosci* 2001, 6: 175-91.
50. De Vos P, Wolters GHJ, Fritschy WM, van Schilfgaarde R. Obstacles in the application of microencapsulation in islet transplantation. *Int J Artif Organs* 1993; 16: 205.
51. De Vos P, De Haan B, Wolters GHJ, van Schilfgaarde R. Factors influencing the adequacy of microencapsulation of rat pancreatic islets. *Transplantation* 1996; 62: 888-93.
52. Dibelius A, Konigsberger H, Walter P, Permanetter W, Brendel W, von Specht BU. Prolonged reversal of diabetes in the rat by transplantation of allogeneic islets from a single donor and cyclosporine treatment. *Transplantation* 1986, 41 (4): 426-31.
53. Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment on the development and progresión of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *New Engl J med* 1993, 329: 977-86.

54. Ding WG, Guo LD, Kitasato H, et al. Phylogenic study of calcitonin gene related peptide immunoreactive structures in the pancreas. *Histochem cell Biol* 1998, 109: 103-9.
55. Dionea KE, Colton CK, Yarmush ML,. Effect of hypoxia on insulin secretion by isolated rat and canine islets of Langerhans. *Diabetes* 1993, 42: 12-21.
56. Drachenberg CB, Klassen DK, Weir MR, et al. Islet cell damage associated with tacrolimus and cyclosporine: Morphological features in páncreas allograft biopsies and clinical correlation. *Transplantation* 1999; 68: 396-402.
57. Drucker DJ: Minireview: the glucagon-like peptides. *Endocrinology* 2001, 142: 521-7.
58. Dufour JM, Rajotte RV, Korbitt GS, Emerich DF. Harnessing the immunomodulatory properties of Sertoli cells to enable xenotransplantation in type 1 diabetes. *Immunol Invest* 2003, 32 (4): 275-97.
59. Dunning BE, Havel PJ, Veith RC, et al. Pancreatic and extrapancreatic galamin release during sympathetic neural activation in dogs. *Am J Physiol* 1990, 258: E436-E440.
60. Edlund H. Transcribing pancreas. *Diabetes* 1998, 47: 1817-23.
61. Edlund H. Development biology of the páncreas. *Diabetes* 2001, 50 (1): S5-9.
62. Efrat S, Fusco-DeMane D, Lemberg H, Emran OA, Wang S. Conditional transformation of a pancreatic β -cell line derived from transgenic mice

- expressing a tetracycline-regulated oncogene. Proc Natl Acad Sci USA 1995, 92: 3576-80.
63. el Mansour A, Martignat L, Maugendre S, Senecat O, Gouin E, Sai P. Cyclosporin depresses islet expressions of antigens for islet cell antibodies in non obese diabetic mice. J Autoimmun 1996, 9 (1): 29-39.
64. Elsner M, Guldbakke B, Tiedge M, Munday R, Lenzen S. Relative importance of transport and alkilation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. Diabetologia 2000, 43: 1528-33.
65. Ensink JW, Williams RH. Hormonal and non-hormonal factors modifying man's response to insulin. En Steiner DF, Freinkel N (eds). Handbook of Physiology. Washington DC, American Physiological Society, 1972, p 665.
66. Fadda GC, Akmal M, Lipson LG, et al. Direct effect of parathyroid hormone on insulin secretion from pancreatic islets. Am J Physiol 1990, 258: E975-E984.
67. Falkmer S, El-Salhy M, Titlbach M. Evolution of the neuroendocrine system in vertebrates. A review with particular reference to the phylogeny and postnatal maturation of the islet parenchyma. En: Falkner S, Hakanson R, Sundler F, eds. Evolution and tumour pathology of the neuroendocrine system. Fernstrom Foundation Series. Amsterdam : Elsevier 1984, 59-88.
68. Fajans SS, Floyd JC. Stimulation of islet cell secretion by nutrients and gastrointestinal hormones released during digestion. En Steiner DF,

- Freinkel N (eds); Handbook of Physiology. Washington DC, American Physiological Society, 1972, p 473.
69. Farney AC, Cho E, Schweitzer EJ, Dunkin B, Philosophe B, Colonia J, et al. Simultaneous cadáver páncreas living-donor kidney transplantation: a new approach for the type 1 diabetic uremic patient. *Ann Surg* 2000, 232: 696-703.
70. Federici M, Hribal M, Perego L, Ranalli M, Caradonna Z, Perego C, Usellini L, Nano R, Bonini P, Bertuzzi F, Marlier LN, Davalli AM, Carandente O, Pontiroli AE, Melino G, Marchetti P, Lauro R, Sesti G, Folli F. High glucose causes apoptosis in cultured human pancreatic islets of Langerhans. A potential role for regulation of specific Bcl family genes toward an apoptotic cell death program. *Diabetes* 2001, 50: 1290-301.
71. Fehmann HC, Goke R, Goke B. Cell and molecular biology of the incretin hormones glucagon-like-peptide-1 and glucose-dependent insulin releasing polypeptide. *Endocr Rev* 16: 390-410, 1995.
72. Felig P, Marliss EB, Cahill GF Jr. Metabolic response to human growth hormone during prolonged starvation. *J Clin Invest* 1971, 50: 411.
73. Ferrari-Lacraz S, Zheng XX, Kim YS, Li Y, Maslinski W, Li SC, Strom TB. An antagonist IL-15/Fc protein prevents costimulation blockade-resistant rejection. *J Immunol* 2001, 167(6): 3478-85.
74. Ferreira J, Alejandro R, Kenyon N, et al. Nine year islet allograft function in patients with type 1 DM. *Diabetes* 2000, 49: A31.

75. Finegood DT, McArthur MD, Kojwang D, Thomas MJ, Topp BG, Leonard T, Buckingham RE: β -cells mass dynamics in Zucker diabetic fatty rats: Rosiglitazone prevents the rise in net cell death. *Diabetes* 2001, 50: 1021-9.
76. Fiorina P, Folli F, Zerbini G, Maffi P, Gremizzi C, Di Carlo V, Socci C, Bertuzzi F, Kashgar M, Secchi A. Islet transplantation is associated with improvement of renal function among patients with type 1 diabetes mellitus and kidney transplants. *J Am Soc Nephrol* 2003, 14(8): 2150-8.
77. Fleischer N, Erlichman J. Intracellular signals and protein phosphorylation: regulatory mechanisms in the control of insulin secretion from the pancreatic beta cell. En Draznin B, Melmed S, Leroith D, eds. *Insulin secretion*. New York: Alan R Liss, 1989: 107-16.
78. Fleischer N, Chen C, Surana M, Leiser M, Rossetti L, Pralong W, Efrat S. Functional análisis of a conditionally-transformed pancreatic beta cell line. *Diabetes* 1998, 47: 1419-25.
79. Fritschy WM, Wolters GHJ, Van Schilfgaarde R. Effect of alginate-polyllysine-alginate microencapsulation on in vitro insulin release from pancreatic islets. *Diabetes* 1991; 40: 3.
80. Fritschy WM, De Vos P, Groen H, et al. The capsular overgrowth on microencapsulated pancreatic islet grafts in streptozocin and autoimmune diabetic rats. *Transplant Int* 1994; 7: 264.
81. Froberg MK, Leone JP, Jessurun J, Sutherland DE. Fatal disseminated intravascular coagulation after autologous islet transplantation. *Hum Pathol* 1997, 28: 1295-8.

82. García-Ocaña A, Vasavada RC, Takane KK, Cebrián A, López-Talavera JC, Stewart AF. Using beta-cell growth factors to enhance human pancreatic islet transplantation. *J Clin Endocrinol Metab* 2001, 86(3): 984-8.
83. Gardemann A, Jungerman K, Grobe V, Cossel L, Wohlrab F, Hahn HJ et al. Intraportal transplantation of pancreatic islets into libres of diabetic rats. Reinnervation of islets and regulation of insulin secretion by the hepatic sympathetic nerves. *Diabetes* 1994, 43: 1345-52.
84. Gerich JE, Charles MA, Grodsky GM. Characterization of the effects of arginine and glucose on glucagon and insulin release from the perfused rat páncreas. *J Clin Invest* 1974, 54: 833.
85. Giannoukakis N, Mi Z, Gambotto A, Eramo A, Ricordi M, Trucco M, Robbins P. Infection of intact human islets by a lentiviral vector. *Gene Ther* 1999, 6: 1545-51.
86. Gill RG, Rosenberg AS, Lafferty KJ, Singer A. Characterization of primary T cells subsets mediating rejection in pancreatic islet grafts. *J immunol* 1989, 143: 2176.
87. Gillison SL, Bartlett, Curry DL. Synthesis-secretion coupling of insulin: effect of cyclosporin. *Diabetes* 1989, 38: 465-70.
88. Gisselbrecht S. The CIS/ SOCS proteins: a family of cytokine-inducible regulators of signaling. *Eur Cytokine Network* 1999, 10: 463-70.
89. Goday A. Epidemiología de la Diabetes y sus complicaciones no coronarias. *Rev Esp Cardiol* 2002, 55 (6): 657-60.

90. Goldfine ID, German MS, Tseng HC, et al. The endocrin secretion of human insulin and growth hormone by exocrine glands of the gastrointestinal tract. *Nat Biotechnol* 1997, 15: 1378-82.
91. Gotoh M, Porter J, Kanai T, Monaco AP, Maki T. Multiple donor allotransplantation. A new approach to islet transplantation. *Transplantation* 1988, 45 (6): 1008-12.
92. Gotoh M, Sato Y, Abe T, Kanazawa Y. New approaches for succesful of islet transplantation. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2000, 7: 358-63.
93. Gray DW, Crenston D, McShane P, Sutton R, Morris PJ. The effect of hyperglycemia on pancreatic islets transplanted into rats beneath the kidney capsule. *Diabetologia* 1989, 32 (9): 663-7.
94. Grodsky GM. Threshold distribution hipotesis for packet storage of insulin and its mathematical modeling. *J Clin Invest* 1972, 51: 2047. (b)
95. Grodsky GM, Fanska R, Lundquist I. Interrelationship between α and β anomers of glucose affecting both insulin and glucagon secretion in the perfused rat páncreas. *Endocrinology* 1975, 97: 573. (a)
96. Grodsky GM. A new phase of insulin secretion: how will it contribute to our understanding of β -cell function? *Diabetes* 1989, 38: 673-8. (c)
97. Groth CG, Tibell A, Wennberg L, Korsgren O. Xenoislet transplantation: experimental and clinical aspects. *Lancet* 1996, 344: 1402-4.
98. Habener JF, Stoffers DA. A newly discovered role of trancriptions factors involved in pancreas development and the pathogenesis of diabetes mellitus. *Proc Assoc Am Physicians* 1998, 110: 12-21.

99. Hakanson R, Sundler F. The design of the neuroendocrine system: A unifying concept and its consequences. *Trends Pharmacol Sci* 1983, 4: 41-4.
100. Hamamoto Y, Tsuura Y, Fujimoto S, Nagata M, et al. Recovery of function of endogenous beta-cells in streptozocin-induced diabetic rats treated with islet transplantation. *Biochem Biophys Res Commun* 2001, 14; 287 (1): 104-9.
101. Han D, Xu X, Pastori RL, Ricordi C, Kenyon NS. Elevation of cytotoxic lymphocyte gene expression is predictive of islet allograft rejection in nonhumans primates. *Diabetes* 2002, 51 (3): 562-6.
102. Harlan DM, Hentgarner H, Huang ML, et al. Mice expressing both B7-1 and viral glycoprotein on pancreatic beta cell along with glycoprotein-specific transgenic T cells develop diabetes due to a breakdown of T-lymphocyte unresponsiveness. *Proc Natl acad Sci USA* 1994, 91: 3137.
103. Hauptman PJ, O'Connor CK. Procurement and allocation of solid organ transplantation. *N Eng J Med* 1997, 327: 422-31.
104. Heemann UW, Tullius SG, Kupiec-Weglinsky JW, Tilney NL. Early events in acute allograft rejection: leukocyte/endothelial cell interactions. *Clin transplant* 1993, 7: 82.
105. Hellerström C, Sweene I. Growth pattern of pancreatic islets in animals. En: *The Diabetic Páncreas*, Volk BV y Arquilla ER, eds. Plenum Publishing Corporation, New York, 1985, pag 53-79.

106. Heneine W, Tibell A, Switzer WM, Sandstrom P, Rosales GV, Mathews A, et al. No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of porcine islet-cell xenograft. *Lancet* 1998, 352: 695-9.
107. Henquin JC: Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* 2000, 49: 1751-60.
108. Hering BJ, Schultz AO, Geier C, Bretzel RG, Fedeslin K. International Islet Transplant Registry. Justus- Liebig- University of Giessen, Germany 1995, 5: 10-27.
109. Heuser M, Wolf B, Vollmar B, Menger MD. Exocrine contamination of isolated islets of Langerhans deteriorates the process of revascularization after free transplantation. *Transplantation* 2000, 69 (5): 756-61.
110. Hill RS, Cruise GM, Hager SR, Lamberti FV, Yu X, Garufus CL, et al. Immunoisolation of adult porcine islets for the treatment of diabetes mellitus. The use of photopolymerizable polyethylene glycol in the conformal coating of mass-isolated porcine islets. *Ann N Y Acad Sci* 1997, 831: 332-43.
111. Hiramatsu S, Grill V. Influence of high-fat diet during chronic hyperglycemia on beta-cell function in pancreatic islet trasplants to streptozocin-diabetic rats. *Eur J Endocrinol* 2001, 144 (5): 521-7.
112. Hiriart M, Vidaltamayo R, Sánchez-Soto MC. Nerve and fibroblast growth factors as modulators of pancreatic beta cell plasticity and insulin secretion. *Isr Med Assoc J* 2001, 3 (2): 114-6.

113. Hogg J, Han VKM, Clemmons DR, et al. Interactions of nutrients, insulin like growth factors (IGFs) and IGF-binding proteins in the regulation of DNA synthesis by isolated fetal rat islets of Langerhans. *J Endocrinol* 1993, 138: 401-12.
114. Hughes SJ, Davies SE, Powis SH, Press M. Hyperoxia improves the survival of intraportally transplanted syngeneic pancreatic islets. *Transplantation* 2003, 75 (12): 1954-9.
115. Hunger RE, Carnaud C, García I, Vasalli P, Mueller C. Prevention of autoimmune diabetes mellitus in NOD mice by transgenic expression of soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Eur J Immunol* 1997, 27: 255-61.
116. Ilieva A, Yuan S, Wang RN, Agapitos D, Hill DJ, Rosenberg L. Pancreatic islet cell survival following islet isolation: the role of cellular interactions in the pancreas. *J Endocrinol* 1999, 161: 357-64.
117. Itoh A, Maki T. Protection of non obese diabetic mice from autoimmune diabetes by reduction of islet mass before insulinitis. *Proc Natl acad sci USA* 1996, 93: 11053-56.
118. Jaeger C, Wöhrle M, Bretzel RG, Federlin K. Effect of transplantation site and culture pretreatment on islet xenograft survival (rat to mouse) in experimental diabetes without immunosuppression of the host. *Acta Diab* 1994, 31: 193-7.
119. Jaeger C, Brebdel MD, Hering BJ, Echard M, Bretzel RG. Progressive islet graft failure occurs significantly earlier in auto-

- antibody-positive than in auto-antibody-negative IDDM recipients of intrahepatic islet allografts. *Diabetes* 1997, 46: 1907-10.
120. Jansson L, Hellerström C. A rapid method of visualizing the pancreatic islets for studies of islet capillary blood flow using non-radioactive microspheres. *Acta Physiol Scand* 1981, 113: 371-4.
121. Jansson L, Hellerström C. Stimulation by glucose of the blood flow to the pancreatic islets of the rat. *Diabetologia* 1983, 25: 45-50.
122. Jansson L, Swenne I. Age dependent changes of pancreatic islet blood flow in the rat. *Int J Pancreatol* 1989, 5: 157-63. (a)
123. Jansson L, Sandler S. Influence of hyperglycemia on blood perfusion of autotransplanted pancreatic islets in diabetic rats. *Diabetes* 1989, 38 (suppl 1): 196-8. (b)
124. Jansson L, Sandler S. The blood perfusion of transplanted pancreatic islets. Evidence of a maturation of the blood-flow response to D-Glucose with time after implantation. *Transplantation* 1992, 53: 1368-9.
125. Jansson L, Eizirik DL, Pipeleers DG, Borg LA, Hellerström C, Anderson A. Impairment of glucose-induced insulin secretion in human pancreatic islets transplanted to diabetic nude mice. *J Clin Invest* 1995, 96: 721-6.
126. Jara-Albarrán A, Arranz A, Álvarez S, Soto MI, Martínez B, Martín-Scapa MC. Severity of hypoglycemia in rats when insulin is applied after islet allotransplantation in the liver. *Transplant Proc* 1995, 27 (6): 3217-9.

127. Jara Albarrán A, Soto Montenegro ML, Arranz Martín A, Álvarez Gómez S, Martínez Valenzuela B, Martín-Scapa MC. Hyper-response to exogenous insulin in diabetic rats after islet allotransplantation without reversion of diabetes. *Transplant Proc* 1997, 29 (5): 2503-5.
128. Johansson U, Olsson A, Gabrielsson S, Nilsson B, Korsgren O. Inflammatory mediators expressed in human islets of Langerhans: implications for transplantation. *Biochem Biophys Res Común* 2003, 308 (3): 474-9.
129. Kalhan SC, Adam PAJ. Inhibitory effect of prednisone on insulin secretion in a man: Model for duplication of blood glucose concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 1975, 41: 600.
130. Kanai T, Porter J, Monaco AP, Maki T. Successful treatment of experimental diabetes by sequential transplantation of multiple donor pancreatic islet allograft. *Transplantation* 1989, 47: 3.
131. Karlsson-Parra A, Ridderstad A, Wallgren AC, Möller E, Ljunggren HG, Korsgren O. Xenograft rejection of porcine islet-like cluster in normal and natural-killer depleted mice. *Transplantation* 1996, 61:1313-20.
132. Kaufman DB, Rabe F, Platt JL, Stock PG, Sutherland DER. On the variability of outcome afeter islet allotransplantation. *Transplantation* 1988, 45: 1151.
133. Kaung HL. Growth dynamics of pancreatic islet cell populations during fetal and neonatal development of the rat. *Dev Dyn* 1994, 200: 163-75.

134. Kenyon NS, Alejandro R, Mintz DH. Experience with islet immunoalteration in dogs: in vitro and in vivo studies. *Horm Metab Res Suppl* 1990, 25: 119-22.
135. Kin T, Korbitt GS, Rajotte RV. Survival and metabolic function of syngeneic rat islet grafts transplanted in omental pouch. *Am J Transplant* 2003, 3: 281-5.
136. King DS, Staten MA, Korht W, et al. Insulin secretory capacity in endurance-trained and untrained young-men. *Am J Physiol* 1990, 259: E155.
137. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projection. *Diabetes Care* 1998, 21(9): 1414-31.
138. Koevary SB, Azmitia EC, Mc Evoy RC. Rat pancreatic serotonergic nerves: Morphologic, pharmacologic and physiologic studies. *Brain Res* 1983, 265: 328-32.
139. Kolodka TM, Finegold M, Moss L, Woo SL. Gene therapy for diabetes mellitus in rats by hepatic expression of insulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, 92: 3293-7.
140. Korsgren O, Jansson L, Andersson A. Effects of hyperglycemia on function of isolated mouse pancreatic islet transplanted under kidney capsule. *Diabetes* 1989, 38: 510-15.
141. Korsgren O, Jansson L, Sandler S, Andersson A. Hyperglycemia-induced B-cell exhaustion. The fate of pancreatic islet transplanted into

- diabetic mice is dependent on their genetic background. *J Clin Invest* 1990, 86: 2161-8.
142. Korsgren O, Andersson A, Jansson L, Sundler AF. Reinnervation of syngeneic mouse pancreatic islets transplanted into renal subcapsular space. *Diabetes* 1992, 41: 130-5.
143. Lacy PE, Finke EH, Dye ES. Effect of a minimal number of donor rat islets on xenograft survival in mice. *Transplantation* 1990, 50: 715.
144. Lacy PE. Islet cell transplantation for insulin-dependent diabetes. *Hosp Prac (Off Ed)* 1995, 30: 41-5.
145. Lakey JRT, Warnock GL, Rajotte RV. Intrathymic transplantation of fresh and cryopreserved islets for the induction of a state of unresponsiveness in rats. *Transplantation* 1996, 61: 506-8.
146. Landgraf R, Leurs MMC, Weissman A, et al. Prolactin: A diabetogenic hormone. *Diabetologia* 1977, 13: 99.
147. Lang DA, Matthews DR, Burnett M, et al. Pulsatile, synchronous basal insulin and glucagon secretion in a man. *Diabetes* 1982, 31: 22.
148. Lanza RP, Sullivan SJ, Chick WL. Islet transplantation with immunoisolation. *Diabetes* 1992, 41: 1503-10.
149. Lanza RP, Kühtreiber WM, Ecker D, Satruk JE., Marsh J, Chick WL. A simple method for transplanting discordant islets without immunosuppression using uncoated alginate microspheres. *Transplantation* 1995 a, 59: 1377-84.

150. LaPorte R, Matsushima M, Chang YF. Prevalence and incidence of Insulin-Dependent Diabetes, *in* Harris M (ed) Diabetes in america (2^o ed). National Institutes of Health, NIH publication n° 95-1468, 1995, pp 37-46.
151. Lau HT, Yu M, Fontana A, Stoeckert CJ. Prevention of islet allograft rejection with engineered myoblast expressing FasL in mice. *Science* 1996, 273: 109-11.
152. Laybutt DR, Kaneto H, Hasenkamp W, Grey S, Jones JC, Sgroi DC, Groff A, Ferran C, Bonner-Weir S, Sharma A, Weir GC. Increased expression of antioxidant and antiapoptotic genes in islets that may contribute to beta cell survival during chronic hyperglycemia. *Diabetes* 2002; 51: 413-23.
153. Leahy JL, Bonner-Weir S, Weir GC. Minimal chronic hyperglycemia is a critical determinant of impaired insulin secretion after an incomplete pancreatectomy. *J Clin Invest* 1988, 81: 1407-14.
154. Le Floch JP, Escuyer P, Baudin E, Baudon D, Perlemuter L. Blood glucose area under the curve. Methodological aspects. *Diabetes Care* 1990, 13 (2): 172-5.
155. Lenzen S, Panten U. Signal recognition by pancreatic B-cells. *Biochem pharmacol* 1988, 37: 371-8.
156. Like A, Orci L. Embryogenesis of the human pancreatic islets: A light and electron microscopic study. *Diabetes* 1972, 2 (suppl 2): 511-34.
157. Like AA, Rossini AA. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: a new model of diabetes mellitus. *Science* 1976, 193: 415-7.

158. Linetsky E, Bottino R, Lehman R, Alejandro R, Inverardi L, Ricordi C. Improved human islet isolation using a new enzyme blend, Liberase. *Diabetes* 1997, 46: 1120-3.
159. López-Talavera JC, García-Ocana A, Sipula I, Takane KK, Cozar-Castellano I, Stewart AF. Hepatocyte growth factor gene therapy for pancreatic islets in diabetes: reduces the minimal islet transplant mass required in a glucocorticoid-free rat model of allogeneic islet transplantation. *Endocrinology* 2003 (Epub ahead of print).
160. Luo Z, Gotoh M, Grochowiecki T, Tanaka T, Kimura F, Kawashima H, Yagita H, Okumura K, Miyasaka M. Anergic cells generated in vitro suppress rejection response to islet allografts. *Transplantation* 2000, 69: 2144-8.
161. Maedler K, Sergeev P, Ris F, Oberholzer J, Joller-Jemelka HI, Giatgen A, Kaiser N, Halban PA, Donath MY. Glucose-induced β cell production of IL-1 β contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J Clin Invest* 2002, 110: 851-60.
162. Makhlouf L, Duvivier-Kali VF, Bonner-Weir S, Dieperink H, Weir GC, Sayegh MH. Importance of hyperglycemia on the primary function of allogeneic islet transplants. *Transplantation* 2003, 76 (4): 657-64)
163. Mandrup-Poulsen T. β -cell apoptosis: stimuli and signalling. *Diabetes* 2001, 50 (suppl 1): 58-63.

164. Markmann JF, Deng S, Huang X, Desai NM, Velidedeoglu EH, Lui C, et al. Insulin independence following isolated islet transplantation and single islet infusion. *Ann Surg* 2003, 237 (6): 741-9.
165. Massi-Benedetti M. The cost of Diabetes type 2 in Europe. The Code2 Study. *Diabetologia* 2002, 45: s1-s4.
166. Matschinsky FM, Fertel R, Kotler-Brajtburg K, et al. Factors governing the action of small calorogenic molecules on the islets of Langerhans. En Maussacchia XJ, Breitenbach KP (eds): *Proceedings of the 8th Midwest Conference of Endocrinology and metabolism*. Columbia. University of Missouri Press, 1973, p 63.
167. Matsushita T, Yamaoka T, Otsuka S, Moritani M, Matsumoto T, Itakura M. Molecular cloning of mouse paired-box-containing gene (Pax)-4 from an islet beta cell line and deduced sequence of human Pax-4. *Biochem Biophys Res Commun* 1998, 242: 176-80.
168. May BM, Gurley KE, Dorsch SE. The possible role of cytotoxic T cells in the mediation of first-set allograft rejection. *Transplantation* 1985, 40: 336.
169. Meda P, Michaels RL, Halban PA, et al. In vivo modulation of gap-junction and dye coupling between beta cells of the intact pancreatic islet. *Diabetes* 1983, 32: 858-68.
170. Mehigan DG, Bell WR, Zuidema GD, Eggleston JC, Cameron JL. Disseminated intravascular coagulation and portal hypertension following pancreatic islet autotransplantation. *Ann Surg* 1980, 191: 287-93.

171. Mendola JF, Goity C, Fernández-Álvarez J, Saenz A, Benarroch G, Fernández-Cruz L, Gomis R. Immunocytochemical study of pancreatic islet revascularization in islet isograft. Effect of hyperglycemia of the recipient and of in vitro culture of islets. *Transplantation* 1994, 57: 725-30.
172. Menger MD, Vajkoczy P, Leiderer R, Jager S, Messmer K. Influence of experimental hyperglycemia on microvascular blood perfusion of pancreatic islets isografts. *J Clin Invest* 1992, 90: 1361-9.
173. Menger MD, Yamauchi J, Vollmar B. Revascularization and microcirculation of freely grafted islets of Langerhans. *World J Surg* 2001, 25(4): 509-15.
174. Merino JF, Nácher V, raurell M, Aranda O, Soler J, Montanya E. Improved outcome of islet transplantation in insulin treated diabetic mice: effects on beta-cell mass and function. *Diabetologia* 1997, 40: 1004-10.
175. Merino JF, Nácher V, Raurell M, Biarnés M, Soler J, Montanya E. Optimal insulin treatment in syngeneic islet transplantation. *Cell Trasplant* 2000, 9: 11-18.
176. Meyer J, Sturis J, Katschinsji M, Arnold R, Goke B, Byrne MM. Acute hyperglycemia alters the ability of the normal beta-cell to sense and respond to glucose. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002, 282 (4): E917-22.
177. Milner RDG, De Gasparo M. The autonomic nervous system and perinatal metabolism. *Ciba Found Symp* 1981, 83: 291-309.

178. Milo-Landesman D, Surana M, Berkovich I, Compagni A, Chistofori G, Fleischer N, Efrat S. Correction of hyperglycemia in diabetic mice transplanted with reversibly-immortalized pancreatic beta cells controlled by the tet-on regulatory system. *Cell Transplant* 2001, 10 (7): 645-50.
179. Ministerio de Sanidad y Consumo. Organización Nacional de Trasplantes, 2002.
180. Molano RD, Berney T, Li H, Cattan P, Pileggi A, Vizzardelli C, Kenyon NS, Ricordi C, Burkly LC, Inverardi L. Prolonged islet graft survival in NOD mice by blockade of the CD40-CD154 pathway of T-cell costimulation. *Diabetes* 2001, 50 (2): 270-6.
181. Montana E, Bonner-Weir S, Weir GC. Beta cell mass and growth after syngeneic islet cell transplantation in normal and streptozocin diabetic C57Bl/6 mice. *J Clin Invest* 1993, 91: 780-7.
182. Montana E, Bonner-Weir S, Weir GC. Transplanted beta cell response to increased metabolic demand: Changes in beta cell replication and mass. *J Clin Invest* 1994, 93: 1577-82.
183. Moore HP, Walker MD, Lee F, Kelly RB. Expressing a human proinsulin cDNA in a mouse ACTH-secreting cell. Intracellular storage, proteolytic processing and secretion on stimulation. *Cell* 1985, 35: 31-8.
184. Mulder H, Myrsen-Axcrona U, Gebre-Mehdin S, et al. Expresión of no clasical islet hormone like peptides during the embryonic development of the pancreas. *Microsc Res Tech* 1998, 15: 313-21.

185. Muller VA, Faloona GR, Unger RH. The influence of the antecedent diet upon glucagon and insulin secretion. *N Eng Med J* 1971, 285: 1450-4.
186. Munro S, Pelma HRB. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 1987, 48: 899.
187. Murakami T, Miyake T, Tsubouchi M, et al. Blood flow patterns in the rat pancreas: A simulative demonstration by injection replication and scanning electron microscopy. *Microsc Res Tech* 1997, 37: 498-508.
188. Myrsen-Axcrona U, Ekblad E, Sundler F. Developmental expresión of NPY, PPY and PP in the rat pancreas and their coexistence with islet hormones. *Regul Pept* 1997, 26: 165-75.
189. Nácher V, Merino JF, Raurell M, Soler J, Montanya E. Normoglycemia restores β -cell replicative response to glucose in transplantated islets exposed to chronic hyperglycemia. *Diabetes* 1998, 47: 192-6.
190. Nakhooda AF, Like AA, Chappel DVM, Murria FT, Marliss EB. The spontaneously diabetic Wistar rat. *Diabetes* 1976, 26: 100-11.
191. National Diabetes Data Group. *In* Harris M (ed): *Diabetes in America*, ed 2, Washington DC, National Institutes of Health, 1995.
192. Newgard CB, McGarry JD: Metabolic coupling factors in pancreatic beta-cell signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1995, 64: 689-719.
193. N'Guyen JM, Magnan C, Laury MC, Thibault C, Leveteau J, Gilbert M, et al. Involvement of the autonomic nervous system in the in

- vivo memory to glucose of pancreatic β cells in rats. *J Clin Invest* 1994, 94: 1456-62.
194. Nielsen JH, Serup P. Molecular basis for islet development, growth and regeneration. *Curr Opin Endocrinol Diabetes* 1998, 5: 97-107.
195. Nielsen JH, Svensson C, Galsgaard ED, et al. Beta cell proliferation and growth factors. *J Mol Med* 1999, 77: 62-6.
196. Nielsen JH, Galsgaard ED, Moldrup A, Friedrichsen BN, Billestrup N, Hansen JA, Lee YC, Carlsson C. Regulation of β -cell mass by hormones and growth factors. *Diabetes* 2001, 50 (1), S25-29.
197. Niki A, Niki H, Miwa I. Effect of anomers of d-manose on insulin release from perfused pancreas. *Endocrinology* 1979, 105: 1051.
198. Nishi M, Sanke T, Nagamatsu S, Bell GI, Steiner DF. Islet amyloid polypeptide. A new beta cell secretory product related to islet amyloid deposits. *J Biol Chem* 1990, 265 (8): 4173-6.
199. O'Connell PJ, Pacheco-Silva A, Nickerson PW, Muggia RA, Bastos M, Kelley VR, Strom TB. Unmodified pancreatic islet allograft rejection results in the preferential expresión of certain T cell activation transcripts. *J Immunol* 1993, 150: 1093-104.
200. Oetjen E, Baun D, Beimesche S, et al. Inhibition of human insulin gene transcription by the immunosuppressive drugs cyclosporin A and tacrolimus in primary, mature islets of transgenic mice. *Mol Pharmacol* 2003, 63: 1289-95.

201. Orci L. Banting Lecture 1982: Macro and micro domains in the endocrine pancreas. *Diabetes* 1982, 31: 538-65.
202. Orci L, Ravazzola M, Amherdt M, Madsen O, Vassali JD, Perrelet A. Direct identification of prohormone conversion site in insulin-secreting cells. *Cell* 1985, 42: 671-81.
203. Osei K, Falko JM, O'Dorisio TM, et al. Decrease serum C-peptide/insulin molar ratios after oral glucose ingestion in hyperthyroid patients. *Diabetes Care* 1984, 7: 471-5.
204. Owerbach D, Bell GI, Rutter WJ, et al. The insulin gene is located in the short arm of chromosome 11 in humans. *Diabetes* 1981, 30: 267.
205. Ohzato H, Porter J, Monaco AP, Montanya E, Maki T. Minimum number of islets required to maintain euglycemia and their reduced immunogenicity after transplantation into diabetic mice. *Transplantation* 1993, 56: 270-4.
206. Pagano A, Letourneur F, Garcia-Estefanía D, et al. Sec24 proteins and sorting at the endoplasmic reticulum. *J Biol. Chem* 1999, 274: 7833.
207. Patience C, Takeuchi Y, Weiss RA. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nat Med* 1997, 3: 282-6.
208. Paty BW, Lanz K, Kendall DM, Sutherland DE, Robertson RP. Restored hypoglycemic counterregulation is stable in successful pancreas transplant recipients for up to 19 years after transplantation. *Transplantation* 2001, 72: 1103-7.

209. Paty BW, Ryan EA, Lakey JR, et al. Intrahepatic islet transplantation fails to restore hypoglycemic hormonal counterregulation and symptom recognition in insulin-dependent transplant recipients. 62nd Scientific Sessions of the American Diabetes Association. June 14-18, 2002. San Francisco, California. Abstract 37-OR. Diabetes, Volumen 51, Supplement 2.
210. Perfetti R, Brown TA, Velikina R, Busselens S. Diabetes Technolm Ther 1999, 1(3): 297-305.
211. Petrik J, Arany E, McDonald T, et al. Apoptosis in the pancreatic islet cells of the neonatal rat is associated with a reduced expresión of insulin growth factor II that may act as a survival factor. Endocrinology 1998, 139: 2994-3004.
212. Pileggi A, Ricordi C, Alessiani M, Inverardi L. Factors influencing Islet of Langerhans graft function and monitoring. Clin Chim Acta 2001, 310 (1): 3-16.
213. Pipeleers D, Hoorens A, Marichal-Pipeleers M, Van de Castele M, Bouwens L, Ling Z. Role of pancreatic beta-cells in the process of beta cell death. Diabetes 2001, 50 (Suppl 1): S52-7.
214. Plesner A, Korneluk RG, Liston P, et al. The X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) protects transformed beta cells from cytokine-mediated killing and prolongs murine islet allograft survival. 62nd Scientific Sessions of the American Diabetes Association. June 14-18, 2002.

215. Preston AM. Modification of streptozotocin-induced diabetes by protective agents. *Nutr Res* 1985, 5: 435-46.
216. Pyzdrowski KL, Kendall DM, Alter JB, et al. Preserved insulin secretion and insulin independence in recipients of islet autograft. *N Eng J Med* 1992, 327: 220.
217. Rabinovitch A, Suárez-Pinzon WL, Strynadka K, Lakey JR, Rajotte RV. Human pancreatic islet beta-cell destruction by cytokines involves oxygen free radicals and aldehyde production. *J Clin Endocrinol Metab* 1996, 81: 3197-202.
218. Rafael E, Ryan EA, Paty BW, Oberholzer J, Imes S, Senior P, McDonald C, Lakey JR, Shapiro AM. Changes in liver enzymes after clinical islet transplantation. *Transplantation* 2003, 76 (9): 1280-4.
219. Rajotte RV, Warnock GL, Coulombe MG. Islet cryopreservation methods and experimental results in rodents, large mammalian and humans. En: van Schildgaarde, Ardí MA (eds). *Transplantation of the Endocrine Pancreas in Diabetes Mellitus*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam 1988: 125-35.
220. Ramiya VK, Maraist M, Arfors KE, Schatz DA, Peck AB, Cornelius JG. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nat Med* 2000, 6: 278-82.
221. Rane SG, Reddy EP. Cell cycle control of pancreatic beta cell proliferation. *Font Biosci* 2000, 1; 5: D1-19.

222. Rayman G, Clark P, Scneider AE, et al. The first phase insulin response to intravenous glucose is highly reproducible. *Diabetologia* 1990, 33: 631.
223. Rehfeld JH, Larsson LI, Golterman NR, et al. Neural regulation of pancreatic hormone secretion by the C-terminal tetrapeptide of CCK. *Nature* 1980, 284: 33-8.
224. Rhodes CJ. Processing the insulin molecule. In *Diabetes Mellitus: A Fundamental and Clinical Text*. LeRoith D, Olefsky JM, Taylor S, Eds. Philadelphia, JB Lippincott Co., 2000, p 20-37.
225. Ricordi C, Angelico MC, Alejandro R, et al. Liver-islet transplantation in type 2 diabetes. *Transplant Proc* 1997, 29: 2240
226. Robertson RP. Successful islet transplantation for patients with diabetes. Fact or fantasy? (Editorial). *N Engl J Med* 2000, 343: 289-90.
227. Robertson RP. Islet transplantation as a treatment for Diabetes – A work in progress. *N Engl J Med* 2004, 350: 694-705.
228. Robitaille R, Dusseault J, Henley N, Rosenberg L, Halle JP. Insulin-like growth factor II allows prolonged blood glucose normalization with reduced islet mass transplantation. *Endocrinology* 2003, 144 (7): 3037- 45.
229. Romanus JA, Rabinovitch A, Rechler MM. Neonatal rat islet cell cultures synthesize insulin-like growth factor I. *Diabetes* 1987, 34: 696-702.

230. Rosenberg L, Wang R, Paraskevas S, Maysinger D. Structural and functional changes resulting from the islet isolation lead to islet cell death. *Surgery* 1999, 126: 393-8.
231. Rossetti L, Laughlin MR. Correction of chronic hyperglycemia with vanadate but not with phlorizin, normalizes in vivo glycogen repletion and in vitro glycogen syntasa activitiy in diabetic skeletal muscle. *J Clin Invest* 1989, 84: 892-9.
232. Roy MW, Lee KC, Jones MS, Miller RE. Neural control of pancreatic insulin and somatostatin secretion. *Endocrinology* 1984, 115 (2): 770-5.
233. Rubenstein AH, Melani F, Pilkis S, et al. Proinsulin: secretion, metabolism, immunological and biological properties. *Postgrad Med J* 1969, 45: 476.
234. Ryan EA, Lakey RT, Rajotte RV, Korbitt GS, Kin T, Imes S, Rabinovitch A, et al. Clinical outcomes and insulin secretion after islet trasplantation with the Edmonton protocol, *Diabetes* 2001, 50: 710-9.
235. Ryan EA, Lakey JR, Paty BW, et al. Successful islet transplantation: continued insulin reserve provides long-term glyceimic control. *Diabetes* 2002, 51: 2148-57.
236. Samols E, Marri G, Marks V. Promotion of insulin secretion by glucagon. *Lancet* 1965, 2: 415-6.
237. Sander M, German MS,. The beta cell transcription factors and development of the pancreas. *J Mol Med* 1997, 75: 327-40.

238. Sanders SL, Scheckman R. Polypeptide translocation across the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol. Chem* 1992, 267: 13791.
239. Sandler S, Jansson L. Blood flow measurements in autotransplanted pancreatic islets on the rat: Impairment of the blood perfusion of the graft during hyperglycemia. *J Clin Invest* 1987, 80: 17-21.
240. Sayegh MH, Auchincloss H, Koulmanda M. Non-immunologic mechanisms of islet allograft disjunctions: effect of diabetes control on islet allograft dysfunction. *Transplantation* 2000, 69 (8): S209.
241. Scaglia L, Cahill CG, Finegood DT, et al. Apoptosis participates in the remodeling of the endocrine pancreas in neonatal rat. *Endocrinology* 1997, 138: 1736-41.
242. Schuit FC, In't Velo PA, Pipeleers DG. Glucose stimulates proinsulin biosynthesis by a dose dependent recruitment of pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988, 85: 3865.
243. Shapiro AMJ, Lakey JRT, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000, 343 (4): 230-8.
244. Shapiro AMJ, Lakey JRT. Future trends in islet transplantation. *Diabetes Technol Ther* 2000, 2(3): 449-52.
245. Sharp DW, Lacy PE, Santiago JV, McCullough CS, Weida LG, Falqui L et al. Insulin independence after islet transplantation into type 1 diabetic patient. *Diabetes* 1990, 39: 515-8.

246. Sigrist S, Mechine-Neuville A, Mandes K, Calenda V, Braun S, Legeay G, Belloq JP, Pinge Kessler L. Influence of VEGF on the viability of encapsulated pancreatic rat islets after transplantation in diabetic mice. *Cell Transplant* 2003, 12 (6): 627-35.
247. Sjöholm A. Inhibition of fetal rat pancreatic β -cell replication by interleukin 1 β in vitro is not mediated through pertussis toxin-sensitive G-proteins, a decrease in cyclic AMP or protease activation. *FEBS Lett* 1991 a, 289: 249-52.
248. Skoglung G, Gross RA, Bertrand GR, et al. Comparison of effects of neuropeptides Y and norepinephrine on insulin secretion and vascular resistance in perfused rat pancreas. *Diabetes* 1991, 40: 660-5.
249. Skyler JS, Rabinovitch A. Cyclosporine in recent onset type 1 diabetes mellitus. Effects of islet beta cell function. Miami Cyclosporine Diabetes Study Group. *J Diabetes Complications* 1992, 6(2): 77-88.
250. Slack JMW. Development biology of the pancreas. *Development* 1995, 121: 1569-1580.
251. Soldevila G, Buscema M, Marini V. Transfection with SV40 gene of human pancreatic endocrine cells. *J Autoimmun* 1991, 4: 381-96.
252. Soon-Shiong P, Feldman E, Nelson R, Komtebedde J, Smidsrod O, Skjak-Braek G, et al. Successful reversal of spontaneous diabetes in dogs by intraperitoneal microencapsulated islets. *Transplantation* 1992, 54: 769-74.

253. Sorenson RL, Brelje TC. Adaptation of islet of Langerhans to pregnancy: B-cell growth, enhance insulin secretion and the role of lactogenic hormones. *Horm Metab Res* 1997, 29: 301-7.
254. Soria B, Roche E, Berná G, León-Quinto T, Reig J, Martín F. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normaliza glicemia in streptozocin-induced diabetes mice. *Diabetes* 2000, 49: 157-62.
255. Stegall MD, Chabot J, Weber C, Reemtsma K, Ardí MA. Pancreatic islet transplantation in cynomolgus monkeys. Initial studies and evidence that cyclosporine impairs glucose tolerance in normal monkeys. *Transplantation* 1989, 48 (6): 944-50.
256. Steiner DF. The biosynthesis of insulin: Genetic, evolutionary and pathophysiologic aspects. En Gotschlich EC (ed): *The Harvey Lectures*, series 78. New York, Academic Press, 1984, p 191.
257. Steiner DF. The proprotein convertases. *Curr Opin Chem Biol* 1998, 2: 31-9.
258. Steiniger B, Hiller WFA, Klempnauer J. Identical pattern of acute rejection after isolated islet and vascularized whole-pancreas transplantation in the rat. *Am J Pathol* 1990, 137: 93.
259. Stevens R, Ansite J, Mills C, Lokeh A, Rossini T, Saxena M, Brown R, Sutherland D. Nitric oxide mediates early dysfunction of rat and mouse islets after transplantation. *Transplantation* 1996, 61: 1740-9.
260. Suarez-Pinzon W, Sorensen O, Bleackely RC, Elliot JF, Rajotte RV, Rabinovitch A. Beta cell destruction in NOD mice correlates with

- Fas (CD 95) expresión on beta-cells and proinflammatory citokine expresión in islets. *Diabetes* 1999, 48: 21-8.
261. Sun Y, Ma X, Zhou D, Vavek I, Sun AM. Normalization of diabetes in spontaneously diabetic cynomologus monkeys by xenografts or microencapsulated porcine islet without immunosuppression. *J Clin Invest* 1996, 98: 1417-22.
262. Swenne I. Pancreatic beta-cell growth and diabetes mellitus. *Diabetologia* 1992, 35: 193-201.
263. Swift GH, Liu Y, Rose Sd, et al. An endocrine-exocrine switch in the activity of the pancreatic homeodomain protein PDX1 through formation of a trimeric complex with PBX1b and MRG1 (MEIS 2). *Mol Cell Biol* 1998, 18: 5109-20.
264. Teuscher AV, Kendall DM, Smets YF, Leone JP, Sutherland DE, Robertson RP. Succesful islet autotransplantation in humans: functional insulin secretory reserve as an estimate of surviving islet cell mass. *Diabetes* 1998, 47(3): 324-30.
265. Tillil H, Shapiro ET, Miller DA, et al. Dose-dependent effects of oral and intravenous glucose on insuline secretion and clearance in normal humans. *Am J Physiol* 1988, 254: E349.
266. Tornehave D, Larsson LI. Presence of Bcl-X1 during development of the human fetal and rat neonatal endocrine pancreas. Correlation to programmed cell death. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1997, 105: A27.

267. Toschi E, Camastra S, Sironi AM, Masoni A, Gastaldelli A, Mari A, Ferrannini E, Natali A. Effect of acute hyperglycemia on insulin secretion in humans. *Diabetes* 2002, 51; suppl 1: S130-3.
268. Tyden G, Reinholt FP, Sundkvist G, Bolinder J. Recurrence of autoautoimmune diabetes mellitus in recipient of cadaveric pancreatic grafts. *N Engl J Med* 1996, 335: 860-3.
269. Tyden G, Bolinder J, Solders G, et al. Improved survival in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and end-stage diabetic nephropathy 10 years after combined pancreas and kidney transplantation. *Transplantation* 1999, 67: 645-8.
270. Vajkoczy P, Menger MD, Simpson E, Messmer K. Angiogenesis and vascularization of murine pancreatic isograft. *Transplantation* 1995, 60: 1232-37.
271. Vajkoczy P, Vollmar B, Wolf B, Menger MD. Effects of cyclosporine A on the process of vascularization of freely transplanted islets of Langerhans. *J Mol Med* 1999, 77 (1): 111-4.
272. Van der Laan LJ, Lockey C, Griffeth BC, Frasier FS, Wilson CA, Onions DE, et al. Infection by porcine endogenous retrovirus after islet xenotransplantation in SCD mice. *Nature* 2000, 407: 90-4.
273. Vinik A, Rafaeloff R, Pittenger G, et al. Induction of pancreatic islet neogenesis. *Horm Metab Res* 1997, 29: 278-93.
274. Vuorinen-Markola H, Koivisto VA, Yki-Järvinen H. Mechanisms of hyperglycemia-induced insulin resistance in whole body and skeletal muscle of type 1 diabetic patients. *Diabetes* 1992, 41: 571-80.

275. Wang PY. Palmitic acid as an excipient in implants for sustained release of insulin. *Biomaterials* 1991, 12: 57.
276. Wang S, Beattie G, Mally M, Cirrulli V, Itkin-Ansari P, López AD, Hayek A, Levine F. Isolation and characterization of a cell line from the epithelial cells of the human fetal pancreas. *Cell Transplant* 1997, 6: 59-67.
277. Wang H, Maechler P, Ritz-Laser B, et al. Pdx1 levels define pancreatic gene expression pattern and cell lineage differentiation. *J Biol Chem* 2001, 276 (27): 25279-86.
278. Wang W, Gu Y, Hori H, Sakurai T, Hiura H, Sumi S, Tabata Y, Inoue K. Subcutaneous transplantation of macroencapsulated porcine pancreatic endocrine normalizes hyperglycemia in diabetic mice. *Transplantation* 2003, 76 (2): 290-6.
279. Warnock GL, Dabbs KD, Evans MG, Cattral MS, Kneteman NM, Rajotte RV. Critical mass of islet that function after implantation in a large mammalian. *Horm Metab Res* 1990 (suppl 25): 156-61.
280. Welsh M, Claesson-Welsh L, Hallberg A, Welsh N, Betscholtz C, Arkhammar P, et al. Coexpression of the platelet-derived growth factor (PDGF) β chain and the PDGF- β receptor in isolated pancreatic islet cells stimulates DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87: 5807-11.
281. Weir GC, Bonner-weir S, Leahy JL. Islet mass and function in diabetes and transplantation. *Diabetes* 1990, 39: 401-5.

282. Weitgasser R, Davalli AM, Capotorto JV, Finegood DT, Bonner-Weir S, Weir GC. Islet transplantation in diabetic Lewis rats—a comparison of the transplantation sites kidney and spleen capsule. *Acta Medica Austriaca* 1996, 23 (5): 156-9.
283. Wennberg L, Song Z, Bennet W, Zhang J, Nava S, Sundberg B, Bari S, Groth CG, Korsgren O. Diabetic rats transplanted with adult porcine islets and immunosuppressed with cyclosporine A, mycophenolate mofetil, and leflunamida remain normoglycemic for up to 100 days. *Transplantation* 2001, 27; 71 (8): 1024-33.
284. Williams R, Van Gaal L, Lucioni C. Assessing the impact of complications on the costs of Type 2 diabetes. *Diabetologia* 2002, 45: s5-s12.
285. Xu G, Kwon G, Marshall CA, et al. Branched Chain aminoacids are essential in the regulation of PHAS-1 and p-70 s6 kinase by pancreatic beta cells. *J Biol. Chem* 1998, 273: 28178-84.
286. Yamaoka T, Itakura M. Development of pancreatic islets (review). *Int J Mol Med* 1999, 3: 247-61.
287. Zhang YC, Pileggi A, Agarwal A, Molano RD, Powers M, Brúsko T, et al. Adeno-associated virus-mediated IL-10 gene therapy inhibits diabetes recurrence in syngeneic islet transplantation of mice. *Diabetes* 2003, 52 (3): 708-16.
288. Zimmet P, Shaw J, Alberti KG. Preventing Type 2 Diabetes and the dysmetabolic syndrome in the real world: a realistic view. *Diabetes Metab* 2003, 29 (4): 6S9-18.