

FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACTORES QUE INFLUYEN EN EL
AISLAMIENTO Y LA EFICACIA DEL
ALOTRASPLANTE DE ISLOTES
PANCREATICOS EN LA RATA WISTAR

J. ALFONSO ARRANZ MARTIN
Madrid 1995



**DON ANTONINO JARA ALBARRAN, PROFESOR TITULAR
DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLU-
TENSE DE MADRID, Y PROFESOR JEFE DEL SERVICIO DE ENDO-
CRINOLOGIA DEL HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO "GREGORIO
MARAÑON".**

CERTIFICA:

Que Don J. ALFONSO ARRANZ MARTIN, licenciado
en Medicina y Cirugia, ha realizado bajo su
tutela y dirección, el trabajo titulado:

**"FACTORES QUE INFLUYEN EN EL AISLAMIENTO Y LA
EFICACIA DEL ALOTRASPLANTE DE ISLOTES PANCREATI-
COS EN LA RATA WISTAR".**

El cual reúne todos los requisitos exigidos para
optar al Grado de Doctor en Medicina y Cirugia,
por la Facultad de Medicina de la Universidad
complutense de Madrid.

En Madrid a seis de Marzo de mil novecientos
noventa y cinco.

Una firma manuscrita en tinta que dice "Antonio Jara". La firma está escrita en un estilo cursivo y está subrayada con una línea horizontal.

Fdo. Prof. A. Jara Albarrán

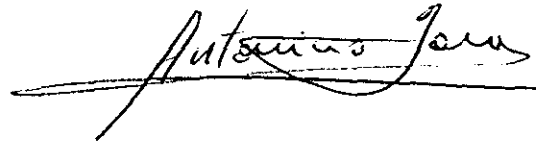
INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

D.J.Alfonso Arranz Martin ha realizado con su trabajo personal una serie de experiencias en ratas Wistar en la Unidad de Medicina y Cirugia Experimental del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, a lo largo de 1992,1993 y 1994, acerca del manejo de los islotes pancreaticos, aislamiento, purificación y posterior trasplante en ratas.

En su conjunto tanto las experiencias como la expresión, tratamiento y conclusiones de los resultados, le hacen acreedor para optar al título de Doctor en base al proyecto realizado.

V.º B.º
EL TUTOR (2)

El Director de la Tesis



Fdo.: _____
(fecha y firma)

D.N.I.:

Fdo.: Prof. A. Jara Albarrán
(fecha y firma) 6, marzo, 1995

D.N.I.: 3.361.839

INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO

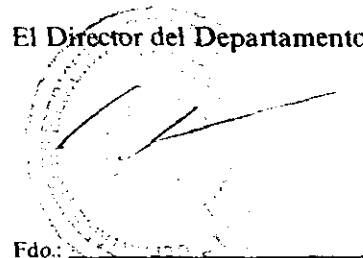
Prof. Dr. Carlos Perezagua Clamagirand, Director del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la UCM

Informa: que una vez examinado el Trabajo presentado por D. J. ALFONSO ARRANZ MARTIN, titulado: "FACTORES QUE INFLUYEN EN EL AISLAMIENTO Y LA EFICACIA DEL ALOTRASPLANTE DE ISLOTES PANCREATICOS EN LA RATA WISTAR", dirigido por el Prof. Dr. Antonino Jara Albarrán, este Departamento da su conformidad para que dicho trabajo sea leído y defendido en público con vistas a su aprobación como Tesis Doctoral.

Fecha reunión
Consejo Departamento

15-3-1995

El Director del Departamento



Fdo.: _____
(fecha y firma)

15-3-1995

A Esperanza y Nuria...
y a su próximo hermanito/a

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento al Prof. Jara Albarrán por aceptar la dirección de esta tesis y por su enorme interés y dedicación al proyecto experimental de trasplante de islotes pancreáticos, sin cuyo continuo estímulo no hubiera sido posible la culminación de esta tesis.

Al resto del grupo integrante del proyecto, Susana Alvarez, M. Carmen Martín Scapa, Beatriz Martínez y Marisa Soto por su colaboración desinteresada en el desarrollo de tareas que han formado parte de este trabajo.

A la Dra. C. Trascasa y al resto de personal del Departamento de Bioquímica del H. Gregorio Marañón por su colaboración en la realización de las determinaciones de ciclosporina en sangre.

Al personal auxiliar del animalario y mantenimiento del Pabellón de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital Gregorio Marañón por su cooperación y afable trato.

A la Dra. M. Orera de la Sección de Genética del H. Gregorio Marañón por su colaboración en la fotografía de los islotes.

A Francisco Muñoz, del Instituto Universitario Gerontológico y Metabólico, por su desinteresada orientación y ayuda en el manejo de programas informáticos necesarios para la realización de esta tesis.

A Francisco Rodríguez, de la Unidad de Epidemiología Clínica del H. de la Princesa por su orientación en el tratamiento estadístico.

INDICE

	PAG
I. INTRODUCCION.....	1
II. TRASPLANTE DE ISLOTES. ACTUALIZACION DEL TEMA.....	4
.Aislamiento de islotes pancreáticos.....	5
.Digestión con colagenasa.....	7
.Purificación de los islotes.....	8
.Valoración del aislamiento de islotes.....	12
.Islotes fetales.....	18
.Preservación y almacenaje de islotes.....	20
.Sitios de implantación.....	22
.Prevencción del rechazo en alotrasplante.....	23
.Tratamiento inmunosupresor del receptor.....	23
.Ciclosporina.....	23
.Otros inmunosupresores.....	29
.Inducción de inmunotolerancia.....	31
.Alteración de la inmunogenicidad del injerto.....	32
.Inmunoaislamiento de islotes.....	33
.Impacto sobre complicaciones crónicas de la diabetes..	35
.Prevencción de la recurrencia de la diabetes.....	36
.Trasplante insular en humanos. Estado actual.....	37
III. OBJETIVOS.....	40
IV. MATERIAL Y METODOS.....	42
.Dependencias utilizadas.....	43
.Animales.....	43

.Aparataje de uso común.....	45
.Reactivos y medios.....	46
.Aislamiento de islotes.....	50
-Extracción del páncreas.....	50
-Incubación.....	51
-Filtrado y lavados.....	52
-Purificación mediante gradientes de densidad.....	53
-Recuento y valoración de pureza.....	55
.Inducción de diabetes experimental.....	57
.Trasplante de islotes.....	59
.Test de respuesta a insulina exógena.....	62
.Administración oral de CsA.....	63
.Administración subcutánea de CsA.....	64
.Determinación de ciclosporina.....	65
.Método estadístico.....	66
V. RESULTADOS.....	68
.Variaciones de peso y glucemia pre y post-STZ.....	69
.Masa y pureza insular.....	77
.Gradientes de densidad.....	85
.Secretión estática de insulina.....	86
.Evolución glucémica tras el trasplante.....	87
.Respuesta a insulina exógena.....	99
.Ciclosporinemia tras administración oral.....	101
.Ciclosporinemia tras administración esofágica.....	102
.Ciclosporinemia tras administración subcutánea.....	103
.Análisis comparativo de CsA.....	104
.Análisis de regresión duración-masa insular.....	109
.Análisis de regresión duración-pureza insular.....	110

.Impacto de CsA extra sobre la evolución glucémica.....	111
VI. DISCUSION.....	113
.Digestión enzimática.....	114
.Gradientes de densidad.....	121
.Aspectos metabólicos.....	126
.Inmunosupresión.....	130
VII. RESUMEN.....	153
VIII. CONCLUSIONES.....	157
IX. BIBLIOGRAFIA.....	161
X. APENDICE.....	189
.Abreviaturas.....	190
.Relación de tablas y gráficas.....	191
.Fotografías.....	192

INTRODUCCION

La diabetes mellitus constituye por su prevalencia y morbilidad asociada y por la complejidad terapéutica en los casos dependientes de insulina, una entidad patológica que ocasiona una importante problemática tanto física como psicológica en la población afectada y un gran impacto a nivel social. A raíz de la introducción de la insulino-terapia en la práctica clínica en la década de los años 20, el porvenir de los pacientes diabéticos dependientes de insulina dejó de ser infausto a corto plazo pero en cambio se comenzaron a poner de manifiesto una serie de complicaciones tardías que la mayor longevidad de la población diabética permitió aflorar. El progresivo desarrollo de los sistemas de elaboración y comercialización de la insulina ha permitido en las últimas décadas, sobre la base empírica - claramente asumida en la actualidad- del papel que la hiperglucemia podría jugar en la patogenia del daño vascular, la creciente intensificación del tratamiento insulínico con idea de intentar normalizar la homeostasis glucídica y paliar el deterioro visceral.

Desafortunadamente este equilibrio metabólico es demasiado complejo para lograr ser recreado mediante un sistema tan grosero como la insulino-terapia exógena, y ni los avances en la elaboración de insulina y análogos, ni los sistemas implantables de infusión, ni la intensificación de los métodos de control han conseguido erradicar suficientemente las complicaciones micro-macroangiopáticas.

Esto ha alentado el desarrollo en los últimos años de otras estrategias terapéuticas, tales como la detección diagnóstica en fases muy iniciales de la enfermedad (prediabetes) y el "frenado"

inmunológico del proceso autoinmune -inmunoterapia- o la reposición de la masa de células beta perdida mediante el trasplante, bien de páncreas como órgano completo vascularizado, bien de su porción endocrina de forma aislada- islotes pancreáticos.

En la actualidad el trasplante de páncreas se ha realizado en más de 6000 pacientes, sólo o en combinación con un trasplante renal. No obstante su morbimortalidad asociada es sustancial cuando se compara con el trasplante renal aislado (en series del grupo más experimentado -Minneapolis- la supervivencia de pacientes al año es del 85% en el trasplante combinado frente al 96% del trasplante renal de donante vivo o el 93% en el caso de donante de cadáver, incrementándose estas diferencias de un modo alarmante cuando el paciente es mayor de 45 años) (Sutherland 1993). La supervivencia del injerto asimismo es mucho mas pobre que cuando se compara con el cardíaco o renal (a 1 y 5 años el 74% y 62% permanecen funcionantes respectivamente). Si a ésto añadimos la necesidad de una inmunosupresión crónica con los riesgos que derivan de ello no es extraño que surja la necesidad de otras alternativas de reposición de la masa insular que eviten estos problemas.

El trasplante de islotes pancreáticos podría ofrecer una serie de ventajas frente al de órgano completo: resulta mucho más selectivo, obviando la necesidad de transplantar tejido exocrino, su morbilidad es mínima al tratarse de una técnica que puede realizarse mediante cateterización percutánea, permite criopreservar el material insular y así hacer posible un almacenamiento en bancos de islotes disponibles por tiempo

indefinido. Pero, con todo, la principal ventaja teórica y la que lo situaría muy por delante de otras técnicas sería la posibilidad de manipular inmunológicamente los islotes para hacerles perder su antigenicidad y posibilitar así una tolerancia del injerto sin el concurso de drogas inmunosupresoras permanentes. Pero es aquí donde parecen haber chocado las expectativas creadas en años anteriores. Frente a los resultados experimentales iniciales que parecían reducir o anular el potencial antigénico mediante diversas técnicas que se detallarán en el contenido de este trabajo, el islote se ha venido a caracterizar como especialmente inmunogénico a pesar de los importantes avances en el proceso de purificación e incluso de inmunoaislamiento y hasta el momento actual no ha sido posible la tolerancia al injerto en humanos sino con una importante combinación de inmunosupresores.

A pesar de estas dificultades es tal el empeño en vencerlas que todo hace suponer que en los próximos años se producirán innovaciones en este campo que ayuden a combatir los problemas de rechazo que ahora se plantean.

El trabajo que aquí se expone no es sino un abordaje parcial al problema de la tolerancia del injerto insular en experimentación animal. Si bien los aspectos relacionados con el rechazo inmunológico son múltiples y complejos, así como la forma de acercarse a ellos, pensamos que cualquier profundización en este tema puede aportar una serie de datos y reflexiones que, sumados a otros tantos, contribuya a un mejor conocimiento y a resolver los problemas planteados en la tolerancia inmunológica en el trasplante de islotes pancreáticos.

**TRASPLANTE DE ISLOTES
ACTUALIZACION DEL TEMA**

AISLAMIENTO DE ISLOTES PANCREATICOS

La posibilidad del trasplante de islotes pancreáticos como alternativa al de órgano completo vascularizado ya estaba presente a principios de siglo (Ssobolew 1902). En la década de los años 50 se realizaron una serie de estudios que demostraron que la vascularización inmediata no era esencial para el trasplante de tejido endocrino (Browning y col. 1951, Brooks y col. 1959). No obstante los primeros intentos de trasplante de fragmentos pancreáticos no ofrecieron resultados positivos debido a la autodigestión de que era objeto el injerto por parte de las enzimas exocrinas. La dispersión de los islotes dentro del páncreas y su escasa presencia relativa (1-2% del volumen glandular total) constituía un gran problema a la hora de obtener tejido insular viable.

El proceso de aislamiento de islotes de Langerhans comenzó a desarrollarse en la década de los años 60 coincidiendo con la introducción de la colagenasa como medio para producir la liberación de los islotes del tejido exocrino circundante (Moskalewsky 1965). Un importante paso fue el dado por el grupo de Lacy al provocar una distensión previa del páncreas mediante la inyección intraductal de solución de Hank (Lacy y Kostianovsky 1967), tras lo cual el páncreas era desmenuzado con tijeras e incubado en una solución de colagenasa. Este método permitía obtener islotes intactos que podían ser separados del resto del material resultante del proceso de digestión. No obstante la obtención de suficiente número de islotes con vistas al trasplante constituía un problema de orden práctico. Por ello

comenzaron a desarrollarse métodos de separación de los islotes mediante la centrifugación en gradientes de densidad. Inicialmente se utilizó sacarosa como medio para la constitución de estos gradientes, siendo posteriormente sustituida por otros medios entre los que destacó la solución de Ficoll (Ballinger y Lacy 1972), que se convirtió en la más usada durante las siguientes décadas.

La implantación de la técnica de Lacy y Kostianovsky hizo posible el desarrollo de un importante número de estudios metabólicos, inmunológicos y de trasplante en roedores. Desafortunadamente los intentos de extrapolar estas técnicas a mamíferos superiores incluido el humano no ofrecieron los resultados esperados en cuanto a número, pureza y viabilidad insular. La naturaleza más compacta del páncreas de los mamíferos grandes dificultaba la distensión del páncreas mediante la solución de Hank. Esto se solucionó parcialmente al sustituir dicha solución por la inyección intraductal de colagenasa, lo cual consiguió mejorar el aislamiento de islotes en perros (Horaguchi y col. 1981), humanos (Gray y col. 1984), monos (Gray y col. 1986) y cerdos (Ricordi y col. 1986).

A causa de esta importante mejora del aislamiento de islotes en mamíferos grandes, la inyección intraductal de colagenasa se introdujo también en ratas (Sutton y col. 1986).

DIGESTION CON COLAGENASA

El análisis histológico del páncreas de diversas especies muestra una estructura glandular compuesta por una fina malla de fibrillas de colágeno tipo 3 que unen los acinis entre sí y éstos con los islotes. Además, condensaciones mucho más densas de tejido fibroso que contiene colágeno tipo 1, 3 y 5 forman los septos interlobulillares y rodean los vasos sanguíneos y ductus, al igual que la cápsula pancreática (McShane y col. 1990). El contenido fibroso es mucho mayor en mamíferos grandes en comparación con los roedores.

La inyección intraductal de colagenasa resulta en una dispersión de la solución a través de toda la glándula que produce una distensión del páncreas y una ruptura progresiva del tejido fibroso interacinar y de la cápsula periislote, dejando intacta el tejido fibroso intraislote si la incubación no se prolonga excesivamente. Los septos interlobulillares, zonas perivasculares y cápsula pancreática se afectan en menor medida (Van Suylichem y col. 1987) por la acción de la colagenasa.

De esta forma los islotes son liberados de sus conexiones fibrosas con los acinis, pero para liberar a los islotes de los septos interlobulillares y cápsula es preciso potenciar el efecto de la colagenasa mediante una agitación mecánica. La incubación no debe prolongarse una vez conseguida la liberación de los islotes para evitar que estos se fragmenten por la afectación del tejido fibroso intraislote.

PURIFICACION DE ISLOTES

Tras el proceso de digestión, una vez liberados los islotes del resto de la estructura pancreática, debe llevarse a cabo una serie de procesos encaminados a conseguir unos islotes máximamente purificados. El objeto de ello es mejorar la implantación de los islotes y reducir la inmunogenicidad del injerto. Por otra parte, cualquier manipulación inmunológica previa al trasplante exige trabajar con preparaciones de islotes altamente purificados.

Desde la implantación de la técnica de Lacy y Kostianowsky en 1967 para el aislamiento de islotes de rata, la cual utilizaba gradientes de densidad discontinuos preparados con diferentes soluciones de sacarosa, el sistema empleado por la mayoría de los grupos de investigación para la purificación de los islotes ha sido precisamente este sistema, es decir, la separación isopícnica mediante gradientes de densidad preformados. Lo que ha ido variando con el tiempo ha sido el medio utilizado para formar estos gradientes.

La separación celular por centrifugación se basa en diferencias de densidad o en diferencias de velocidad de sedimentación. Los dos determinantes mayores en la tasa de sedimentación de una célula en un medio determinado son su diámetro y la diferencia de densidad entre la célula y el medio. La sedimentación por velocidad se consigue centrifugando células durante un tiempo determinado en un gradiente con una densidad lo más alejada posible de la de las células que se pretenden separar.

Por contra, la separación dependiente de la densidad o isopícnica

se consigue centrifugando durante el tiempo y a la velocidad necesarios para sedimentar las células en la fase donde su densidad sea igual a las del gradiente correspondiente. Las células de los acinis pancreáticos son uno de los pocos tipos de células que pueden separarse de forma eficaz mediante centrifugación isopícnica. La separación isopícnica produce desiguales resultados en células pancreáticas de especies diferentes. Mientras que en roedores se consigue de forma bastante eficaz, en humanos es más dificultosa dado que tanto la densidad como el diámetro celular del tejido exocrino, y en menor medida los islotes, cambian de una preparación a otra, produciéndose con frecuencia solapamientos en la diferenciación de los tejidos exocrino y endocrino y determinando unas preparaciones impuras.

Los islotes humanos varían normalmente entre las 15 y 500 micras de diámetro y su tamaño, al igual que el de las células acinares, se ve afectado por el proceso de digestión con colagenasa. La densidad media de los islotes humanos en condiciones fisiológicas de osmolaridad es de 1.059 g/ml mientras que el del tejido exocrino varía entre los 1.059 y 1.074 g/ml. La densidad del tejido exocrino es variable en función del estatus secretorio de las células acinares. Su gran capacidad de síntesis y almacenaje proteico hacen que, en presencia de un estímulo secretorio, la degranulación y liberación de sus productos de secreción hace que disminuya la densidad celular respecto a condiciones basales. Otras causas de la variación de densidad del tejido exocrino son la formación de agregados celulares por la acción de la

colagenasa y la heterogenicidad del tejido (acinar, ductal, centroacinar). Por tales motivos se han ideado varias fórmulas destinadas a mejorar la separación isopícnica, como prevenir o minimizar la degranulación de las células exocrinas y el edema de las mismas. Asimismo la fase de digestión con colagenasa debe ser lo más corta posible para evitar una sobreactuación de la enzima una vez conseguida una separación adecuada de los islotes, al tiempo que se deben evitar temperaturas superiores a los 39°C, minimizar al trauma físico, etc.

La utilización de gradientes de densidad hipertónicos parece aumentar la densidad del tejido exocrino, incrementando por tanto la diferenciación de densidad respecto a los islotes (Olack y col. 1991).

El lavado y almacenaje del producto de digestión pancreática en solución UW previo al proceso de gradientes disminuye el edema tanto del tejido acinar como del endocrino, aumentando por tanto la densidad de ambos aunque proporcionalmente más en el primero, con lo que se consigue mejorar la purificación (Van der Burg y col. 1990).

Medio para los gradientes de densidad

Han sido descritos, tal como vimos anteriormente, una serie de medios para la constitución de los gradientes de densidad utilizados en la purificación de los islotes, entre los que se encuentra la sacarosa (Lacy y col. 1967), Ficoll (Lindall y col. 1969) , Ficoll dializado (Scharp y col. 1973), Ficoll hypaque (Tze y col. 1976), metrizamida (Raydt y col. 1977), Percoll (Buitrago y col. 1977), Ficoll Conray (Okeda y col. 1979), dextrano (Hehmpke 1986), albúmina bovina sérica (BSA) (Lake y col. 1987), Ficoll-diatrizoico y Nycodenz (Hering y col. 1990). En la purificación de islotes humanos los medios más utilizados han sido el Euroficoll y la BSA hipertónica (500 mosm/kg de H₂O). Las ventajas de uno u otro han sido motivo de debate, tal como refleja la literatura (Lake y col. 1987, James y col. 1990). La solución de Ficoll tiene las ventajas de formar soluciones más claras y no derivar de fuentes animales pero provoca agregación celular. La BSA en cambio tiene un efecto protector de las células y minimiza la agregación de éstas; en cambio su procedencia biológica favorece la contaminación. Además su osmolaridad puede ser variable en función del lote utilizado. Tomando las necesarias precauciones con uno u otro, ambos medios se muestran altamente eficaces en la purificación de los islotes.

VALORACION DEL AISLAMIENTO DE ISLOTES

Se han propuesto varios procedimientos para la valoración del aislamiento de islotes. En ausencia de unos criterios estandarizados, la interpretación y comparación de resultados es tarea imposible. Por ello, en el 2º Congreso sobre Trasplantes de Páncreas e Islotes (Minneapolis 1989) se desarrolló un consenso de criterios de valoración del aislamiento de islotes en grandes mamíferos, incluido humanos (Ricordi y col. 1990).

Numero, volumen y pureza

Dada la tendencia a la sedimentación de los islotes una vez aislados y formada la preparación, es preciso provocar una suspensión homogénea previa a la toma de la muestra para determinar el número y pureza. Para evitar errores de recuento es preferible recoger varias muestras a modo de alícuotas para calcular estos parámetros.

Aunque es posible distinguir los islotes del tejido exocrino con microscopio, se recomienda utilizar un método de tinción rápido y específico tal como la ditizona (Latif y col. 1988). Este colorante se une al zinc de la molécula de la insulina contenida en los gránulos de secreción de la célula beta tiñéndola de un color rojizo de modo que los islotes son fácilmente diferenciables y contables.

Debido al diferente tamaño de los islotes, cuyos diámetros pueden variar entre las 15 y 500 micras, se ha estipulado un diámetro medio de 150 micras para lograr una normalización de criterios a la hora de establecer un recuento de islotes. A esta medida

estándar se le denomina número equivalente de islotes (EIN). Utilizando unos factores de conversión se unifica como EIN el recuento de islotes en función del tamaño de éstos. Para lograr este propósito se dispone de unas rejillas graduadas que se colocan en el visor del microscopio. Como alternativa se puede calcular el número total de islotes a partir del volumen total de la preparación .

Otros sistemas más sofisticados incluyen métodos automatizados que utilizan analizadores de imagen computarizados que, si bien son más objetivos, añaden una complejidad y costo excesivo al proceso.

Para valorar la pureza de la preparación se han propuesto varios métodos. Entre ellos el cociente insulina/ amilasa y ciertas ecuaciones algebraicas. Otros sistemas más selectivos son las tinciones específicas y los anticuerpos monoclonales, aunque el método con más implantación lo constituye por su sencillez la utilización de ditizona como marcador de los islotes permitiendo valorar de forma aproximada la pureza de los islotes obtenidos.

Viabilidad de los islotes

Los estudios de viabilidad celular en general incluyen análisis de integridad de la membrana celular, incorporación de nucleótidos, contenido enzimático y cociente respiratorio, los cuales constituyen propiedades anabólicas o catabólicas de las células. En el caso de los islotes los estudios fisiológicos incluyen mediciones de biosíntesis y secreción de insulina en respuesta a diferentes estímulos, análisis de respiración celular y de permeabilidad de membrana. Este último es especialmente útil en la valoración previa al trasplante debido a su escasa complejidad y rapidez de determinación. Existen ciertos colorantes como el rojo neutro y el azul de tripano que tiñen respectivamente de modo selectivo células vivas y células muertas (Gray y col. 1983).

Los contrastes fluorométricos de inclusión y exclusión han sido utilizados simultáneamente para valorar la proporción de células intactas y dañadas de la preparación. El acetato de fluoresceína (FDA) atraviesa libremente la membrana de las células vivas y, tras hidrolizarse a fluoresceína libre, queda atrapada en la membrana intacta. La naranja de acridina (NA) también es permeable a través de la membrana intacta originando una diferenciación de las células vivas. La combinación de estos colorantes de inclusión con otros de exclusión como son el bromuro de etidio (BE) y el yoduro de propidio (YP) han sido extensamente utilizados en estudios de viabilidad insular, tiñendo selectivamente las células vivas y muertas con una coloración diferente (Gray 1987, Bank 1988).

Estudios in vitro

La obtención de un gran número de islotes de elevada pureza, siendo de gran importancia, no es condición única para un proceso de aislamiento exitoso ya que durante dicho proceso puede resultar afectada el funcionamiento del islote aunque persista éste como un elemento viable. Es por tanto importante analizar la capacidad de la célula beta para responder a estímulos secretorios, o bien valorar otras funciones celulares para aseverar la integridad funcional de la masa insular.

Entre los métodos utilizados para este fin destaca la medición de la liberación de insulina, bien tras estimulación secuencial con distintas concentraciones de glucosa- incubación estática (Ashcroft y col. 1971) o en el seno de un sistema de perfusión continuo (Lacy y col. 1976). Otros métodos son la medición de la tasa de oxidación de la glucosa, de la utilización de O_2 o de la síntesis proteica (insulina).

El sistema de perfusión provee un perfil dinámico de la liberación de insulina mediada por la glucosa a partir de la insulina almacenada y sintetizada "de novo" y de la capacidad de regulación de la secreción según la variación del nivel de estimulación (Devalli 1991). De un modo esquemático, la perfusión consiste en reunir grupos de 200-300 islotes dentro de unas cámaras porosas por donde fluye un líquido (generalmente Krebs- Ringer) a una determinada velocidad y presión, enriquecido con glucosa a 50, 100 y 500 mg/dl según las diferentes fases. El efluente de las cámaras es analizado periódicamente durante cada una de las etapas y se determina su contenido en insulina mediante RIA.

Aunque la perfusión aporta datos muy importantes a la hora de evaluar la funcionalidad del islote, estos no aseguran de forma contundente una adecuada implantación y función de los islotes tras el trasplante (Rajotte y col. 1989). Por tanto, la prueba definitiva de la integridad funcional de los islotes lo constituye la corrección de la hiperglucemia de un receptor diabético al que se han trasplantado un número de islotes adecuado, lo cual atestigua tanto la integridad funcional como la viabilidad necesaria para lograr la implantación en un lugar heterotópico del tejido insular. Cuando el sitio de implantación corresponde a un órgano no vital o, cuando menos prescindible, como es el caso del espacio subcapsular renal, la extirpación del órgano ratificará el origen de la secreción insulínica, revertiendo el animal a su estado diabético previo. En el caso del implante hepático esto no es posible sin sacrificar al animal y proceder a un estudio inmunohistoquímico hepático usando anticuerpos anti-insulina aunque es posible una valoración indirecta mediante la determinación de insulina plasmática simultánea en vena cava, porta y suprahepáticas y valorando el gradiente de su concentración (Alvarez y col. 1994).

Estudios *in vivo*

Para valorar *in vivo* la viabilidad de una preparación de islotes sin añadir problemas relacionados con el rechazo del trasplante hay que recurrir al modelo singénico en roedores o al trasplante autólogo en mamíferos grandes. En el caso de islotes humanos se han llevado a cabo trasplantes a ratones atímicos (Povlsen y col. 1974), los cuales padecen un defecto del sistema inmune debido a una aplasia tímica que les hace aceptar tejido xenogénico sin problemas de rechazo (Mandel y col. 1984, Lake y col. 1989).

Varios grupos han demostrado la reversibilidad de la hiperglucemia en modelos de experimentación atímicos con diabetes inducida tras un trasplante xenogénico (Buschard y col. 1976, Tuch y col. 1984) aunque la valoración del mismo se ve dificultada por la gran morbilidad y la pobre supervivencia de estos animales tan inmunocomprometidos.

ISLOTES FETALES

El páncreas fetal tiene la ventaja sobre el adulto de que posee un bajo contenido en enzimas exocrinas y una mayor proporción de islotes frente a otros tipos celulares, presentando asimismo una capacidad de replicación mayor que los islotes adultos, con el consiguiente incremento de la masa insular que se debe tanto a hiperplasia como a hipertrofia celular. Entre sus desventajas, presentan una pobre capacidad de liberación de insulina en respuesta a la glucosa y a otros estímulos probablemente debido a la inmadurez de sus enzimas mitocondriales (Maitland y col. 1980). Esta inmadurez de la célula beta fetal es la responsable de que el trasplante de islotes fetales no sea funcionante hasta varias semanas o meses tras el mismo (Ricordi y col. 1988). En lo referente a su capacidad antigénica, contrariamente a lo que en un principio se creía, los islotes fetales presentan un alto grado de inmunogenicidad. El páncreas fetal presenta antígenos de histocompatibilidad de tipo I en la mayoría de sus estructuras celulares y de tipo II en las células dendríticas y linfocitos aunque no en el endotelio vascular (Danilovs y col. 1982). Estudios en roedores sometidos a trasplante isogénico de islotes fetales han demostrado una diferenciación del tejido endocrino postrasplante mientras que el tejido exocrino pierde su viabilidad (Mandel y col. 1979). El contenido en insulina del injerto aumenta progresivamente tras el trasplante y los niveles de glucosa se normalizan a las 3 a 12 semanas. El tratamiento insulínico postrasplante y el cultivo previo de los islotes durante 9 a 23 días reduce de forma importante el número de

páncreas necesarios para un trasplante eficaz (Brown y col. 1981, Collier y col. 1984). El lugar de implantación más adecuado parece ser bajo la cápsula renal.

Los islotes fetales humanos se han utilizado de forma experimental en el trasplante a ratones atímicos diabéticos demostrando que fuera de su ambiente habitual siguen mostrando una capacidad de crecimiento del tejido y una funcionalidad correctas si se evita el fenómeno de rechazo (Hullet y col. 1987).

PRESERVACION Y ALMACENAJE DE ISLOTES

La preservación de la masa insular ha sido posible gracias al desarrollo de las técnicas de cultivo. Los islotes de roedores mantenidos en cultivo durante días o semanas pueden sintetizar y secretar insulina en respuesta a estímulos apropiados (Anderson y col 1977, Nakagawara y col. 1978). Los islotes de roedores mantenidos mediante cultivo en una fase gaseosa conteniendo un 90-95% de oxígeno a 24°C han demostrado su capacidad para revertir la diabetes tras su implante singénico o alogénico (Bretzel y col. 1981, Scharp y col. 1974). El cultivo durante un mínimo de 7 días ha demostrado además la ventaja de reducir la inmunogenicidad de los islotes al conseguir una eliminación de las células presentadoras de antígenos (Lacy y col. 1979).

Mientras que las técnicas de cultivo se utilizan de forma habitual para períodos de preservación intermedia, cuando se pretende un almacenaje de los islotes superior a los 7-14 días se debe recurrir a la criopreservación. Durante el almacenaje a -190°C la actividad funcional de la célula se reduce de tal forma que, teóricamente, el impacto sobre la viabilidad celular durante años sería mínima (Kneteman y col. 1990). Islotes de roedores han sido criopreservados de forma satisfactoria por varios investigadores tal como ha sido demostrado mediante estudios *in vitro* e *in vivo* (Bank y col. 1979, Sandler y col. 1986). Igualmente ha sucedido con islotes de mamíferos grandes y de humanos (Warnock y col. 1987, Rajotte y col. 1983). A pesar de los evidentes progresos en la criopreservación de islotes pancreáticos, existe aún una considerable controversia en lo

referente a las condiciones óptimas necesarias para este procedimiento si bien en la mayoría de los casos la mejor viabilidad funcional ha sido obtenida con tasas de congelación lenta (menor o igual a $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$), junto a una rápida descongelación, del orden de $150\text{-}200^{\circ}\text{C}/\text{min}$. (Rajotte y col. 1992)

SITIOS DE IMPLANTACION

En experimentación animal se han ensayado varios sitios de implantación de islotes con distintos grados de efectividad. Métodos como la embolización de islotes en pulmón a través de una vena sistémica, inyección directa en hígado o bazo, tejido subcutáneo, intramuscular, intrapancreático, intraprostático, etc. se han mostrado poco efectivos (Sutherland 1981). Otros lugares con mejor grado de implantación han sido la vía intracerebral o intraventricular, la cámara anterior del ojo, la embolización esplénica vía vena esplénica, el testículo y la cavidad peritoneal, aunque los lugares más ventajosos y más estudiados han sido con diferencia la embolización hepática vía intraportal y el espacio subcapsular renal (Kemp y col. 1973, Koncz y col. 1976). Ambos sitios están altamente vascularizados y permiten una buena eficiencia metabólica de los islotes trasplantados. Si bien el espacio subcapsular renal ha sido considerado como un sitio inmunológicamente privilegiado (Woehrle y col. 1990), la inyección intraportal ofrece la ventaja de poder llevarse a cabo en mamíferos grandes y humanos a través de la permeabilización de la vena umbilical, disminuyendo de esta forma la morbilidad quirúrgica de forma importante. Incluso la inyección de los islotes en hígado puede ser efectuada mediante punción transparietal, con la sola ayuda de un radiólogo intervencionista, eludiendo de esta forma la cirugía.

PREVENCIÓN DEL RECHAZO EN EL ALOTRASPLANTE

Los islotes pancreáticos son altamente susceptibles a los mecanismos de respuesta inmunológica del receptor de un alotrasplante por lo que son destruidos a los pocos días de su implantación. Aunque se ha atribuido una cierta condición de privilegio inmunológico a ciertos lugares de implantación como el espacio subcapsular renal en roedores, lo cierto es que un alotrasplante de islotes adultos frescos será rechazado rápidamente si no se toman medidas para evitarlo. Para hablar de rechazo deben reunirse una serie de condicionamientos previos que eviten una falsa interpretación de aquél, como son un número adecuado de islotes trasplantados, un lugar apropiado, y la existencia de normoglucemia previa antes de que ocurra el rechazo.

1. TRATAMIENTO INMUNOSUPRESOR DEL RECEPTOR

En el alotrasplante de islotes en roedores han sido utilizados varios agentes inmunosupresores y diversos protocolos de inmunosupresión.

CICLOSPORINA

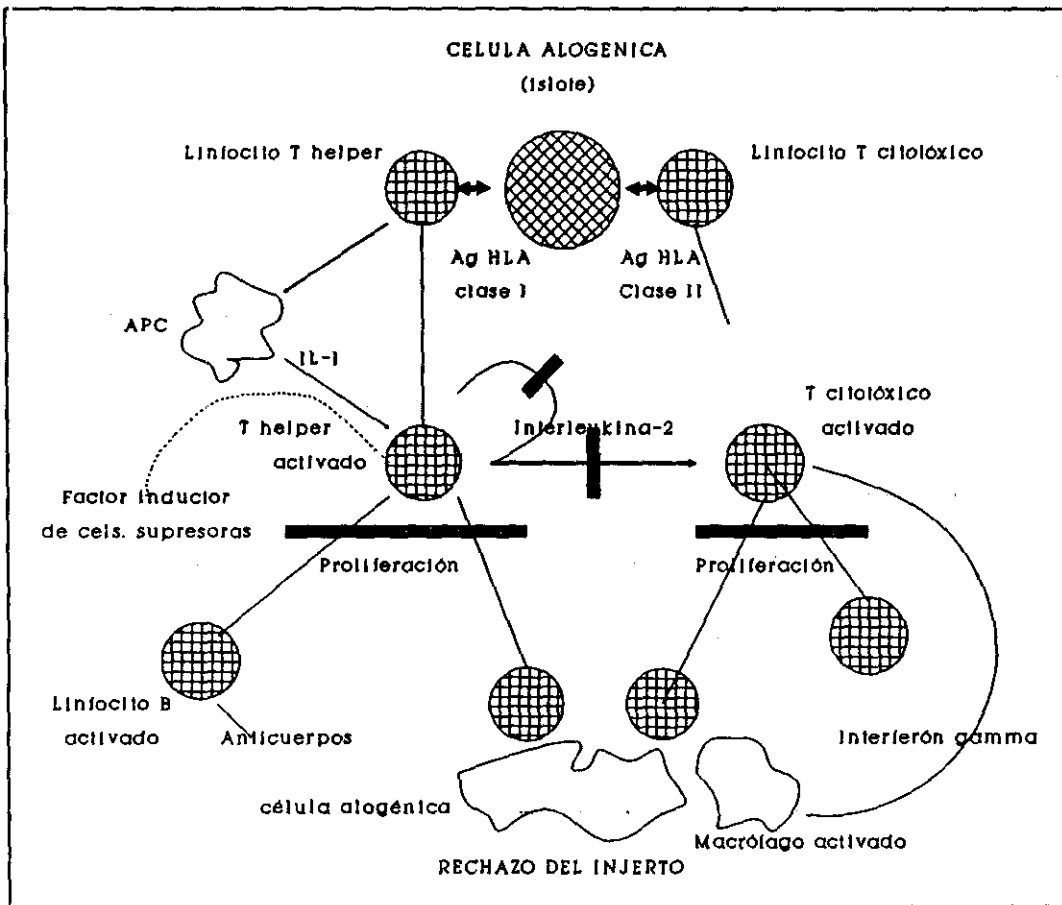
La ciclosporina (CsA) es un derivado fúngico con una estructura undecapeptídica cíclica y un peso molecular de 1.203, que ejerce sus efectos esencialmente sobre las subpoblaciones linfocitarias relacionadas o inducidas por los linfocitos T helper o facilitadores (figura 1).

Las células B, macrófagos, granulocitos y células NK (natural killer) no muestran un funcionalismo alterado en presencia de CsA.

Aunque la administración de CsA al tiempo del contacto antigénico, previamente a la activación de las células B, suprime la producción de anticuerpos, la respuesta en marcha no resulta alterada (Borel y col. 1977).

Por contra, sus efectos inhibitorios directos sobre la respuesta de las células T han sido claramente demostradas *in vitro* (Borel 1976, Hess y col. 1980). Al igual que con la producción de anticuerpos, la supresión sólo ocurre cuando la droga se halla presente en las primeras etapas de la respuesta inmunológica. Las funciones efectoras de las células T citolíticas o supresoras activadas no resultan alteradas.

La CsA inhibe la producción de interleukina 2 por poblaciones T helper en diversos modelos experimentales. La supresión de la proliferación y generación de linfocitos T citotóxicos en cultivos mixtos de linfocitos primarios y secundarios se asocia con una dramática inhibición de la producción de interleukina 2 (Hess y col. 1982).



GRAFICA 1. Efectos de la ciclosporina sobre la activación de las células T. CsA impide la proliferación tanto de los linfocitos T citotóxicos como de los facilitadores (helper), al tiempo que suprime la producción de interleukina 2 por las poblaciones T helper. Además de estas acciones favorece la diferenciación y el mantenimiento de las subpoblaciones T supresoras activadas por el aloantígeno (las barras representan los pasos de la cascada inmunológica que son bloqueados por CsA).

Además de la depresión de la función de las células T helper inductoras y de la inhibición de la producción de interleukina 2 con la subsecuente abolición de la proliferación de las células T citotóxicas, la CSA proporciona un ahorro de las subpoblaciones T supresoras (Hess y col. 1981), de forma que dosis de CSA capaces de suprimir de forma marcada la inducción de células T citolíticas permiten la diferenciación de células T supresoras activadas por el aloantígeno, jugando estas células supresoras un papel primordial en el mantenimiento de la tolerancia al injerto (Cohen y col. 1984, Kupiec-Weglinski y col. 1984).

Farmacocinética

Absorción: Debido a su baja hidrosolubilidad la administración oral de CSA debe ser efectuada mediante una solución oleosa. La absorción comienza entre 30 y 60 minutos tras la ingestión y se alcanzan las mayores concentraciones plasmáticas entre las 3 y las 4 horas. La biodisponibilidad por vía oral corresponde a un 20 a 50% de la conseguida tras la administración endovenosa de la droga.

Distribución: La CSA se une fuertemente a las proteínas plasmáticas, especialmente a las lipoproteínas, de modo que un 90% de la dosis plasmática total se halla unida a ellas. En un rango entre los 50 y los 500 ng/ml la unión de la molécula a las proteínas parece incrementarse de forma lineal. Debido a su alta liposolubilidad su afinidad a los tejidos es muy alta. Inicialmente se fija a hígado, riñón, páncreas, suprarrenales, timo, tiroides y grasa perirrenal pero conforme se continua su

administración comienza a fijarse a piel y tejido graso. La distribución compartimental de la droga así como su eliminación puede asignarse a un modelo triexponencial, con vidas medias de 0.1, 1.1 y 16 horas.

Metabolismo: Las rutas de biotransformación parecen ser similares en todas las especies estudiadas. CsA es lenta pero extensamente metabolizada en hígado por el sistema enzimático citocromo P-450. Además de la molécula madre se han detectado numerosos metabolitos de los cuales 9 han sido aislados e identificados en sangre total. Todos conservan la estructura oligopeptídica cíclica de la molécula madre intacta. Las modificaciones estructurales consisten en mono y dihidroxilación y N-dimetilación en varios sitios de la molécula. En el momento presente no queda totalmente aclarado si la nefrotoxicidad de la CsA es el resultado de los niveles tóxicos de la molécula madre, de los metabolitos o de una combinación de ambos.

Eliminación: La ruta principal de eliminación de la CsA y sus metabolitos es la excreción biliar. Solo un pequeño porcentaje, cercano al 6% de la droga se elimina por orina, del cual únicamente un 0.1% corresponde a la molécula intacta.

La toxicidad de la CsA, especialmente la renal y hepática, junto con la variabilidad intra e interindividual en su farmacocinética hacen que la monitorización de los niveles plasmáticos del fármaco sean de crucial importancia a la hora de conseguir unos niveles terapéuticos eficaces evitando a la par sus efectos colaterales.

La determinación de la CsA plasmática puede realizarse mediante

métodos de radio o enzimoimmunoanálisis (RIA o EIA) o HPLC (cromatografía líquida de alta presión). En la pasada década los inmunoanálisis han ido evolucionando, pasando de la utilización de anticuerpos policlonales no específicos que medían tanto la molécula nativa de CsA como sus metabolitos, a anticuerpos monoclonales específicos con una alta reproducibilidad de la molécula nativa que guarda una estrecha correlación con los resultados obtenidos mediante HPLC. La idoneidad de uno y otro método ha sido motivo de controversia (Holt y col. 1984, Woloszczuk y col. 1984, Rosenthaler y col. 1990) aunque el RIA ha tenido una mayor implantación en base a su mayor disponibilidad y su menor coste, junto al conocimiento de los efectos nefrotóxicos que poseen los propios metabolitos de la droga, detectados como se ha dicho por ciertos RIA pero no por HPLC. No obstante hay situaciones que hacen preferible la utilización de HPLC. En situaciones de insuficiencia hepática o administración concomitante de fármacos inductores o inhibidores de la actividad enzimática microsomal hepática se pueden producir cambios importantes en la biotransformación y eliminación de CsA y de sus metabolitos que pueden afectar la lectura de los niveles sanguíneos de la droga mediante RIA, siendo en estos casos más adecuado la medición exclusiva de la molécula nativa mediante HPLC. Fuera de estos casos la monitorización de la CsA en sangre puede ser realizada con gran fiabilidad mediante inmunoanálisis (RIA o EIA) que utilizan anticuerpos monoclonales.

OTROS INMUNOSUPRESORES

Corticoides, azatioprina, ciclofosfamida, FK506, suero y gammaglobulina antilinfocítica (ALS, ALG) o antitimocítica (ATG), OKT3, deoxispergualina y anticuerpos monoclonales específicos anti-CD4 y anti-CD8 han sido empleados solos o en asociación (Sutherland 1981, Kneteman y col. 1989) en el alotrasplante experimental.

Aunque con varios protocolos de alguno de estos agentes, solos o en combinación, se ha conseguido una cierta prolongación de la normoglucemia, una reversibilidad indefinida de la diabetes ha sido lograda con mucha menos frecuencia.

En roedores ha mostrado su eficacia el empleo de preparaciones de anticuerpos policlonales (ALS, ALG, ATG) tanto en el alotrasplante (Beyer y Friedman 1979), como en el xenotrasplante rata-ratón (Barker y col. 1977), si bien en mamíferos grandes no han resultado efectivos.

Recientemente ha sido descrita la acción sinérgica y potenciadora de la combinación ciclosporina-rapamicina en el alotrasplante insular, con la ventaja añadida de una minimización de la toxicidad derivada de la menor dosis necesaria (Yakimets y col. 1993).

15-deoxispergualina es un nuevo agente inmunosupresor que inhibe varias funciones macrofágicas. Su utilización en la inducción de inmunosupresión puede reducir el daño de los islotes mediado por macrófagos en el proceso de implantación (Walter y col. 1987). Deben considerarse los efectos negativos que pueden acarrear ciertos agentes. Así, los glucocorticoides provocan

insulinorresistencia, la azatioprina parece inhibir la liberación de insulina. La droga FK 506, que ha demostrado su eficacia en la prevención del rechazo, también parece tener efectos negativos sobre la funcionalidad del islote (Yasunami y col. 1990). Igualmente la CsA puede afectar negativamente la secreción de insulina y la implantación de la masa insular (Viviani y col. 1989, Rooth y col. 1989, Anderson y col 1984)

Por tanto, al menos con vistas a ensayos clínicos, son precisas otras estrategias de intervención inmune para intentar mejorar la efectividad del trasplante.

2. INDUCCION DE INMUNOTOLERANCIA

Se han desarrollado diversas estrategias experimentales para lograr un estado de tolerancia del receptor tales como la inyección de antígenos del donante (Vialeto y col. 1978), la inyección de médula ósea tras radiación total subletal (Kramp y col. 1975) o la inyección intratímica de islotes junto a suero antilinfocítico (Posselt y col. 1990). Esta última permite la tolerancia indefinida de un ulterior trasplante extratímico el mismo donante.

Aunque algunos de estos protocolos han sido exitosos en experimentación animal, las condiciones en que se llevan a cabo o la naturaleza de la intervención misma hacen que sean irreproducibles en humanos por lo que pierden su interés clínico.

3. ALTERACION DE LA INMUNOGENICIDAD DEL INJERTO

La consideración del papel determinante que juegan las células presentadoras de antígenos o leucocitos pasajeros en la inducción del proceso de rechazo ha motivado una serie de acercamientos encaminados a eliminar o reducir selectivamente a estas células mediante diversas manipulaciones de los islotes previas al trasplante.

El cultivo de islotes a bajas temperaturas (24°C) o a 37°C en condiciones de alto contenido de oxígeno (95%) ha demostrado reducir la inmunogenicidad de la preparación de islotes (Lacy y col. 1979, Forsen y col. 1984). También se han mostrado efectivas la criopreservación (Flesch y col. 1991), la exposición a luz ultravioleta (Lau y col. 1983) o a radiación gamma (James y col. 1989, Kanai y col. 1989), así como la utilización previa al trasplante de anticuerpos o gangliósidos dirigidos contra los antígenos de clase II del donante (Faustman y col. 1981, Bretzel y col. 1990). Estos métodos han demostrado ser efectivos en alotrasplante de roedores, logrando supervivencias indefinidas con la sólo ayuda de la administración de suero antilinfocítico el día del trasplante, o incluso sin la manipulación inmune del receptor, como ha sido demostrado tras la combinación de técnicas de cultivo y criopreservación (Bretzel y col. 1986).

INMUNOAISLAMIENTO DE ISLOTES

Otro enfoque alternativo como vía para evitar el rechazo de los islotes consiste en la inclusión de estos dentro de micro o macrocápsulas y otros dispositivos constituidos por membranas semipermeables que actúan como barrera frente a células y moléculas involucradas en el mecanismo de rechazo permitiendo al mismo tiempo el paso de insulina y glucosa y otros nutrientes. Se han desarrollado varios métodos de inmunoaislamiento tales como cámaras miliporosas y sistemas fibrilares con resultados positivos, aunque transitorios, en alo y xenotrasplante (Tze y col. 1976, Strautz 1970, Maratos y col. 1976) pero hasta el momento los mejores resultados se han conseguido mediante la microencapsulación (Fau y col. 1990, Siebers y col. 1992). Estas microcápsulas están constituidas por polímeros de alginato, generalmente de lisina, y se ha demostrado su permeabilidad a la glucosa, arginina, teofilina e insulina, pero no a citoquinas, anticuerpos, complemento y células del sistema inmune tales como los linfocitos T, células NK y macrófagos (Darquy y col. 1985, Taunton-Rigby 1986, Zekorn y col. 1990). Los principales problemas que presentan los sistemas de inmunoaislamiento son la inestabilidad de las microcápsulas y fibras huecas y las deficiencias de biocompatibilidad con tendencia a la fibrosis de la cápsula, uniformidad del tamaño del poro, así como la formación de agregados de islotes en el caso de las fibras. A pesar de estas dificultades, la investigación y desarrollo de nuevos materiales que mejoren la biocompatibilidad y estabilidad mecánica hacen que sea el inmunoaislamiento una de las

estrategias mas prometedoras tanto en el campo del trasplante experimental como clínico (Soon-Shiong y col. 1994, Scharp y col. 1994).

IMPACTO SOBRE LAS COMPLICACIONES CRONICAS DE LA DIABETES

El objetivo fundamental que debe buscar el trasplante de islotes es la prevención o regresión de las complicaciones crónicas de la diabetes. En roedores ha sido demostrado que las lesiones glomerulares y tubulares renales y otras lesiones viscerales asociadas a la diabetes pueden ser evitadas con un trasplante de islotes precoz (Mauer y col. 1974). Incluso lesiones ya establecidas en estadios no avanzados pueden regresar o estabilizarse tras el trasplante. Estos cambios, comprobados inicialmente mediante microscopía óptica, se confirmaron posteriormente con métodos inmunohistoquímicos y análisis cuantitativos (Steffes y col. 1980) junto a estudios funcionales tales como tasa de recambio de colágeno IV, estudios fagocíticos de células mesangiales, etc (Federlin y Bretzel 1984). Asimismo se han observado efectos beneficiosos sobre otras lesiones viscerales a nivel retiniano, neural, cardíaco, esquelético, etc (Strodter y col. 1989, Britland y col. 1991).

PREVENCION DE LA RECURRENCIA DE LA DIABETES

Paralelamente a la destrucción de los islotes originada por los mecanismos inmunológicos de rechazo del receptor, existe la posibilidad de destrucción de la masa insular trasplantada mediante los mecanismos inmunopatológicos inherentes a la diabetes tipo I del huésped. Esto ha sido comprobado experimentalmente en ratones NOD y ratas BB y también en pacientes con DM tipo I que han sido sometidos a un trasplante pancreático segmentario de un gemelo no diabético (Sibley y col. 1985, Nají y col. 1984). La mayoría de los estudios parecen responsabilizar de la recurrencia de la diabetes al sistema MHC, sugiriendo que se trata de un proceso restringido a dicho sistema. Además, los islotes aislados parecen ser más vulnerables a la recurrencia de la enfermedad que el páncreas vascularizado (Roza y col. 1987).

De este modo la forma idónea de evitar problemas inmunológicos en el trasplante de islotes consistiría en utilizar islotes procedentes de un donante MHC-incompatible cuya inmunogenicidad fuera disminuida mediante una inmunomodulación previa al trasplante o con sistemas de inmunoaislamiento (Bretzel y col. 1992).

TRASPLANTE INSULAR EN HUMANOS. ESTADO ACTUAL.

Resulta obligado en cualquier trabajo experimental relacionado con terapias alternativas al tratamiento insulínico en la diabetes no perder el horizonte del estudio, esto es, la posibilidad de mejorar la calidad de vida y evitar o minimizar el desarrollo de complicaciones orgánicas en el paciente diabético.

En 1990 se publicó el primer caso de independencia de insulina en un paciente diabético tipo I sometido a trasplante de islotes (Scharp y col. 1990). Según el Registro Internacional de Trasplantes de Islotes (Universidad de Justus Liebig, Giessen-Alemania) se han realizado hasta el 31 de Diciembre de 1994 un total de 242 alotrasplantes de islotes adultos llevados a cabo en 34 instituciones (144 en 13 centros de Norteamérica y 97 en 20 instituciones europeas) (Hering y col. 1995). El período de independencia de insulina ha variado entre unos pocos días y 3.2 años. Los trasplantes se ha llevado a cabo por vía portal y los protocolos de inmunosupresión han sido similares. La procedencia de los islotes ha sido, bien islotes frescos o una combinación de frescos y criopreservados. Como inducción de inmunosupresión todos los pacientes recibieron anticuerpos anticélulas T o policlonales (suero antilinfocitario, ALS), globulina antilinfocitaria (ALG) o antitimocítica (ATG) o bien OKT3, y dos pacientes fueron tratados adicionalmente con deoxyspergualina. La inmunosupresión a largo plazo se llevó a cabo con prednisona y ciclosporina, en ocasiones asociadas a azatioprina.

Los casos en los que se consiguió independencia de insulina

compartieron varias características comunes: un tiempo de preservación del páncreas inferior a 8 horas, una masa insular superior a 6000 equivalentes de islotes, una localización hepática vía vena porta y una inducción de inmunosupresión que incluyera anticuerpos anticélulas T (globulina antilinfocítica o antitimocítica u OKT3), aunque una reversión superior a 1 año sólo se consiguió con las dos primeras.

Estos resultados vienen a mostrar que, sin dejar de ser un buen punto de partida, aún no se ha conseguido allanar el camino de la tolerancia al injerto sin la utilización de drogas inmunosupresoras, postulado éste que siempre ha constituido el principal atractivo del trasplante de islotes frente al de órgano completo, es decir, la posibilidad de manipular inmunológicamente el injerto para hacer anular su inmunogenicidad. En contra de los resultados alcanzados en diversos animales de experimentación, los intentos de reducir la respuesta inmune a los islotes mediante diversas manipulaciones (radiaciones, cultivo, criopreservación, implante en sitios inmunológicamente privilegiados, etc) no han dado resultados positivos en humanos, y lo único que ha demostrado su eficacia ha sido la utilización combinada, ni siquiera aislada, de agentes inmunosupresores.

Si bien los resultados obtenidos hasta ahora no han respondido totalmente a las expectativas que en un principio parecían plantearse, el desarrollo de las técnicas de aislamiento y purificación y de criopreservación han hecho posible que pueda haber una disponibilidad cada vez mayor de suficiente material insular altamente purificado de cara a la realización de trasplantes. Paralelamente las innovaciones que se están

introduciendo en la composición de material sintético para la formación de micro o macroencapsulación (páncreas bioartificial) han mejorado su biocompatibilidad con la consiguiente menor reacción fibrótica pericapsular y hay ya pacientes trasplantados con islotes encapsulados libres de insulina o con mínimos requerimientos diarios (Soon-Shiong y col. 1994).

Por tanto, si valoramos el adelanto experimentado en el alotrasplante de islotes en humanos en los últimos años, es difícil no prever el desarrollo de nuevos agentes inmunosupresores específicos o técnicas afines (inmunomodulación, inmunoaislamiento) en los próximos años que, junto a una actuación más selectiva y carente de efectos adversos, posibiliten la tolerancia al injerto y hagan posible la total normalización metabólica del paciente diabético y la perspectiva de un futuro libre de complicaciones debidas a su enfermedad.

OBJETIVOS

1- CONSEGUIR EL AISLAMIENTO DE ISLOTES MEDIANTE DIGESTION Y PURIFICACION DE PANCREAS DE RATA

2- MODIFICACION DE LOS FACTORES INHERENTES AL AISLAMIENTO PARA OPTIMIZAR LOS RESULTADOS

3- REALIZACION DE ALOTRASPLANTES HEPATICOS VIA INTRAPORTAL A RATAS CON DIABETES INDUCIDA EXPERIMENTALMENTE

4- MANEJO DE LA INMUNOSUPRESION Y OTROS FACTORES RELACIONADOS CON LA INDUCCION DE TOLERANCIA DEL RECEPTOR AL TEJIDO INSULAR PARA LOGRAR UNA REVERSIBILIDAD INDEFINIDA DE LA DIABETES

MATERIAL Y METODOS

1. DEPENDENCIAS UTILIZADAS

-Area de microcirugía del Pabellón de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

-Laboratorio C del Pabellón de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

2. ANIMALES

Ratas Wistar mantenidas en el animalario del Pabellón de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

Denominación: ICO: WI (IOPS AF/Han).

Origen: Seleccionada por H.H. Donaldson a primeros de siglo en el Instituto Wistar USA. Procedentes desde 1974 de IFFA CREDO Lab.

Características: No cosanguínea. Albina. Pequeño tamaño.

Se han utilizado para nuestro trabajo ratas hembra de 9-14 semanas (200-300 g).

Manutención: Los animales han sido alimentados con dieta rata/ratón LETICA cria ITC-R10. Han tenido libre disposición de pienso y abundante agua potable administrada en biberones de 250 ml.

Han sido alojadas en jaulas de Makrolon Polycarbonato Tecniplast tipo 3D y 2D. Como cama se ha empleado viruta para animales de

laboratorio Ultrasorb Panlab..

Los animales han sido mantenidos en una habitación con período de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad con temperatura estable a 23°C.

Aspectos legales: En el presente trabajo se ha observado la legislación sobre animales utilizados en experimentación tal como se ha promulgado en la CEE (86/609/CEE. 18-Dic-96).

3. APARATAJE DE USO COMUN

- Cámara fría (0°C).
- Arcón congelador a -20°C KOXKA.
- Cabina de flujo laminar TELSTAR AV-10.
- Centrífuga SORVALL RC-5B.
- Centrífuga SORVALL GLC-2b.
- Estufa 50°C -300°C HERAEUS T-5050.
- Microscopio ZEISS OPMI 99.
- Microscopio estereoscópico NIKON SMZ-1.
- Máquina formadora de hielo picado SERVEMATIC Mod FILM-100A.
- Balanza 500 g. METTLER P2010.
- Balanza de precisión 0.0001 g. METTLER H51AR.
- pHmetro METEOR mod. 996 con electrodo Ingold U455-S7.
- Densitometro DMA 35 ANTON PAAR.
- Pipetas automáticas PIPETMAN. GILSON.
- Agitador magnético con placa calefactora SELECTA.
- Baño termostatzado con agitación Mod. G76. PACISA.
- Reflectómetro de glucosa ONE TOUCH. LIFESCAN.
- Reflectómetro de glucosa REFLOLUX. BOEHRINGER.

4. REACTIVOS Y MEDIOS

COLAGENASA

Referencia: Tipo V. SIGMA C.9263.

Preparación: (3 mg/ml)

-300 mg de colagenasa

-100 ml de medio Hank's

-12.5 ml de cloruro cálcico 0.26 M

-10 ml de Hepes Buffer

Se reparte en tubos universales de 25 ml y se almacena en congelador a -40°C

Utilidad: Digestión enzimática del tejido pancreático.

HEPES BUFFER

Referencia: GIBCO BRL.043-05630 D. Frasco de 20 ml.

Aplicación: -Preparación de solución de colagenasa.

-Preparación de MEM 1X.

CLORURO CALCICO 0.26M

Referencia: SIGMA C-4901. Frasco de 100 mg.

Utilidad: Preparación de solución de colagenasa.

MEM (MINIMUM ESSENTIAL MEDIUM)

Referencia: 10X MINIMUM ESSENTIAL MEDIUM EAGLE (MODIFIED).

FLOW Laboratories. 14-130-54. Frasco de 500 ml.

MEM 1X (MEM 10%)

Preparación:

-50 ml de MEM 10X

-450 ml de agua bidestilada.

-9 ml de Hepes

Aplicación: Medio para la incubación pancreática durante la digestión enzimática.

MEM 1X + BSA

Preparación:

-200 ml de MEM 1X.

-2 ml de BSA.

Aplicación: Lavado de los islotes tras la incubación, gradientes de densidad o cultivos.

HANKS

Referencia: GIBCO 041-04205-M. Frascos de 500 ml.

Utilidad: Dilución de MEM 1X.

Preparación de gradientes de densidad 1.056 de BSA.

BSA (BOVINE SERUM ALBUMIN)

Referencia: Adv. Prot. Prod. LRI-SPEC. Frascos de 500 ml.

Densidad 1.1 g/ml; 300 mmol/kg.

Preparación de gradientes:

Gradiente	BSA (ml)	MEM 1X (ml)
1056	50.60	49.40
1075	71.88	28.12
1077	74.16	25.84
1085	82.92	17.08

Ajustar la densidad mediante el densitómetro.

Utilidad: Purificación de los islotes.

ACETATO SODICO, Buffer

Referencia: PANREAC 19699. Frasco de 500 g.

Preparación:

- 0.82 gr de acetato sódico
- 50 ml de solución salina (suero fisiológico)
- Titular con ácido acético hasta conseguir un pH 5.0
- Conservar en nevera a 2-4°C.

Utilidad: Preparación de la solución de estreptozotocina.

ESTREPTOZOTOCINA (STZ)

Referencia: SIGMA S-0130. Frasco de 5 g.

Preparación:

- Preparar buffer de acetato sódico.
- Pesar la STZ (100 mg aprox. para 5 ratas) manipulándola con mascarilla y guantes.
- Disolver en el buffer (100 mg en 5 ml).

-Utilizar la STZ inmediatamente a su preparación.

Utilidad: Inducción de diabetes.

DITIZONA

Referencia: SIGMA D-5130. Frasco de 10 ml.

Preparación:

-190 mg de ditizona

-30 ml de DMSO (SIGMA D-5879)

-Dejar reposar una noche.

-Filtrar en papel o en Acrodisc.

-Añadir 20 ml del filtrado a 180 ml de MEM 1X con 2% de NCS mezclando continuamente.

-Congelar en alícuotas de 1 ml.

Utilidad: Tinción de islotes.

CICLOSPORINA

Referencia: Sandimmun (Sandoz) sol. oral (100 mg/ml)

Preparación:

-240 mg (2.4 ml) de solución.

-9.6 ml de aceite de oliva.

-Filtrar la mezcla con Acrodisc 0.2 μ m.

-Conservación a temperatura ambiente.

-Proteger de la luz con papel de aluminio.

Utilidad: Inmunosupresión del receptor.

5. AISLAMIENTO DE ISLOTES

A. EXTRACCION DEL PANCREAS

1. Material

- Eter dietílico (PANREAC).
- Balanza 500 g.
- Cubeta de cristal
- Tiopental sódico (Pentothal 0.5 g.)
- Rasuradora
- Cubeta con hielo
- Tubos universales 25cc (GARMA)
- Povidona yodada (Betadine. Solución antiséptica)
- Solución de colagenasa
- Instrumental quirúrgico

2. Método

Se realiza pre-anestesia introduciendo la rata en la cubeta de cristal en la que se ha colocado previamente un algodón empapado en éter dietílico. Una vez que la rata quede estuporosa se saca de la cubeta y, tras pesarla, se le inyecta vía intraperitoneal (0.1 ml/100 g. de peso) la solución de pentotal, que se prepara disolviendo el contenido del vial en 10cc. de suero salino. Se rasura el abdomen y se esperan 5-10 min. a que la anestesia haga su efecto.

Se desinfecta la piel del abdomen con povidona y se hace una incisión a lo largo de la línea media con cuidado de no dañar peritoneo. Se visualiza la línea alba y se incinde el peritoneo con precaución dejando a la vista el intestino. Se amplía la zona

mediante separadores metálicos y se localiza el paquete vascular cava- aorta abdominal. Se corta éste con tijeras lo más caudal posible, cubriéndolo con una gasa, para provocar un desangramiento del animal que haga más limpia la extracción pancreática.

Hecho esto se localiza el estómago y duodeno y se va desplazando éste último en abanico con pinzas de borde romo para localizar el ductus pancreático y su desembocadura en el duodeno, la cual se pinza.

Se extraen los lóbulos hepáticos manualmente hacia el tórax dejando a la vista el hilio ductal el cual se canaliza con un catéter y se inyectan lentamente, en 20-30 seg., 4 cc. de la solución de colagenasa recién descongelada (ver preparación de colagenasa más adelante) observando una distensión progresiva del páncreas y una mejor delimitación de éste respecto a tejidos vecinos. Se comienza a disecar el páncreas distendido separándolo de sus conexiones al colon transverso, bazo, estómago e intestino delgado, por ese orden, para por fin cortar sus inserciones vasculares y colédoco.

Se recoge el páncreas suavemente con pinzas y se deposita en un tubo universal estéril mantenido en hielo.

B. INCUBACION

1. Material

- Baño termostatzado con agitación
- Agua bidestilada
- Tubos universales
- Solución de MEM

-Solución madre de BSA

2. Método

Se programa el baño de agua a 37°C con tantos tubos universales como páncreas se vayan a procesar, conteniendo solución de MEM. Se cambian los páncreas a dichos tubos una vez alcanzada la temperatura indicada y se mantienen durante 18 minutos bajo agitación suave. Transcurrido ese tiempo se retiran los tubos y se agita enérgicamente de forma manual durante un minuto. Inmediatamente se les añade solución de MEM con BSA al 1% fría con objeto de detener la reacción enzimática.

C. FILTRADO Y LAVADOS

1. Material

- Campana de flujo laminar
- Filtro de malla de nylon de 500 micras. LOCKERWIRE PP 35-500
- Centrífuga SORVALL GLC 2b.
- Tubos universales
- Solución de MEM
- Solución madre de BSA

2. Método

Se filtran los páncreas a través de la malla de nylon para eliminar la estructura fibrosa grosera ayudando al proceso con solución de MEM+BSA al 1% . Se vierte el contenido del recipiente dentro de tubos universales (dos tubos por páncreas) y se centrifugan durante 2 min. a 1200 rpm. Tras esto se elimina la mayor parte de sobrenadante procurando no perder islotes y se

resuspende el sedimento en el líquido que queda golpeando el fondo del tubo suavemente con los dedos 2º y 3º. Se unifica cada páncreas en un solo tubo universal y se vuelven a rellenar los tubos con MEM+BSA y . Se hace otro pase por la centrífuga con las mismas características que antes y se vuelve a tirar el sobrenadante y se mantienen los tubos boca abajo, quedando el sedimento adherido al fondo, para que escurran.

D. PURIFICACION MEDIANTE GRADIENTES DE DENSIDAD

1. Material

- Campana de esterilización
- Centrífuga SORVALL RC-5B
- Rotor HB4 SORVALL
- Solución de MEM
- Solución madre de BSA
- Cubeta con hielo
- Pistola para pipetas
- Pipetas de 5, 10 y 25 ml COSTAR
- Pipetas Pasteur de plástico
- Densitómetro
- Tubos de fondo redondo 17 ml NUNCLON DELTA
- Parafilm

2. Método

Se preparan soluciones de BSA con densidades de 1.085, 1.077 y 1.056 añadiendo a la solución madre de BSA el MEM necesario para lograr las densidades deseadas, debiéndose comprobar éstas con el densitómetro tanto inicialmente como al reutilizarlas si las tenemos conservadas en nevera, homogeneizándolas mediante un giro

horizontal previamente. Mantenemos los tubos con las diferentes densidades en cubeta con hielo.

Se pipetea 6 cc. de la BSA 1.085 en cada uno de los tubos con los páncreas digeridos y escurridos y se aspira y extrae repetidamente con la pipeta el material para lograr una suspensión del digerido. Se distribuye éste en dos tubos de fondo redondeado a partes iguales de modo que se obtendrán 2 tubos por páncreas con algo más de 3 cc de suspensión en cada uno de ellos. Ulteriormente se pipetea 3 cc de la solución de BSA 1.077 sobre cada uno de los tubos, lentamente y con la precaución de hacer gotear la solución por las paredes del tubo. Tras ello se hace lo mismo con la solución de BSA 1.056. De esta forma habremos formado los gradientes discontinuos de densidad observando una separación clara entre cada una de las fases y el digerido pancreático en la fase inferior. Se tapan los tubos con parafilm y se procede a su centrifugación a 4°C durante 20 min a 2.200 rpm.

Pasado este tiempo se retiran los tubos observando, en las mejores condiciones, la siguiente distribución (de abajo a arriba):

- Material no digerido en el fondo
- BSA 1.085 con material exocrino
- Interfase de tejido exocrino
- BSA 1.077
- Interfase con islotes
- BSA 1.056

Con pipeta Pasteur de plástico se aspira el material insular de la interfase 1.077-1.056 y se introduce en tubos universales (los

islotes de dos tubos de gradiente en un tubo universal). Se rellenan los tubos con MEM+BSA al 1% y se lavan mediante un centrifugado a 1200 rpm durante 2 min.

Se extrae posteriormente el sobrenadante con cuidado de no aspirar los islotes, que quedan en el fondo del tubo, y se pipetea estos a continuación para depositarlos en tubos cónicos. Estos últimos se vuelven a rellena con MEM+BSA al 1% y se efectúa un pase mínimo por la centrífuga para lograr su sedimentación. Se extrae de nuevo el sobrenadante dejando el último cc de líquido, hallándose los islotes en el fondo.

E. RECUENTO Y VALORACION DE PUREZA

1. Material

- Tubos de fondo cónico de 17 ml NUNCLON
- Pipeta automática
- Placas de Petri NUNCLON
- Solución de ditizona
- Microscopio estereoscópico NIKON SMZ-1.
- Gradilla microscópica

2. Método

El recuento de los islotes obtenidos se lleva a cabo logrando una suspensión homogénea del producto final en el cc. de solución mediante aspiración y extracción repetida con la pipeta automática y extrayendo inmediatamente dos alícuotas sucesivas de 25 microlitros que se depositan en una placa de Petri. Se efectúa la tinción añadiendo unas gotas de la solución de ditizona (ver preparación de ditizona más adelante) sobre cada

alícuota y se esperan unos minutos hasta que se logra una buena tinción de los islotes. Se coloca la placa bajo el microscopio y se cuentan los islotes de cada muestra, desestimando los islotes inferiores a 50 micras. Se hace una media de las dos muestras y se calcula el número total de islotes. Como ejemplo, si se observan 32 y 40 islotes en cada muestra, de media 36, se multiplica esta cifra por 40 ($1 \text{ ml} = 1000 \text{ microlitros} / 25 = 40$). $36 \times 40 = 1440$ islotes.

La estimación de la pureza de la preparación se ha efectuado mediante la apreciación subjetiva del contaminante exocrino de las muestras. Tanto el recuento como la valoración de la pureza se han llevado a cabo por dos observadores como mínimo de forma sucesiva y estableciendo una media de los parámetros estimados.

6. INDUCCION DE DIABETES EXPERIMENTAL

1. Material

- Estreptozotocina
- Balanza de precisión
- Cucharilla metálica
- Mascarilla y guantes
- Jeringas hipodérmicas
- Cubeta de cristal con éter
- Reflectómetro de glucosa
- Balanza 500 g. METTLER P2010.
- Permanganato potásico
- Jaula individual

2. Método

Se prepara la solución de estreptozotocina (STZ) tal como se ha detallado previamente. Se seleccionan una serie de ratas Wistar hembras del animalario a las cuales se pesa y se comprueba su euglucemia mediante su análisis en un reflectómetro comercial (técnica de glucosa- oxidasa) a partir de una gota de sangre extraída de la cola mediante un corte con bisturí, cauterizando posteriormente la herida con permanganato potásico. Para ello se introduce al animal en una jaula individual que se cierra con una tapa la cual presenta un orificio para que sobresalga únicamente la cola.

Tras ello se introduce a la rata en la cubeta con éter durante breve tiempo y, una vez semi-anestesiada, se le administra por vía intraperitoneal una dosis de 60 mg/kg de STZ .

Se vuelve a determinar el peso y glucemia al 2º-3º día tras la inducción, fecha en que habitualmente se observa ya una clara hiperglucemia, y se repite su determinación semanalmente y de forma previa al trasplante. Se consideran diabéticas a las ratas que presentan cifras de glucemia superiores a los 350 mg/dl en todas las determinaciones. En el caso de que no se alcancen estos valores, lo cual ocurre infrecuentemente, se vuelve a repetir la inducción de la diabetes como se ha detallado previamente.

En experiencias anteriores la inducción de diabetes se realizaba mediante inyección endovenosa en la vena dorsal del rabo o en la vena lingual, empleando al misma dosis de STZ. Estas técnicas fueron reemplazadas por la vía intraperitoneal por su mayor sencillez y similitud de resultados.

7. TRASPLANTE DE ISLOTES

1. Material

- Cubeta de cristal
- Eter
- Ketamina clorhidrato (KETOLAR 50 mg/ml. vial de 10 ml)
- Diazepam (VALIUM 10 mg. vial de 2 ml)
- Povidona yodada (BETADINE solución antiséptica)
- Atropina sulfato (ATROPINA BRAUN. 1 mg/ml. vial de 1 ml)
- Suero fisiológico
- Jeringa hipodérmica de 2 cc
- Cubeta con hielo
- Material de quirófano
- Cánula mariposa (BUTTERFLY 23 y 25 g Venisystems ABOTT)
- Hilo de sutura 4 ceros

2. Método

Se selecciona una rata diabética y se determina su peso y glucemia tal como se ha detallado anteriormente. Se realiza preanestesia introduciéndola durante breve tiempo en la cubeta con éter evitando una sobreexposición al mismo tras lo cual se le inyecta por vía intramuscular 1 cc de la mezcla preparada con 50 mg de ketamina, 20 mg de diazepam y 1 mg de atropina. Si la rata pesa más de 300 g se administran 2 cc de esta solución. Se rasura la zona abdominal del animal y se impregna con povidona yodada. Se esperan 5-10 min hasta que la rata quede totalmente anestesiada y se la coloca sobre un disco de corcho sobre la mesa de quirófano. Se sujetan las patas al corcho con gomas elásticas y chinchetas.

Se realiza una incisión con bisturí de la piel abdominal por la línea media (con cuidado ya que tienen muy poco tejido subcutáneo por su diabetes) y posteriormente el peritoneo visceral, dejando a la vista el paquete abdominal. Se amplía el campo mediante separadores y se extrae parcialmente el paquete hacia la izquierda de la rata, que se coloca sobre una gasa estéril, dejando a la vista la vena porta.

Se carga la jeringa con la suspensión de islotes contenidos en el tubo cónico (ver previamente) ayudándonos con un catéter. Se introduce en la porta la aguja de la mariposa conectada a la jeringa con los islotes y, tras aspirar mínimamente para comprobar entra sangre en la cánula, es decir que estamos en la luz, se inyecta lentamente la suspensión y posteriormente 0.5 cc. de suero salino para introducir los islotes que pudieran quedar a lo largo de la cánula.

Terminado el proceso, se extrae la aguja y se coloca inmediatamente sobre el punto de punción un bastoncillo de algodón, presionando ligeramente hasta lograr la hemostasia. Se vuelve a introducir el paquete abdominal y se realiza la sutura del plano muscular y del cutáneo. Se impregna de nuevo la piel con povidona y se devuelve la rata a su jaula.

Tras el trasplante se determinan el peso y la glucemia a diario durante la primera semana, y posteriormente se van espaciando las determinaciones cada 3 días y 7 días en función de la evolución del animal.

Cuando la diabetes revertía mantenía en observación al animal durante 90 días, sacrificándolo cumplido este período una vez extraída sangre de las venas cava, porta y suprahepática para

medición de insulina, extrayendo posteriormente hígado y páncreas para eventuales estudios inmunocitoquímicos.

8. TEST DE RESPUESTA A INSULINA EXOGENA

Las ratas de los grupos J y K, realizados bajo pauta de CsA subcutanea los días 0,+1,+2 (ver tablas 1-J, 1-K, 2-J, 2-K, gráficas 15 y 16) se seleccionaron para la realización de esta prueba, con objeto de comprobar la respuesta glucémica de las ratas trasplantadas tras la administración exógena de insulina en comparación con un grupo de ratas sanas y otro de ratas diabéticas (gráfica 18). La prueba se realizó, en las ratas de los grupos J y K, a las 36 horas del trasplante y se repitió a los 7 días y 1 mes del mismo.

Los animales permanecieron con libre acceso al agua, retirándose la comida la noche previa al día de la prueba. Se determinó el peso y la glucemia de cada rata a primera hora de la mañana. Se les administró por via subcutanea una dosis de insulina lenta (HUMULINA LENTA) equivalente a 5 UI/kg. Se realizaron extracciones de sangre para determinación de glucemia cada 2 horas a partir la sangre obtenida de la rabo tras un pequeño corte con bisturí, cauterizándose posteriormente con permanganato potásico. Las muestras se analizaron en un reflectómetro de glucosa comercial (REFLOLUX o ONE TOUCH). La prueba se dió por finalizada a las 10 horas de la tras la inyección de insulina.

9. ADMINISTRACION ORAL DE CICLOSPORINA

Referencia: SANDIMMUN (Sandoz). Solución oral 100 mg/ml. 50 ml

Dosis: 40 mg/kg

Método: Se determina la dosis en función del peso de cada rata y se carga la solución en una jeringa de 1 ml. Un ayudante sujeta e inmoviliza al animal con un guante o paño para evitar mordeduras. La persona que introduce la solución extiende dorsalmente la cabeza de la rata tirando de las orejas hacia atrás e introduce la jeringa en la cavidad oral, buscando la faringe y el esófago. Una vez asegurado de una adecuada localización, vacía el contenido de la jeringa.

Este método (intubación esofágica) ha sido el utilizado en todos los grupos de ratas diabéticas trasplantadas en las que se empleó un protocolo de CsA oral. Asimismo se ha empleado este método en el grupo de ratas sanas en el que se determinó ciclosporinemia tras administración esofágica de la droga, a diferencia del otro grupo de ratas sanas que recibió CsA oral, a las cuales se les depositó la solución de CsA en la cavidad oral.

10. ADMINISTRACION SUBCUTANEA DE CICLOSPORINA

Referencia: SANDIMMUN (Sandoz). Solución oral 100 mg/ml. 50 ml

Dosis: 30 mg/kg

Preparación a partir de CsA en solución:

- Sandimmun 240 mg (2.4 ml)
- Aceite de oliva 0.4^o 9.6 ml
- Realizar la mezcla de ambos (20 mg/ml) y se filtra (Steril Acrodisc "Gelman Sciences" de 0.2 μ m)
- Guardar a temperatura ambiente en un frasco de cristal oscuro y protegido de la luz.

Preparación a partir de CsA en polvo:

- Mezclar 400 mg de polvo de CsA en 20 ml de aceite de oliva ---
- Filtrar con Acrodisc de 0.2 μ m.
- Guardar bajo las condiciones reseñadas arriba.

Método:

Una vez calculada la dosis y cargada ésta en una jeringa de 1 ml se inmoviliza a la rata con un guante o paño, o bien se deja introducir libremente a la rata en una jaula de tamaño reducido de paredes de plástico transparente donde la rata ve muy limitada su capacidad de movimientos. Se inyecta el contenido de la jeringa en el tejido celular subcutáneo del lomo o en cara anterior del abdomen.

(*) La preparación de CsA en polvo nos ha sido suministrada por gentileza del Dr. Gomis, del H. Clinic i Provincial de Barcelona.

11. DETERMINACION DE CICLOSPORINA

La determinación de ciclosporina se ha realizado mediante un inmunoanálisis (TDx^R Cyclosporine Monoclonal Whole Blood) suministrado por Abbott Laboratories, que utiliza una tecnología de inmunoensayo de polarización de fluorescencia (FPIA). Los coeficientes de variación intra e interensayo son de 3.2% y 3.9% respectivamente para una concentración de 150 ng/ml de CsA, 2.3% y 2.9% para 400 ng/ml y de 2.3% y 3.0% para 800 ng/ml.

Reactivos utilizados:

- Tubos Microtainer con EDTA.
- Solución de anticuerpo monoclonal de ratón en 3 ml de buffer con estabilizador de proteína.
- Solución de trazador de fluoresceína en buffer conteniendo surfactante y estabilizador de proteína (3 ml).
- Solución de pretratamiento (3 ml).
- Reactivos de precipitación y de solubilización.
- Calibradores con diluciones de CsA de 100, 250, 500, 1000 y 1500 ng/ml.
- Tubos de centrifuga X SYSTEMS.

12. METODOS ESTADISTICOS

Métodos descriptivos:

Para describir una muestra en función de una variable determinada se ha empleado en primer lugar la media aritmética. Para definir la dispersión de la variable hemos utilizado la desviación standard (DS) junto al rango, habida cuenta que la escasa amplitud de las muestras en general hace más apropiado el rango que la DS.

Métodos comparativos:

Como la mayoría de las muestras han agrupado menos de 30 variables hemos recurrido a las pruebas no paramétricas, que no dependen de la distribución de la variable y por tanto no precisan la condición previa de normalidad de la muestra. En el análisis de muestras pareadas hemos empleado el test de Wilcoxon del rango con signo. En el caso de muestras no pareadas hemos utilizado una variante del Wilcoxon denominada test de Mann Whitney.

Cuando lo que hemos querido comparar han sido variables cualitativas hemos empleado la prueba de Chi cuadrado.

El area bajo la curva de concentración de ciclosporina en sangre se ha determinado mediante la aplicación en cada caso de la regla del trapecioide, sumando las áreas parciales originadas bajo un mismo eje de coordenadas.

Análisis de correlación:

El análisis de la relación de una variable dependiente respecto a otra independiente se ha calculado mediante el análisis de regresión. La correlación entre dichas variables se ha calculado a través del denominado coeficiente de correlación de Kendall. Todos los cálculos estadísticos se han realizado mediante los programas informáticos STATGRAFICS y EPI-INFO.

RESULTADOS

RESULTADOS. VARIACIONES DE GLUCEMIA Y PESO TRAS LA ADMINISTRACION DE ESTREPTOZOTOCINA (STZ)

Las siguientes tablas muestran la variación de los pesos y glucemias de las ratas antes y tras la inducción de diabetes mediante la administración peritoneal de una dosis de 60 mg/kg de peso de STZ, confirmándose de esta forma la eficacia de la inducción y el mantenimiento del estado diabético de las ratas en el momento del trasplante. La glucemia y el peso pre-STZ están determinados el día de la administración de STZ, inmediatamente antes de ésta, y los valores reseñados como post-STZ son obtenidos el día de la implantación de los islotes.

TABLA 1-A. GRUPO A. PESO Y GLUCEMIA PRE Y POST-STZ

RATA	PESO PRE-STZ	GLUCEMIA PRE-STZ	PESO POST-STZ	GLUCEMIA POST-STZ
1	278	65	246	400
2	269	73	236	337
3	289	83	249	400
4	273	68	240	365
MEDIA	277+/-9	72+/-8	242+/-6	375+/-30

TABLA 1-B. GRUPO B. PESO Y GLUCEMIA PRE Y POST-STZ

RATA	PESO PRE-STZ	GLUCEMIA PRE-STZ	PESO POST-STZ	GLUCEMIA POST-STZ
1	309	57	244	600
2	297	64	250	402
3	296	61	233	243
4	277	63	247	322
5	308	52	284	337
6	288	77	266	366
7	294	67	265	341
8	275	50	260	315
9	278	84	246	483
MEDIA	292+/-12	64+/-11	255+/-15	378+/-105

TABLA 1-C. GRUPO C. PESO Y GLUCEMIA PRE Y POST-STZ

RATA	PESO PRE-STZ	GLUCEMIA PRE-STZ	PESO POST-STZ	GLUCEMIA POST-STZ
1	304	62	279	400
2	275	69	241	400
3	291	71	255	400
4	275	75	248	400
5	269	58	229	400
6	311	60	281	400
7	285	73	264	400
8	277	82	231	400
MEDIA	285+/-15	69+/-8	253+/-20	400

TABLA 1-D. GRUPO D. PESO Y GLUCEMIA PRE Y POST-STZ

RATA	PESO PRE-STZ	GLUCEMIA PRE-STZ	PESO POST-STZ	GLUCEMIA POST-STZ
1	268	59	250	300
2	285	61	261	380
3	307	69	278	384
4	295	86	263	400
5	271	78	235	400
6	269	68	223	368
MEDIA	282+/-16	70+/-10	251+/-20	372+/-37

TABLA 1-E. GRUPO E. PESO Y GLUCEMIA PRE Y POST-STZ

RATA	PESO PRE-STZ	GLUCEMIA PRE-STZ	PESO POST-STZ	GLUCEMIA POST-STZ
1	275	63	241	424
2	294	58	259	329
3	286	57	260	408
4	279	68	239	424
5	304	73	283	496
6	259	70	232	397
7	268	84	245	493
8	285	75	257	456
MEDIA	281+/-14	68+/-9	252+/-16	425+/-50

TABLA 1-F. GRUPO F. PESO Y GLUCEMIA PRE Y POST-STZ

RATA	PESO PRE-STZ	GLUCEMIA PRE-STZ	PESO POST-STZ	GLUCEMIA POST-STZ
1	280	61	241	487
2	272	54	238	398
3	311	58	291	493
4	289	63	268	405
5	268	79	232	398
6	264	73	246	389
7	288	57	271	357
8	306	89	277	359
MEDIA	284+/-17	67+/-12	258+/-21	410+/-52

TABLA 1-G. GRUPO G. PESO Y GLUCEMIA PRE Y POST-STZ

RATA	PESO PRE-STZ	GLUCEMIA PRE-STZ	PESO POST-STZ	GLUCEMIA POST-STZ
1	275	74	250	448
2	267	72	227	352
3	282	65	265	436
4	297	79	255	600
5	263	75	239	415
6	264	55	227	361
7	305	79	274	359
8	237	90	214	324
MEDIA	273+/-21	72+/-10	243+/-20	411+/-87

TABLA 1-H. GRUPO H. PESO Y GLUCEMIA PRE Y POST-STZ

RATA	PESO PRE-STZ	GLUCEMIA PRE-STZ	PESO POST-STZ	GLUCEMIA POST-STZ
1	254	52	236	409
2	268	48	236	412
3	272	86	240	357
4	240	72	220	320
5	263	67	239	460
6	255	109	237	372
7	263	94	243	479
8	258	68	226	429
MEDIA	259+/-9	74+/-20	234+/-7	408+/-53

TABLA 1-I. GRUPO I. PESO Y GLUCEMIA PRE Y POST-STZ

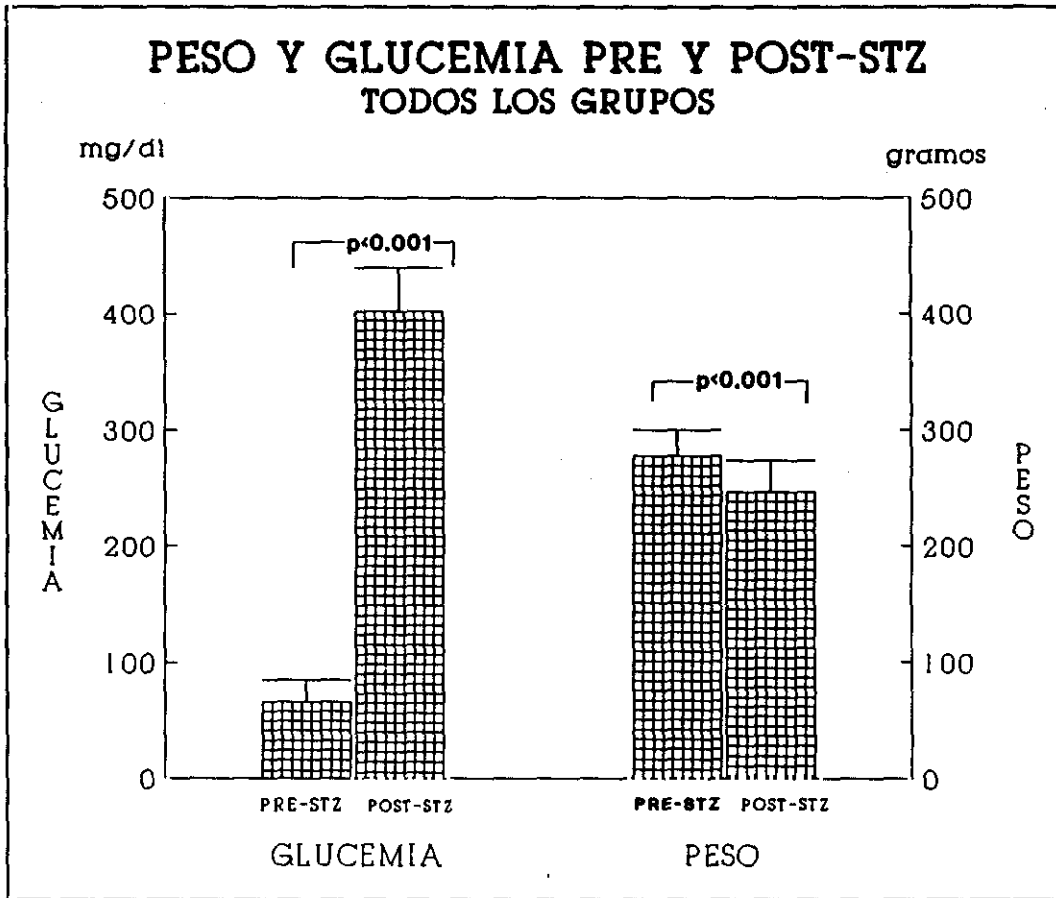
RATA	PESO PRE-STZ	GLUCEMIA PRE-STZ	PESO POST-STZ	GLUCEMIA POST-STZ
1	294	47	266	348
2	278	57	262	600
3	289	69	250	370
4	282	58	236	600
5	285	44	245	427
6	268	60	226	359
7	256	65	235	500
8	263	61	244	404
MEDIA	276+/-13	53+/-6	242+/-11	451+/-103

TABLA 1-J. GRUPO J. PESO Y GLUCEMIAS PRE Y POST-STZ

RATA	PESO PRE-STZ	GLUCEMIA PRE-STZ	PESO POST-STZ	GLUCEMIA POST-STZ
1	284	69	258	424
2	241	79	200	338
3	258	72	231	469
4	246	57	227	444
5	228	81	203	366
6	231	76	191	409
7	258	63	231	494
8	271	75	240	500
MEDIA	252+/-19	71+/-8	222+/-22	430+/-58

TABLA 1-K. GRUPO K. PESO Y GLUCEMIA PRE Y POST-STZ

RATA	PESO PRE-STZ	GLUCEMIA PRE-STZ	PESO POST-STZ	GLUCEMIA POST-STZ
1	269	68	249	451
2	280	64	264	600
3	285	58	265	412
4	230	60	207	600
5	301	65	285	483
6	280	65	270	437
MEDIA	274+/-24	63+/-3	256+/-27	497+/-82



GRAFICA 2. En esta gráfica quedan representadas las variables estadísticas de la glucemia y el peso de todos los animales antes y después de la inducción de la diabetes tras la administración de estreptozotocina (STZ). Antes de la STZ la glucemia media fue de 66 ± 9 mg/dl y tras STZ de 402 ± 38 mg/dl ($p < 0.001$). El peso disminuyó de 278 ± 22 g. a 247 ± 27 g. tras STZ ($p < 0.001$), lo que viene a corroborar una adecuada inducción de la diabetes.

TABLA 2-A. GRUPO A. MASA Y PUREZA INSULAR

RATA	NUMERO	PUREZA
1	400	90%
2	450	50%
3	550	90%
4	500	90%

Masa insular: MEDIA 475
RANGO 400-550

Pureza: MEDIA 80
RANGO 50-90

TABLA 2-B. GRUPO B. MASA Y PUREZA INSULAR

RATA	NUMERO	PUREZA
1	1500	85
2	880	85
3	1500	80
4	1000	60
5	1400	70
6	1000	80
7	1000	80
8	2600	80
9	1700	70%

Masa insular: MEDIA 1397
RANGO 880-2600

Pureza: MEDIA 76
RANGO 60-85

TABLA 2-C. GRUPO C. MASA Y PUREZA INSULAR

RATA	NUMERO	PUREZA
1	725	90%
2	800	90%
3	1650	90%
4	1450	90%
5	1300	80%
6	1200	80%
7	900	90%
8	950	90%

Masa insular: MEDIA 1121
RANGO 725-1650

Pureza: MEDIA 87
RANGO 80-90

TABLA 2-D. GRUPO D. MASA Y PUREZA INSULAR

RATA	NUMERO	PUREZA
1	1200	50%
2	1300	95%
3	2000	95%
4	1000	50%
5	700	50%
6	700	80%

Masa insular: MEDIA 1150
RANGO 700-2000

Pureza: MEDIA 63
RANGO 40-90

TABLA 2-E. GRUPO E. MASA Y PUREZA INSULAR

RATA	NUMERO	PUREZA
1	900	80%
2	850	80%
3	1200	85%
4	1300	60%
5	1100	60%
6	1400	70%
7	900	90%
8	2000	75%

Masa insular: MEDIA 1206
RANGO 850-2000

Pureza: MEDIA 75
RANGO 60-90

TABLA 2-F. GRUPO F. MASA Y PUREZA INSULAR

RATA	NUMERO	PUREZA
1	1400	70%
2	1500	70%
3	1350	80%
4	1200	80%
5	1200	80%
6	1000	40%
7	600	40%
8	1000	60%

Masa insular: MEDIA 1156
RANGO 600-1500

Pureza: MEDIA 73
RANGO 40-90

TABLA 2-G. GRUPO G. MASA Y PUREZA INSULAR

RATA	NUMERO	PUREZA
1	1080	40%
2	1080	40%
3	1400	90%
4	1600	70%
5	1200	70%
6	1000	90%
7	1100	90%
8	1000	75%

Masa insular: MEDIA 1182
RANGO 1000-1600

Pureza: MEDIA 78
RANGO 70-90

TABLA 2-H. GRUPO H. MASA Y PUREZA INSULAR

RATA	NUMERO	PUREZA
1	1500	70%
2	1000	70%
3	1600	90%
4	1600	90%
5	1800	80%
6	1400	80%
7	1000	70%
8	1200	80%

Masa insular: MEDIA 1387
RANGO 1000-1800

Pureza: MEDIA 78
RANGO 70-90

TABLA 2-I. GRUPO I. MASA Y PUREZA INSULAR

RATA	NUMERO	PUREZA
1	1560	60%
2	1520	80%
3	1480	80%
4	1600	80%
5	1800	80%
6	2000	85%
7	1800	80%
8	1520	80%

Masa insular: MEDIA 1600
RANGO 1480-2000

Pureza: MEDIA 78
RANGO 60-85

TABLA 2-J. GRUPO J. MASA Y PUREZA INSULAR

RATA	NUMERO	PUREZA
1	1200	85%
2	1200	80%
3	1200	90%
4	1700	90%
5	950	90%
6	1000	90%
7	1000	80%
8	1200	80%

Masa insular: MEDIA 1181
RANGO 950-1700

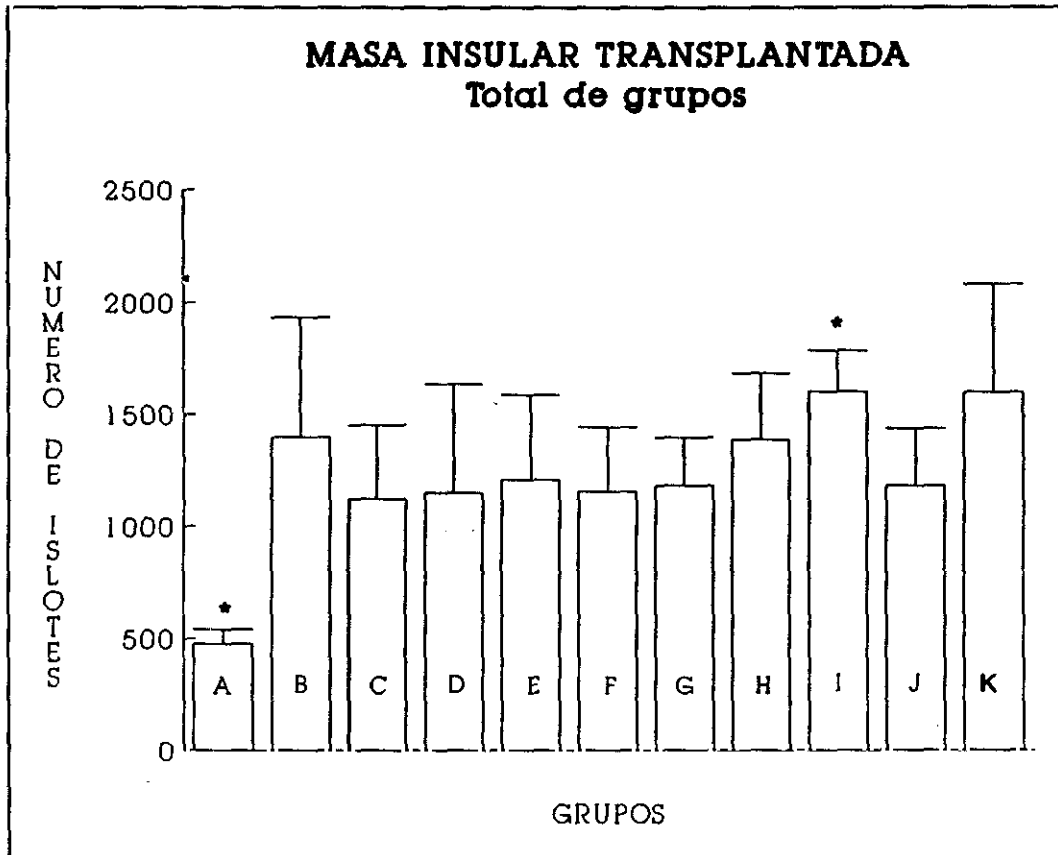
Pureza: MEDIA 85
RANGO 80-90

TABLA 2-K. GRUPO K. MASA Y PUREZA INSULAR.

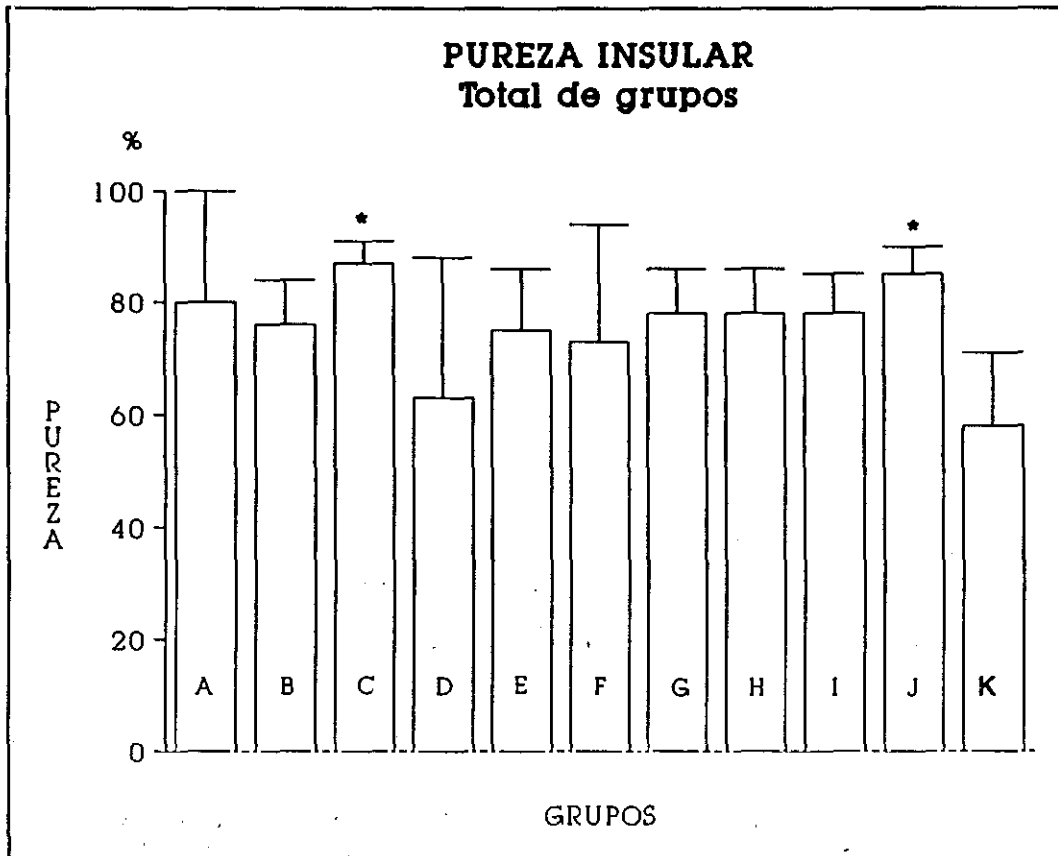
RATA	NUMERO	PUREZA
1	2400	50
2	1840	50
3	1500	70
4	1600	70
5	1040	70
6	1200	40

Masa insular: MEDIA 1596
RANGO 1040-2400

Pureza: MEDIA 58
RANGO 40-70



GRAFICA 3. Se representa el número de islotes utilizados como media en cada uno de los grupos. En la mayoría de los grupos la masa insular no muestra variaciones apreciables, no alcanzando diferencias con significación estadística. El grupo A, en cambio, muestra un nivel de significación estadística con el resto de los grupos, con una $p < 0.01$ en el menor de los casos. Por otra parte en el grupo I la masa insular trasplantada fue significativamente mayor que en otros grupos ($p < 0.05$ en el menor de los casos) excepto en los grupos H y K en los que hay una ausencia de significación estadística respecto al grupo I.



GRAFICA 4. Se refleja la pureza estimada de la preparación insular utilizada en cada grupo. El grupo C muestra diferencias significativas ($p < 0.05$) con los grupos B, E, F, H, I y K. El grupo J muestra diferencias ($p < 0.05$) únicamente con los grupos B, E, I y K. Ambos grupos con mayor media de pureza, C y J, no muestran diferencias entre sí. Asimismo las purezas del resto de los grupos tampoco guardan una significación estadística entre sí salvo el grupo K que presenta una pureza media inferior a la de otros grupos ($p < 0.05$) excepto el D.

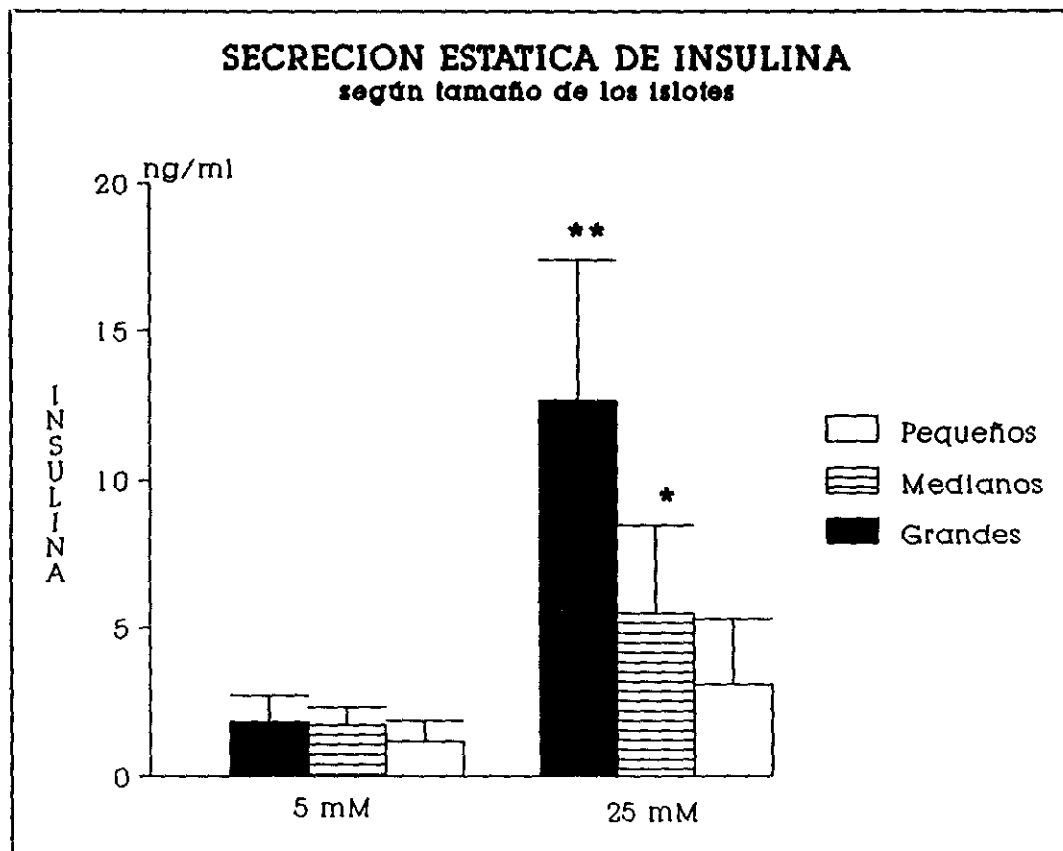
RESULTADOS. GRADIENTES DE DENSIDAD

DENSIDADES	DEPOSITO EXOCRINO	DEPOSITO ENDOCRINO	SEPARACION
1085/1069/1056	1085	1085/1069	NULA
1085/1072/1056	1085	1085/1072 1072/1056	DEFICIENTE
1085/1075/1056	1085	1075/1056 1085/1075	SUBOPTIMA
1085/1077/1056	1085	1077/1056	OPTIMA

TABLA 3. Se muestran las diferencias de la separación de los islotes obtenidos mediante gradientes de densidad con BSA en función de las densidades utilizadas. Se han mantenido invariables las densidades extremas, 1.085 y 1.056, modificándose la densidad intermedia en función de los resultados obtenidos en cuanto a número y contaminación de material no endocrino. Cuando se utiliza 1.069 como densidad intermedia, los islotes se depositan pegados a la capa de tejido exocrino, que ocupa el fondo del tubo de gradiente, a nivel de la interfase 1.085/1.069. La recogida de los islotes conlleva inevitablemente un acompañamiento de impurezas muy importante. La utilización de la densidad 1.072 produce un depósito exiguo de islotes en la interfase adecuada (1.072/1.056) al tiempo que la mayoría se depositan en la interfase inferior (1.085/1.072) junto al material exocrino.

Con el gradiente de 1.075 hemos obtenido mejores resultados, logrando que los islotes se depositen en la interfase superior (1.075/1.056) en ocasiones, pero no de forma invariable, de modo que en otras pruebas realizadas con esta densidad el depósito ha sido mayor en la interfase inferior.

La densidad que mejores resultados nos ha proporcionado ha sido la de 1.077, la cual se acompaña de un depósito prácticamente exclusivo de islotes en la interfase 1.077/1.056, produciéndose de esta forma una adecuada separación.

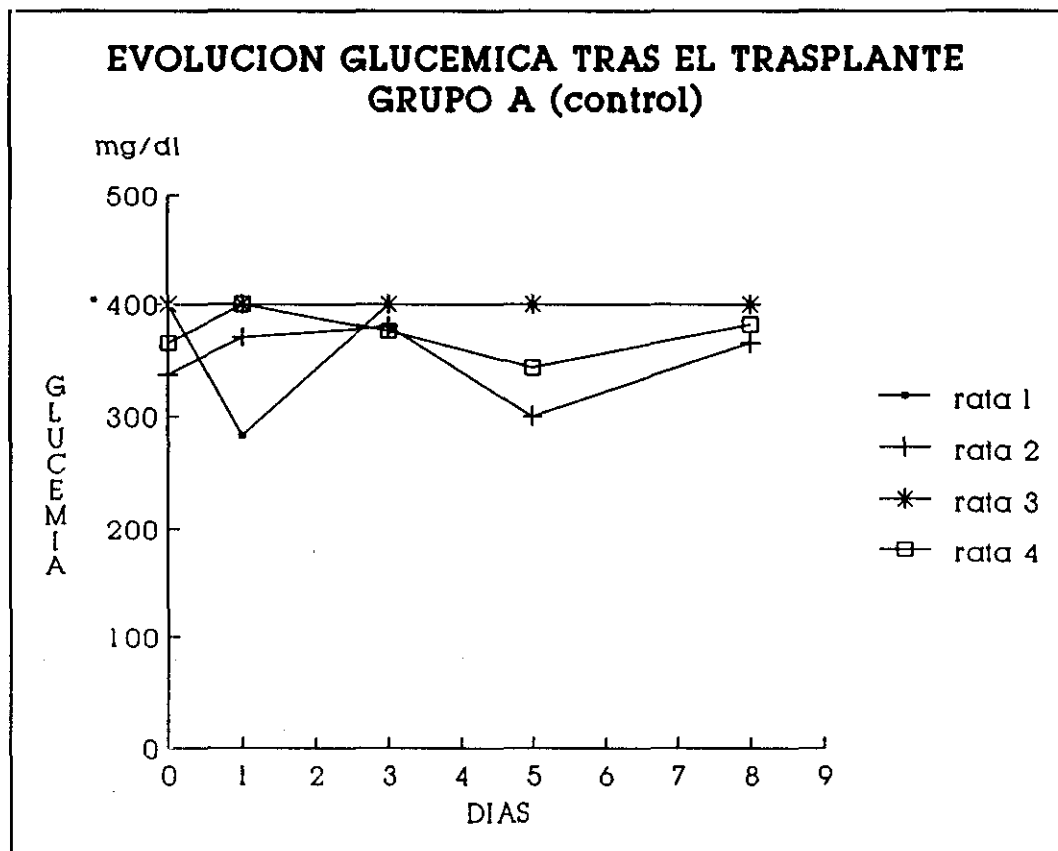


GRAFICA 5. Secreción estática de insulina de islotes frescos de rata en función de su tamaño. Los islotes pequeños son aquellos menores de 100 micras, los medianos comprendidos entre 100 y 200 micras y los grandes superiores a 200 micras. Se ha analizado la concentración de insulina (RIA con anticuerpo antiinsulina de rata) en el medio (solución de Krebs Ringer) con glucosa 5 Mm y 25mM respectivamente. Los islotes responden al estímulo con glucosa en relación directa a su tamaño.

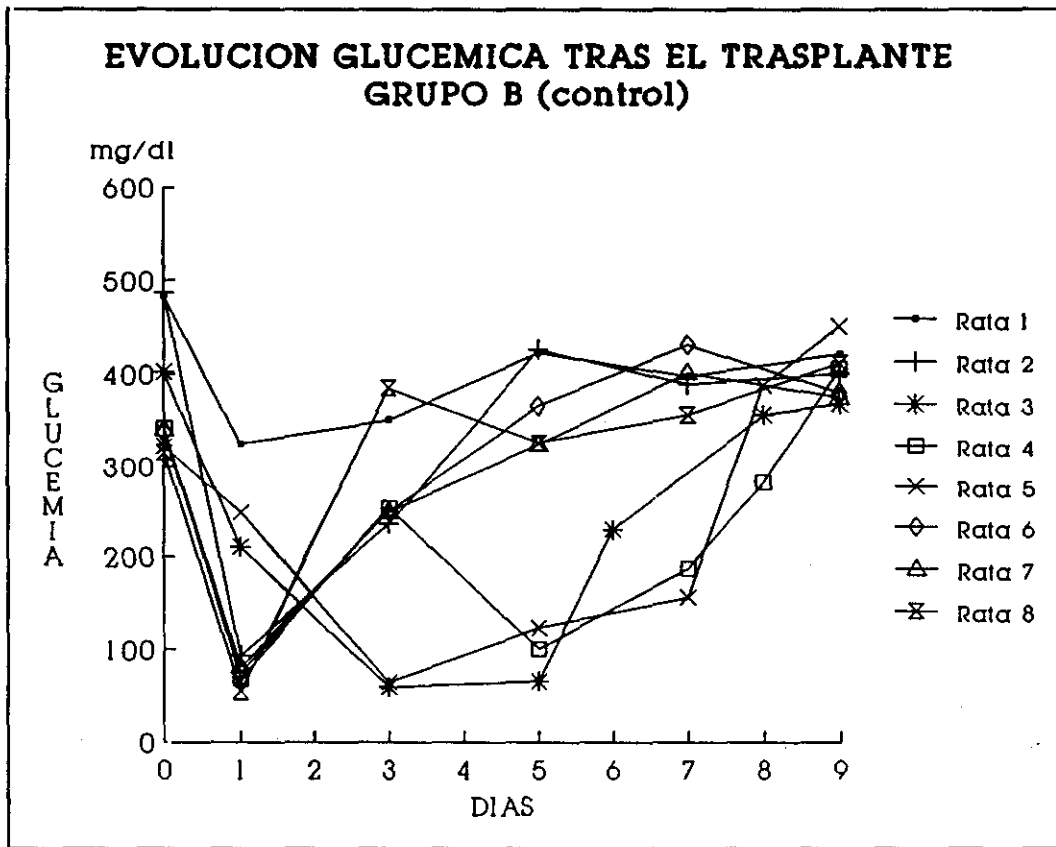
* $p < 0.05$ ** $p < 0.001$.

(Por cortesía de la Dra. Beatriz Martinez, extractado de sus estudios de tesis doctoral en curso).

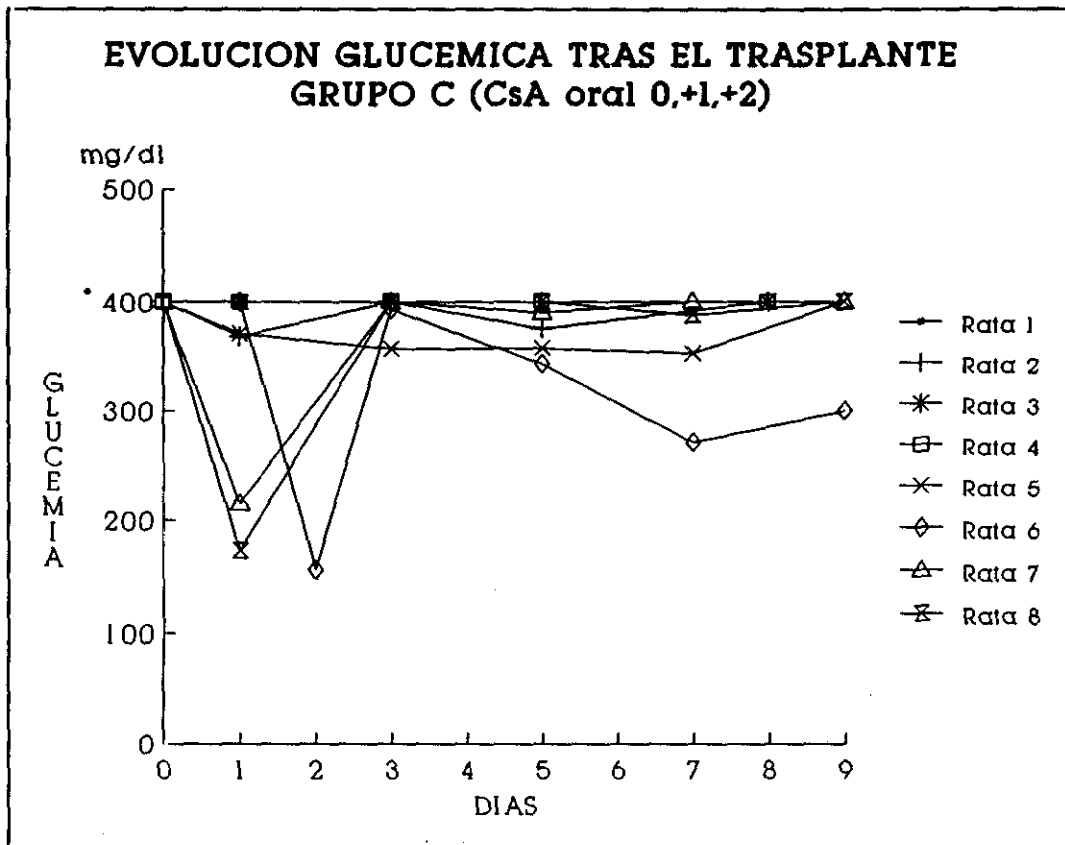
RESULTADOS DEL TRASPLANTE EN LOS DIFERENTES GRUPOS



GRAFICA 6. Se reflejan los resultados del TI en el grupo A, realizado sin inmunosupresión. La media de islotes trasplantados fue de 475 (DS 64), con un intervalo comprendido entre 400 y 550. La pureza estimada fue de 80% (DS 20), intervalo de 50-90. En ningún caso se observó variación glucémica tras el TI. El límite de detección del reflectómetro fue de 400 mg/dl (*).



GRAFICA 7. Representación de la evolución glucémica tras el TI en el grupo control B (sin inmunosupresión), con una media de islotes de 1397, DS 536, intervalo 880-2600 (relación donante:receptor 1.5:1). La pureza media fue de 76%, DS 8, intervalo 60-85. 4 de las 9 ratas mostraron una reversión transitoria y parcial de la diabetes que en ningún caso superó los 8 días (5, 6, 7 y 8 días).

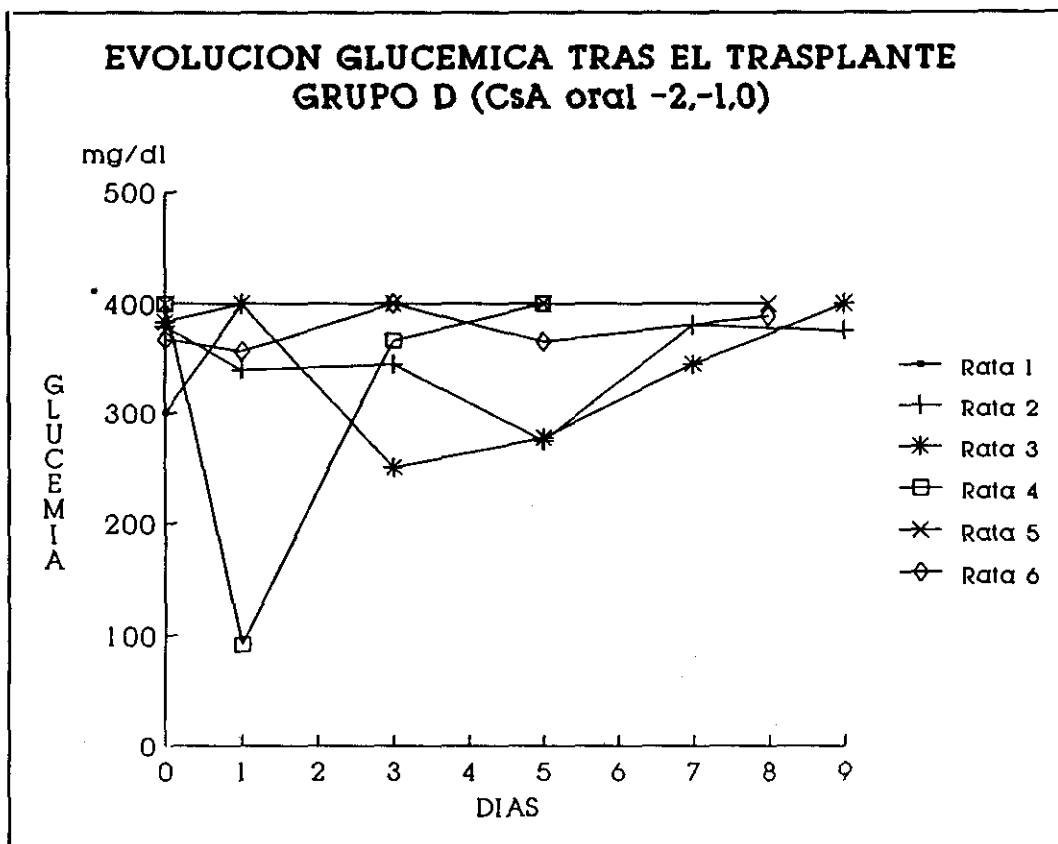


GRAFICA 8. En esta gráfica queda reflejada la evolución de la glucemia tras el TI en el grupo C, constituido por ratas a las que se realizó inmunosupresión con CsA por vía oral los días 0,1,2.

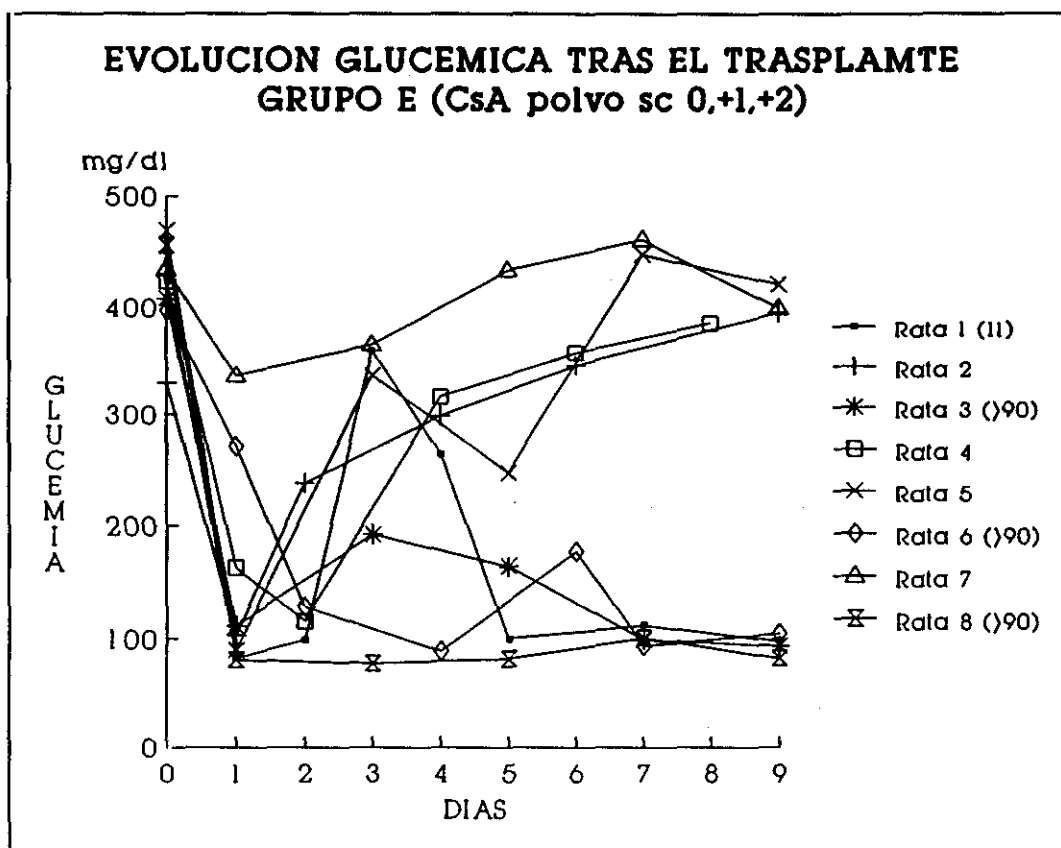
La media de islotes fue de 1121, DS 330, intervalo 725-1650. La pureza media fue del 87%, DS 4, intervalo 80-90.

Solamente se observó un descenso de la glucemia en tres de las 8 ratas que no superó el 2º día.

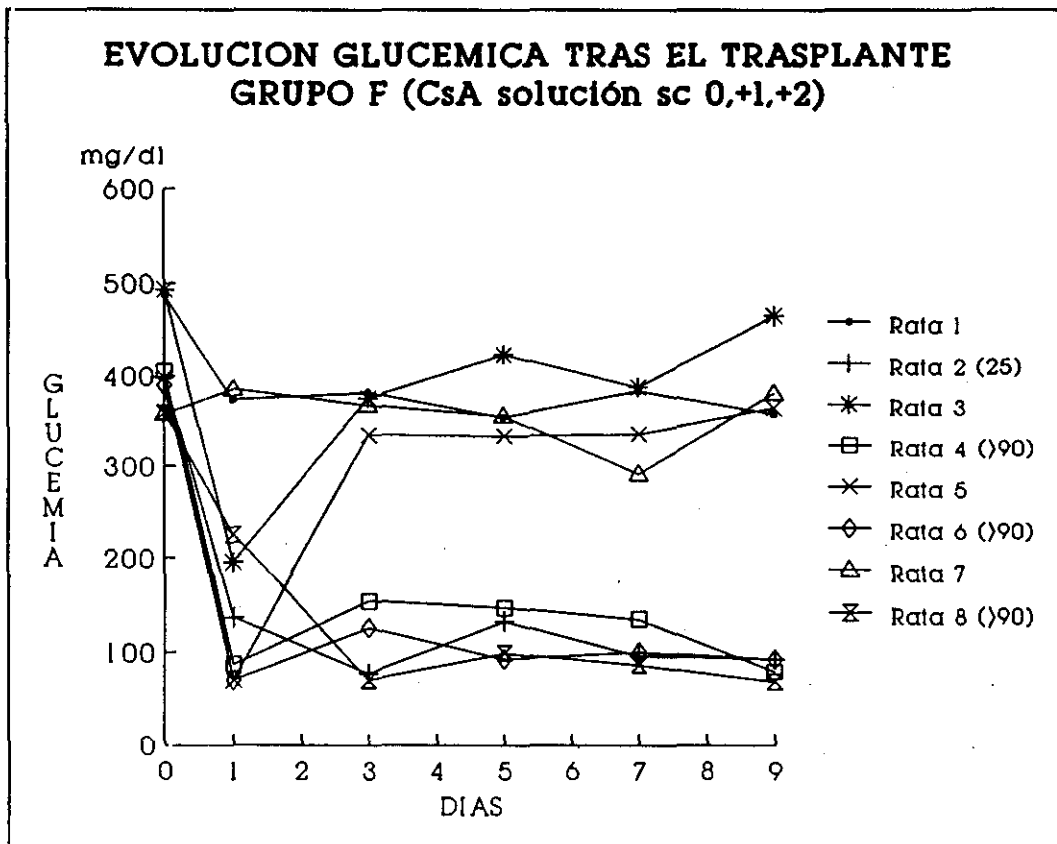
* refleja el límite de detección del reflectómetro (400 mg/dl).



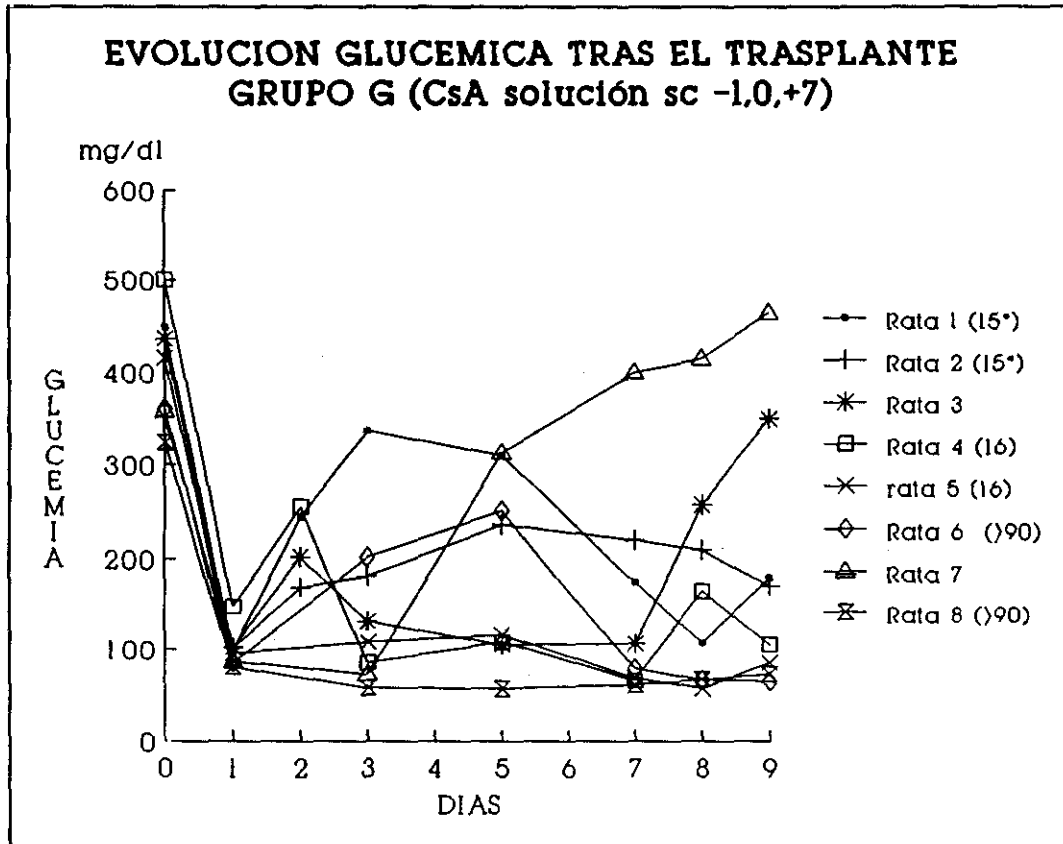
GRAFICA 9. El grupo D estaba constituido por ratas a las que se realizó TI bajo inmunosupresión con CsA administrada por vía oral los días -2,-1,0. La media de islotes fue de 1150, DS 484, intervalo 700-2000. La pureza media fue del 63%, DS 25, intervalo 40-90. La gráfica refleja la respuesta glucémica tras el TI. No se observaron variaciones glucémicas en ninguna de las ratas. El límite de detección del reflectómetro era de 400 mg/dl (*).



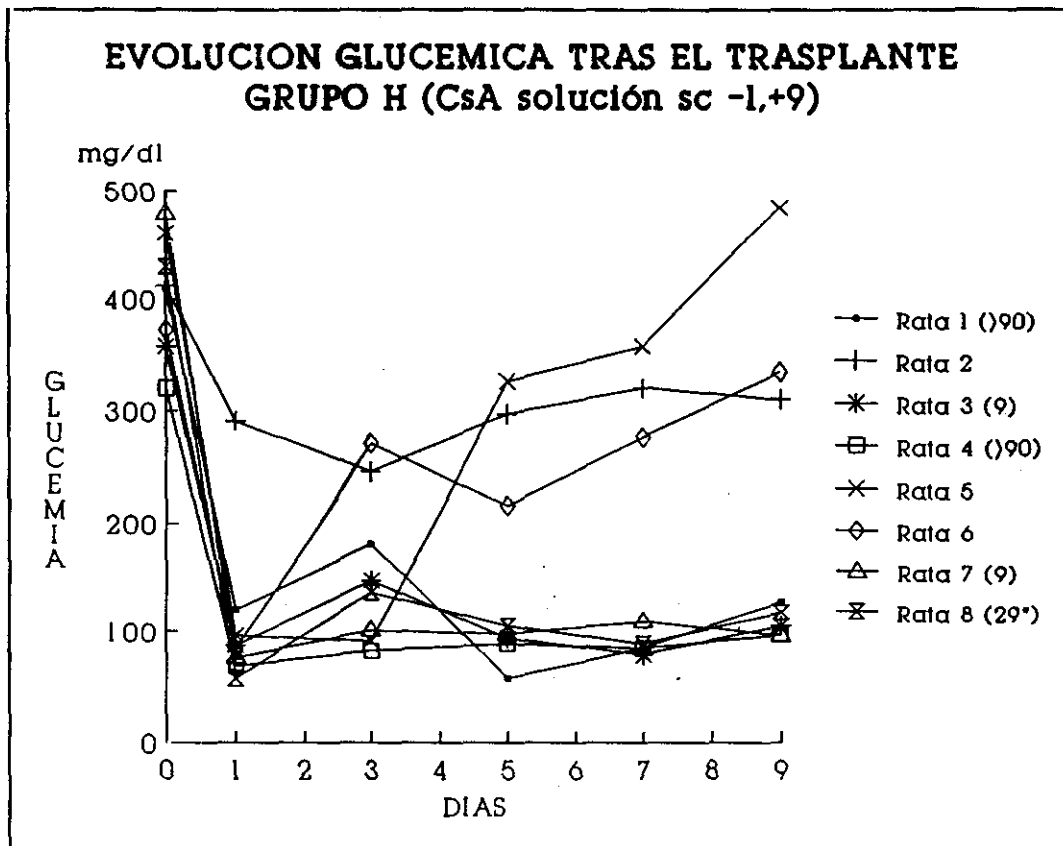
GRAFICA 10. El grupo E recibió inmunosupresión con CsA en polvo disuelta en aceite de oliva por vía subcutánea los días 0,1,2. Se trasplantaron una media de 1206 islotes, DS 378, intervalo 850-2000. La pureza media fue del 75%, DS 11, intervalo 60-90. Cinco de las 8 ratas mostraron una normalización de la glucemia superior a un día, cuatro de ellas superaron la primera semana, de las cuales tres tuvieron una reversión prolongada de la diabetes.



GRAFICA 11. El grupo F recibió CsA en solución disuelta en aceite de oliva por vía subcutánea los días 0,1,2. Se trasplantaron una media de 1156 islotes, DS 287, intervalo 600-1500, con una pureza media del 73%, DS 21, intervalo 40-90. Cuatro de las 8 ratas mostraron una reversión de la diabetes, siendo en tres de ellas superior a los 90 días.

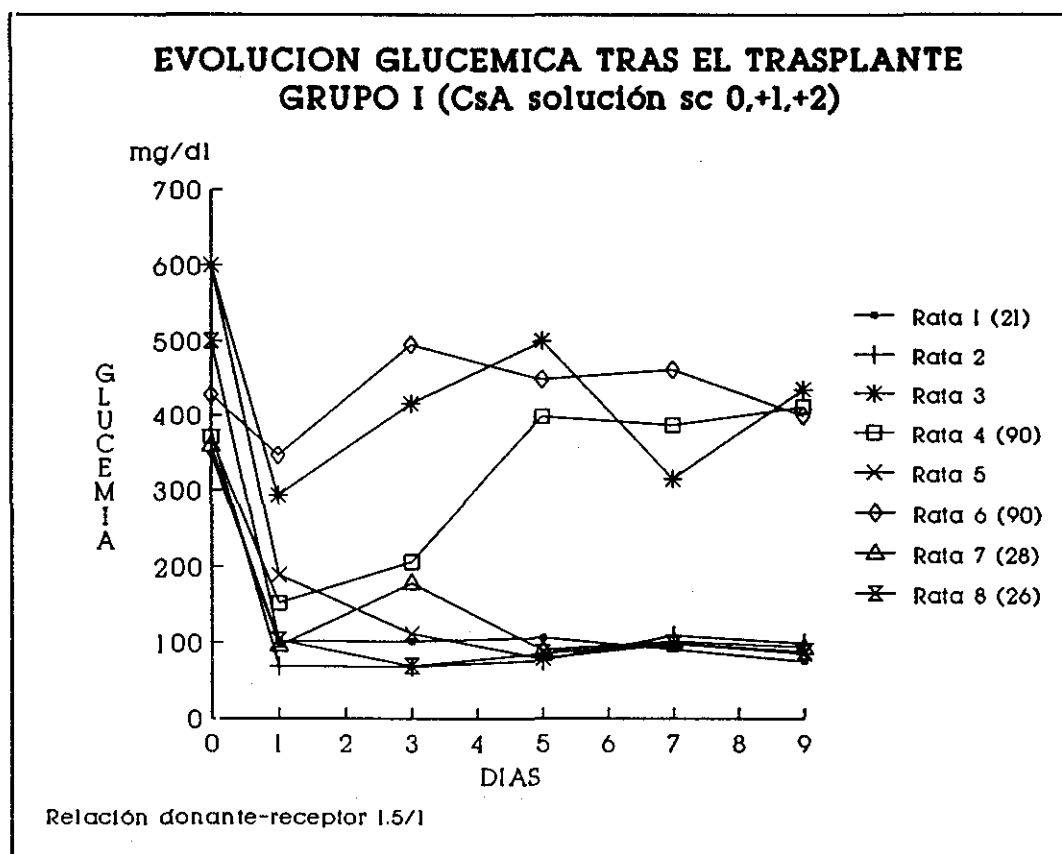


GRAFICA 12. Se refleja el comportamiento glucémico tras el TI en el grupo G en el cual se administró CsA los días -1,0,7 por vía subcutánea. Se emplearon una media de 1182 islotes, DS 212 e intervalo 1000-1600. La pureza media fue del 78%, DS 8, intervalo 70-90. En la mayoría de las ratas (1,2,3,4,5 y 6) se produjo una reversión parcial (alternando cifras de normoglucemia y leve hiperglucemia) de la diabetes en la primera semana que sólo en la rata nº 6 consiguió resolverse positivamente de forma prolongada. En las ratas nº 1 y 2 la glucemia no llegó a normalizarse totalmente (*) tras la 3ª dosis de CsA (día 7), presentando con frecuencia glucemias moderadamente elevadas (<300 mg/dl) durante las primeras dos semanas, tras las cuales reapareció posteriormente una hiperglucemia franca (>400 mg/dl). Únicamente la rata nº 8 mostró desde el primer momento una normalización glucémica completa y prolongada.



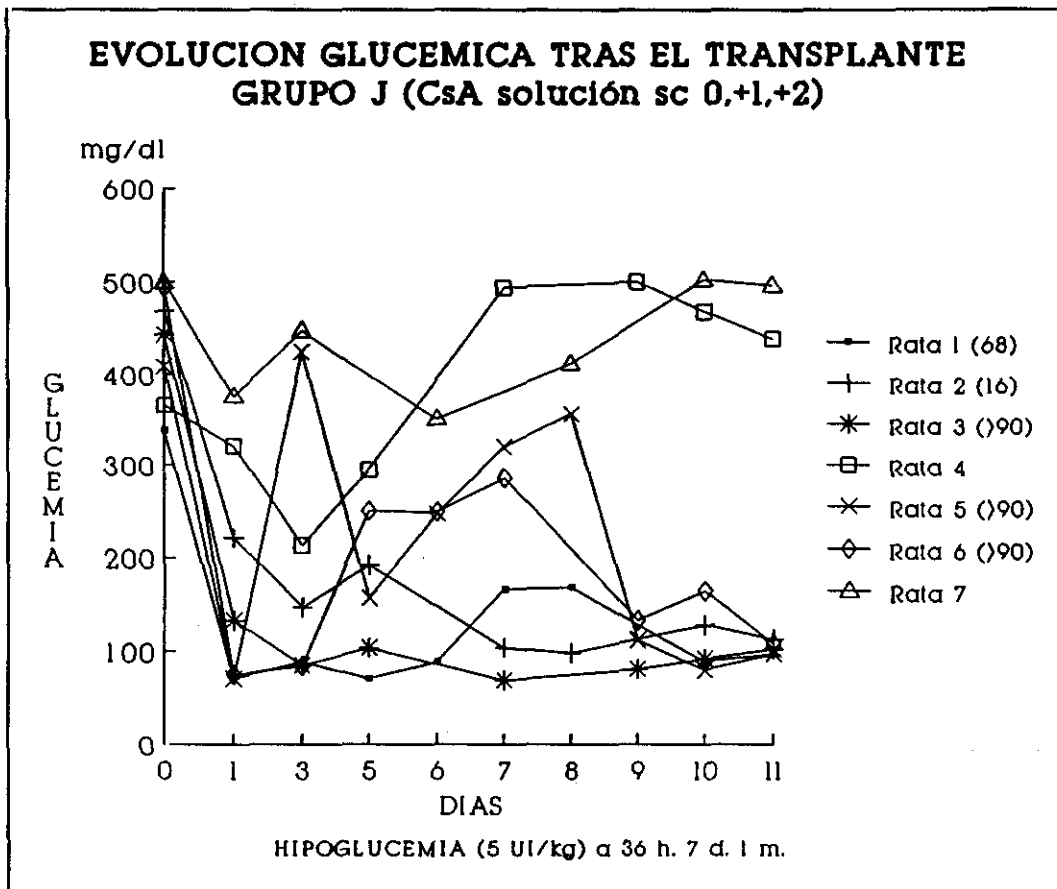
GRAFICA 13. El grupo H se constituyó con ratas a las que se realizó inmunosupresión los días -1 y 9. La media de islotes trasplantados fue de 1387, DS 294, intervalo 1000-1800. La pureza media fue del 78%, DS 8, intervalo 70-90.

Las ratas nº1 y 4 presentaron una normalización total de la glucemia desde el primer día que se mantuvo de forma prolongada. Las ratas 3 y 7 tuvieron una normalización total pero transitoria (9 días en ambos casos) de la glucemia, retornando posteriormente a niveles claramente hiperglucémicos. En el caso de la rata nº8 la diabetes presentó una reversión incompleta (*) durante 29 días.

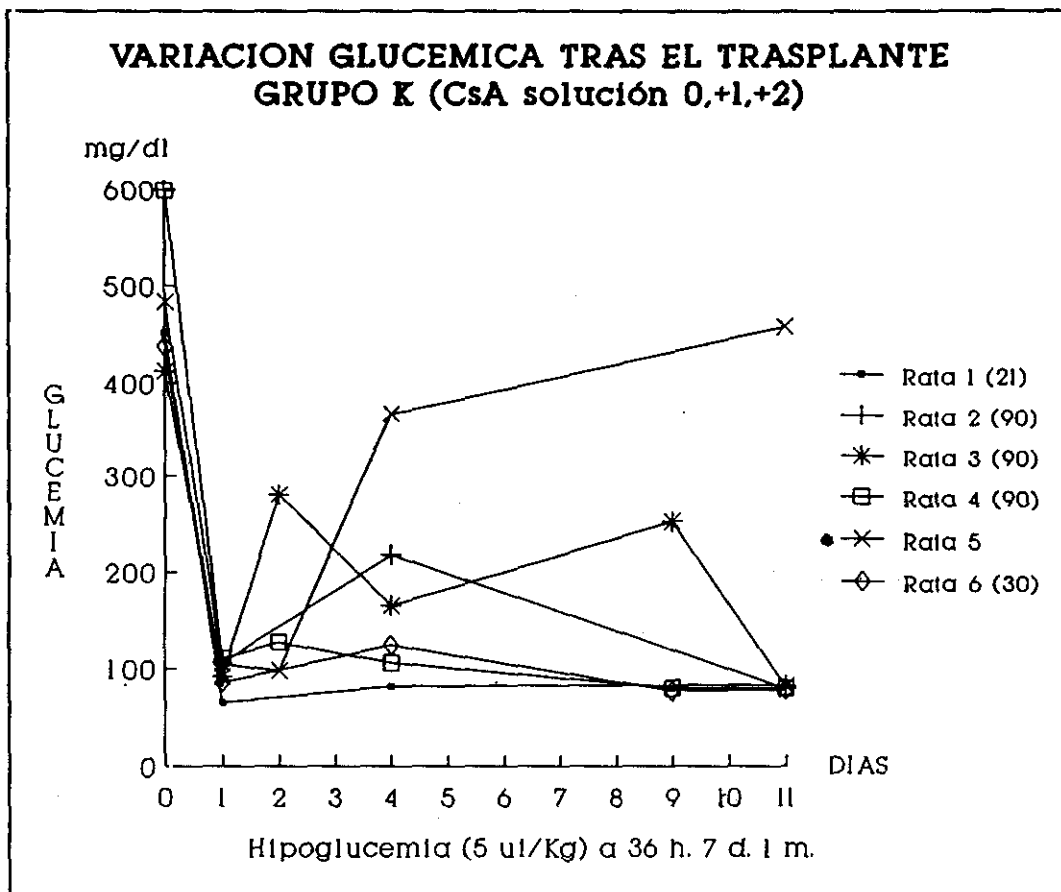


GRAFICA 14. Al igual que en los grupos E y F en el grupo I se utilizó CsA subcutánea los días 0,1,2 pero el número de islotes empleados fue mayor, manteniéndose una relación donante-receptor de 1.5:1. La media de islotes utilizados fue de 1600, con una DS de 185 y un intervalo de 1480-2000. La pureza media fue del 78%, DS 7, intervalo 60-85.

Cinco de las 8 ratas superaron inicialmente el rechazo del injerto pero en tres de ellas (nº 1,7 y 8) reapareció la diabetes a los 21, 28 y 26 días respectivamente. Las ratas nº 4 y 6 presentaron una reversión prolongada.



GRAFICA 15. El grupo J compartía con otros grupos anteriores la pauta de CsA sc los días 0,1,2. con la única diferenciación de la inyección sc de insulina lenta (5 u/kg) a las 36 horas, 7 días y 1 mes tras el TI, con idea de analizar la existencia de variaciones en la respuesta a la insulina tras el TI. Se utilizaron una media de 1181 islotes (DS 235), intervalo 950-1700. La pureza media fue del 85% (DS 5), intervalo 80-90. Se observó una respuesta inicial en 6 de las 8 ratas pero solamente 4 mostraron una reversión que superó los 90 días. De estas últimas, las ratas nº 1 y 4 presentaron una normalización completa desde el TI. Las nº 6 y 7 presentaron una reversión parcial hasta el 11º y 9º día respectivamente tras los cuales comenzaron a presentar euglucemia prolongada.



GRAFICA 16. El grupo K estaba constituido, tal como el grupo J, por ratas sometidas a inmunosupresión con CsA sc los días 0,1,2 a las que se administró insulina tal como se ha detallado. La media insular en este grupo fue mayor (1596) que en el grupo J, y su pureza menor (58). Cinco de las 6 ratas presentaron una reversión inicialmente pero, mientras en las ratas nº 1 y 6 reapareció la hiperglucemia a los 21 y 30 días respectivamente, en las nº 2, 3 y 4 la normalización glucémica se mantuvo por encima de los 90 días. Nótese que mientras en la rata nº 4 muestra euglucemia desde el inicio, las nº 2 y 3 presentan una reversión parcial en los primeros días que posteriormente se corrigió de forma mantenida.

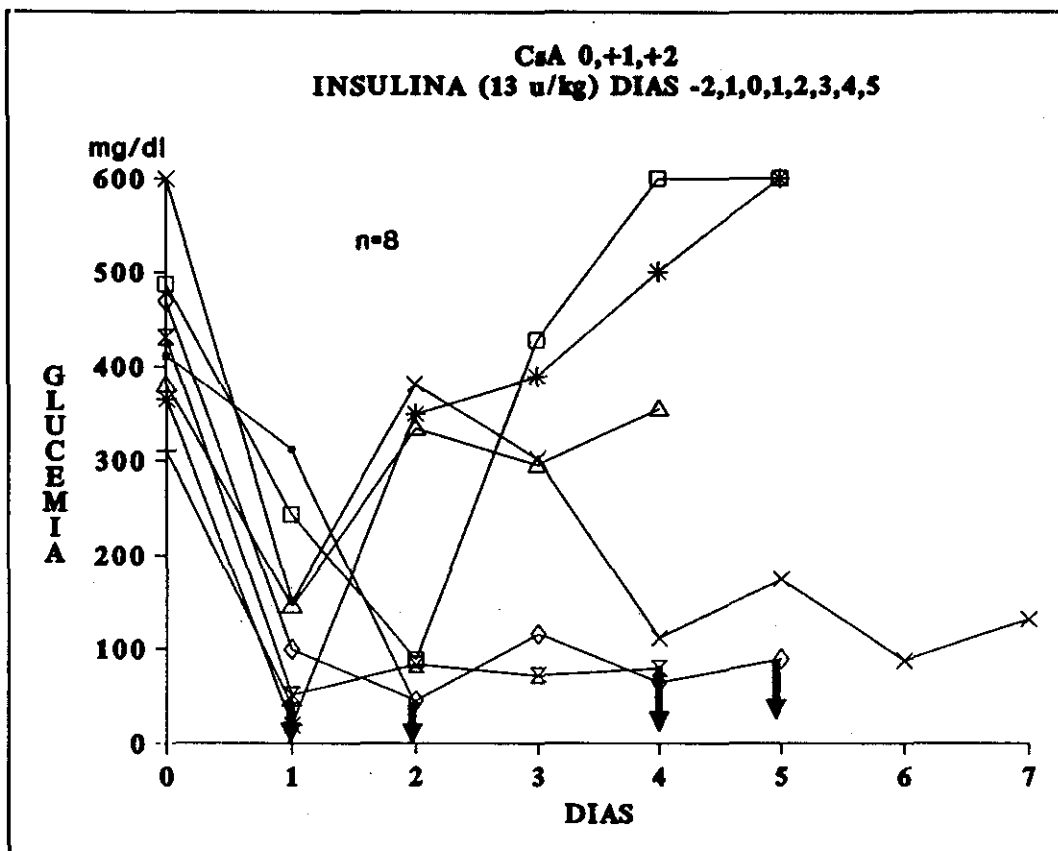
RESULTADOS DE TRASPLANTES. TODOS LOS GRUPOS.

	PAUTA CsA	OTROS FACTORES	>1 DIA	>7 DIAS	>30 DIAS	>90 DIAS	MEDIA DIAS
A	-----		0	0	0	0	0
B	-----	1.5:1	4/9	1/9	0	0	3.3
C	VO 0,1,2		0	0	0	0	0
D	VO-2-1,0		0	0	0	0	0
E	SC 0,1,2	CsA-polvo	5/8	4/8	3/8	3/8	35.6
F	SC 0,1,2		4/8	4/8	3/8	3/8	38.1
G	SC-1,0,7		8/8	6/8	2/8	2/8	31.3
H	SC -1,9		6/8	5/8	2/8	2/8	28.7
I	SC 0,1,2	1.5:1	5/8	5/8	2/8	2/8	27
J	SC 0,1,2	insulina	6/8	6/8	5/8	4/8	55.5
K	SC 0,1,2	insulina	6/6	5/6	3/6	3/6	53.8

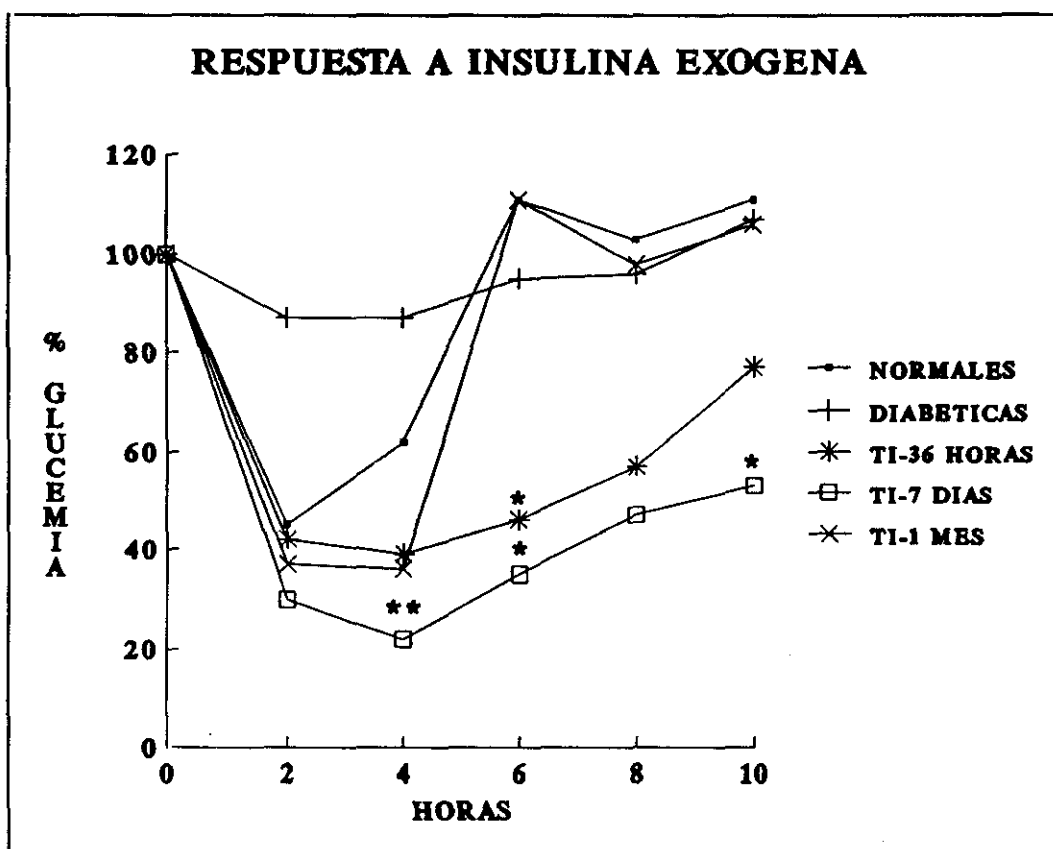
REVERSION PROLONGADA. TOTAL GRUPOS SC: 19/54 (35.1%)

REVERSION PROLONGADA. GRUPOS SC 0,1,2: 15/38 (39.4%)

TABLA 4. Esta tabla muestra el resultado de los TI en los diferentes grupos de ratas. En el grupo A (control con escaso número de islotes) no se observa variación glucémica tras el TI. El grupo B (control con una relación donante-receptor 1.5:1) muestra una normalización de la glucemia en la primera semana del TI en 4 de las 9 ratas del grupo pero solamente una supera mínimamente los 7 días (8 días de euglucemia). Los grupos C y D (CsA oral) no superan en ningún caso el primer día de euglucemia tras el TI. Los grupos E y F (ambos con una pauta de CsA sc. 0,1,2, difiriendo en la presentación de la CsA -polvo y solución respectivamente) muestran resultados prácticamente superponibles, con una reversión prolongada en 3 de 8 (37.5%) ratas en cada grupo. El resultado no se ve mejorado en el grupo I, con idéntica pauta de CsA pero incorporando un mayor número de islotes trasplantados. Los grupos G (CsA sc. 0,1,7) y H (CsA sc. -1,9) presentan ambos una reversión prolongada en 2 de las 8 ratas de cada grupo (25%). Los grupos J y K (CsA sc. 0,1,2 con administración exógena de insulina (5 u/kg) a las 36 horas 7 días y 1 mes de la implantación de los islotes) muestran unos resultados discretamente superiores, con un 50% de reversión prolongada en cada grupo.



GRAFICA 17. Se observa el impacto que la administración de insulina exógena (13 u/kg) provoca en ratas trasplantadas con pauta de CsA oral 0,1,2. La insulina se administró los días -2,-1,0,+1,+2,+3,+4,+5. Cuatro de las ocho ratas aparecieron muertas en la jaula (representadas por una flecha) observándose en los días previos glucemias bajas y mal estado general. Se representa la última glucemia observada antes del fallecimiento del animal.



GRAFICA 18. Se muestra la diferente respuesta glucémica de varios grupos de ratas a la administración de una dosis de 5 u/kg de insulina por vía subcutánea. Se realizó la prueba en un grupo de ratas sanas, diabéticas y trasplantadas 36 horas, 7 días y 1 mes antes. La respuesta se ha determinado de forma porcentual a la glucemia basal antes de la prueba. Los asteriscos representan la existencia de una diferenciación estadísticamente significativa (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) respecto al grupo de ratas sanas.

**CICLOSPORINEMIAS EN RATAS SANAS TRAS ADMINISTRACION 0,1,2
POR VIA ORAL**

RATA	1	2	3	4	5	6	MEDIA
2 H	528	986	1306	1422	828	1726	1132 (434)
1 D.	----	1388	926	930	796	844	976 (236)
2 D.	1592	646	1288	1838	2502	720	1421 (707)
3 D.	596	330	342	1254	1650	416	764 (555)
4 D.	208	124	112	882	584	132	340 (320)
7 D.	----	10	-----	-----	100	ND	36 (55)
9 D.	ND	ND	ND	8	18	ND	4 (7)
11 D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	---

TABLA 5. Esta tabla muestra los niveles de ciclosporina en plasma (RIA) en un grupo de seis ratas sanas a las que se han administrado tres dosis de 30 mg/kg de peso por vía oral en tres días consecutivos. Los valores reflejados en la casilla 2 h. muestran la ciclosporinemia a las 2 horas de la primera dosis de CsA. Las dosis ulteriores se administraron en los dos días sucesivos, inmediatamente después de la extracción de sangre para la determinación de los niveles plasmáticos. Vemos que existe una importante variabilidad de los niveles de la droga en las distintas ratas como muestran las desviaciones estándar, reflejada entre paréntesis bajo la media de valores.

En todos los casos existe un rápido declinar de las concentraciones de CsA más allá del 4º día del inicio de la ingestión de la droga, siendo prácticamente indetectable a partir del 7º día.

H.=hora, D.=día, ND=no detectable, ---=no determinado.

CICLOSPORINEMIA EN RATAS TRAS ADMINISTRACION 0,1,2 MEDIANTE INTUBACION ESOFAGICA

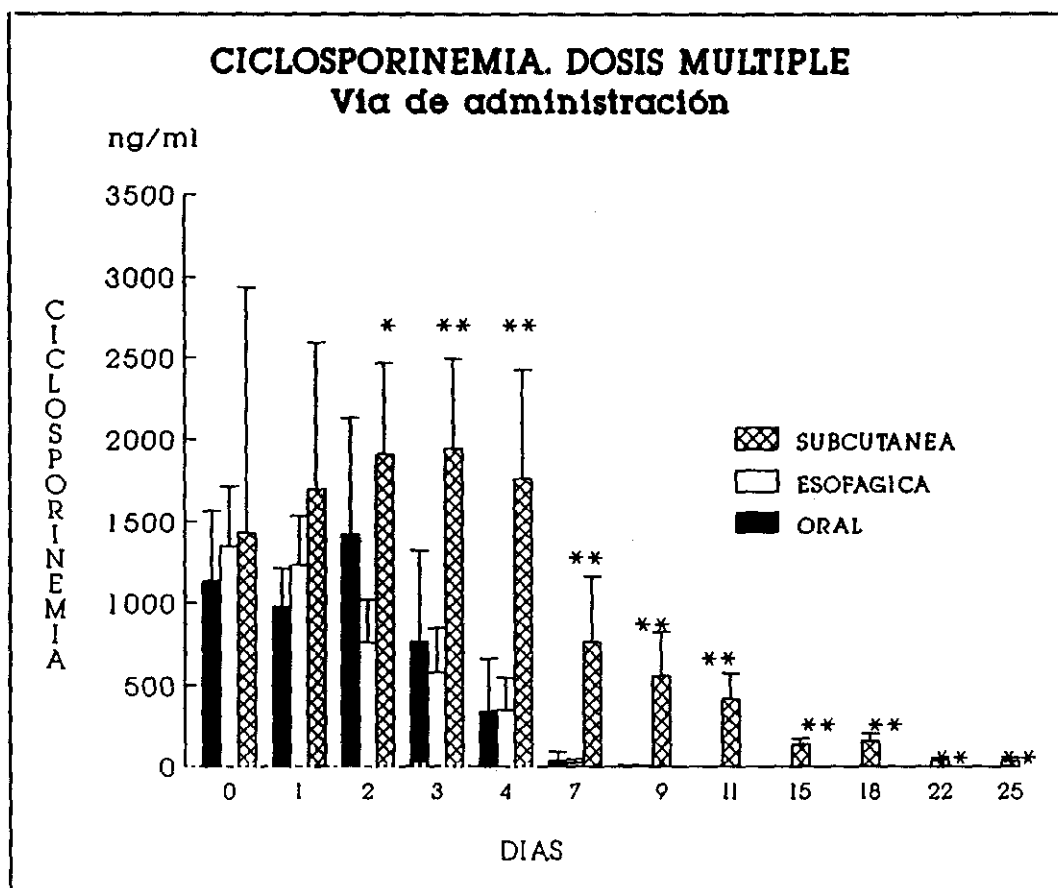
RATA	1	2	3	4	5	6	MEDIA
2 H.	714	1150	1546	1634	1342	1694	1346 (369)
1 D.	954	864	1228	1724	1280	1332	1230 (305)
2 D.	1172	448	848	846	722	512	758 (265)
3 D.	792	490	968	382	608	250	581 (265)
4 D.	452	648	386	200	322	68	346 (201)
7 D.	23	ND	66	30	23	ND	23 (24)
9 D.	ND	ND	8	5	ND	ND	2 (3)
11 D.	ND	ND	ND	ND	ND	ND	---

TABLA 6. En esta tabla aparecen los valores de ciclosporinemia determinados mediante RIA en un grupo de seis ratas sanas a los que se han administrado una dosis de CsA (30 mg/kg) mediante su introducción con una cánula esofágica en tres días consecutivos. De forma similar a la administración en la cavidad bucal, se observa una caída brusca a partir del cuarto día, siendo en el 7º día los niveles muy bajos, si no indetectables. El análisis estadístico no muestra diferencias significativas con el grupo oral, alcanzando únicamente en el 2º día una diferenciación en el límite de la significatividad ($p=0.056$).
H.=horas, D.=días, ND=no detectable, ()=desviación estándar.

**CICLOSPORINEMIA EN RATAS TRAS ADMINISTRACION 0,1,2
POR VIA SUBCUTANEA**

RATA	1	2	3	4	5	6	MEDIA
2 H.	2714	822	794	544	854	2860	1431 (1506)
1 D.	2782	1234	1212	878	1207	2900	1702 (892)
2 D.	2204	1604	1390	1528	2890	1840	1909 (558)
3 D.	2400	1480	1391	1882	2800	1708	1943 (551)
4 D.	2232	1198	1342	1854	2800	1166	1765 (656)
7 D.	1470	844	784	694	430	352	762 (397)
9 D.	874	648	786	538	264	238	558 (264)
11 D.	620	476	394	478	134	402	417 (160)
15 D.	158	160	162	154	94	86	135 (35)
18 D.	225	---	---	144	124	128	155 (47)
22 D.	20	40	25	61	48	32	37 (15)
25 D.	63	54	16	30	26	12	33 (20)

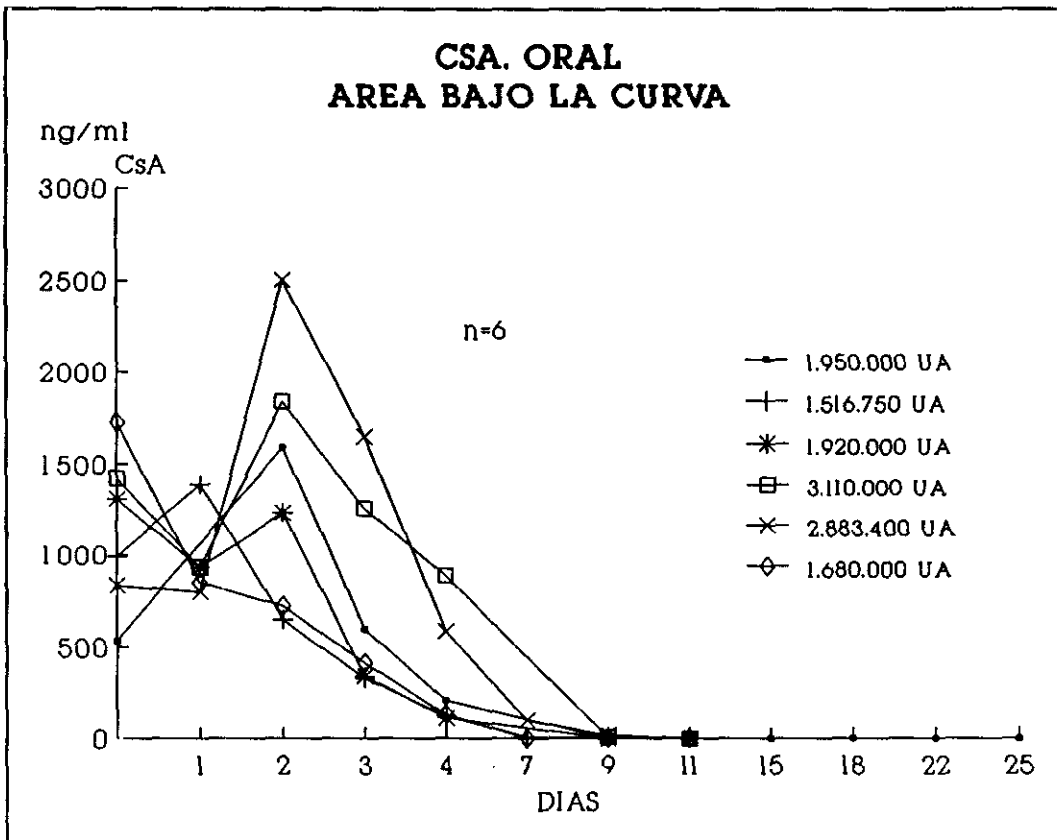
TABLA 7. La tabla superior muestra la concentración de ciclosporina en plasma en un grupo de ratas sanas a las que se han administrado una dosis de 30 mg/kg de peso de la droga durante tres días consecutivos mediante inyección subcutánea. A diferencia de los anteriores grupos en que la administración fue por vía entérica, en esta serie de ratas se observan niveles de ciclosporinemia incluso a los 25 días de su administración. Si bien los niveles alcanzados tras la primera dosis de CsA (casillas 2 H. y 1 D.) no muestran unas diferencias importantes respecto de los grupos de administración enteral, a partir del 2º día comienzan a mostrar niveles claramente superiores a aquellos, alcanzando una clara diferenciación estadística ($p < 0.001$) con ambos grupos oral y esofágico. H.=horas, D:=días, ---=no determinado, ()= desviación estándar.



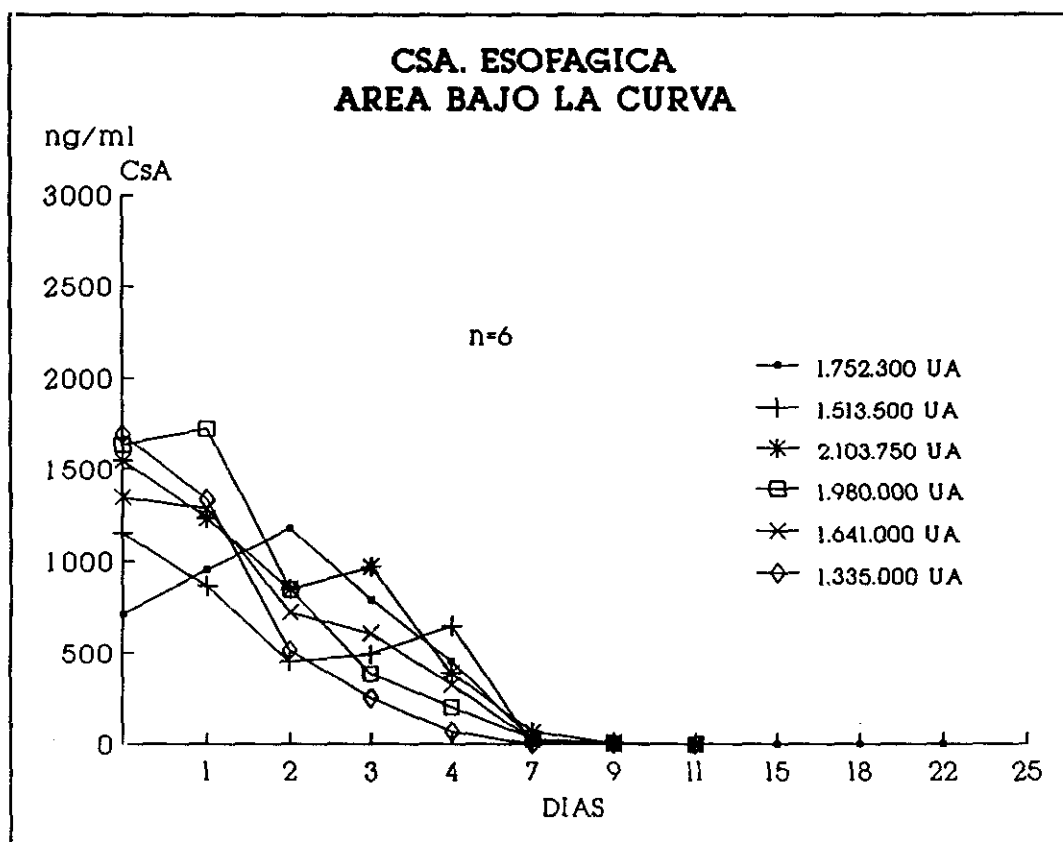
GRAFICA 19. Se representan las ciclosporinemias determinadas de ratas sanas a las que fueron administradas tres dosis (30 mg/kg) diarias de CsA en días consecutivos. Las ratas se agruparon en tres grupos en función de la vía de administración de la droga: oral, esofágica o subcutánea. Las determinaciones de CsA de los días 1 y 2 se realizaron de forma previa a la 2ª y 3ª dosis respectivamente.

* $p < 0.05$ de CsA sc. respecto a CsA esofágica en día 2.

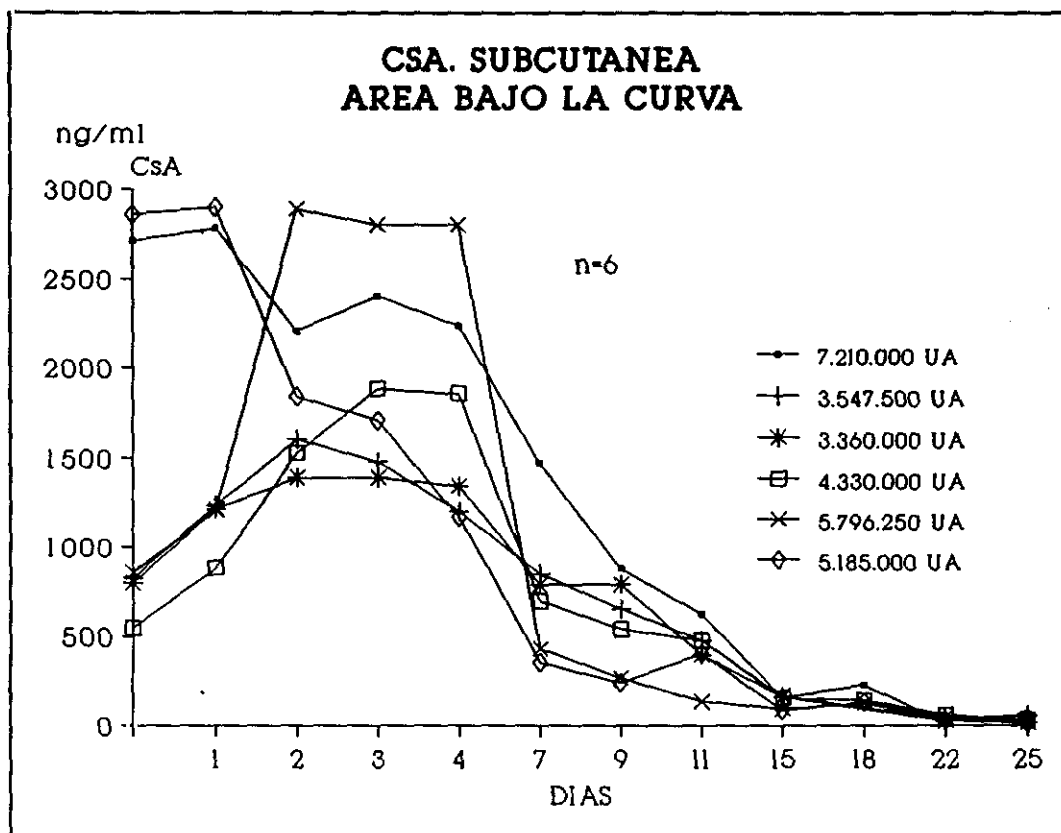
** $p < 0.01$ de CsA sc. respecto a CsA oral y esofágica en días ulteriores.



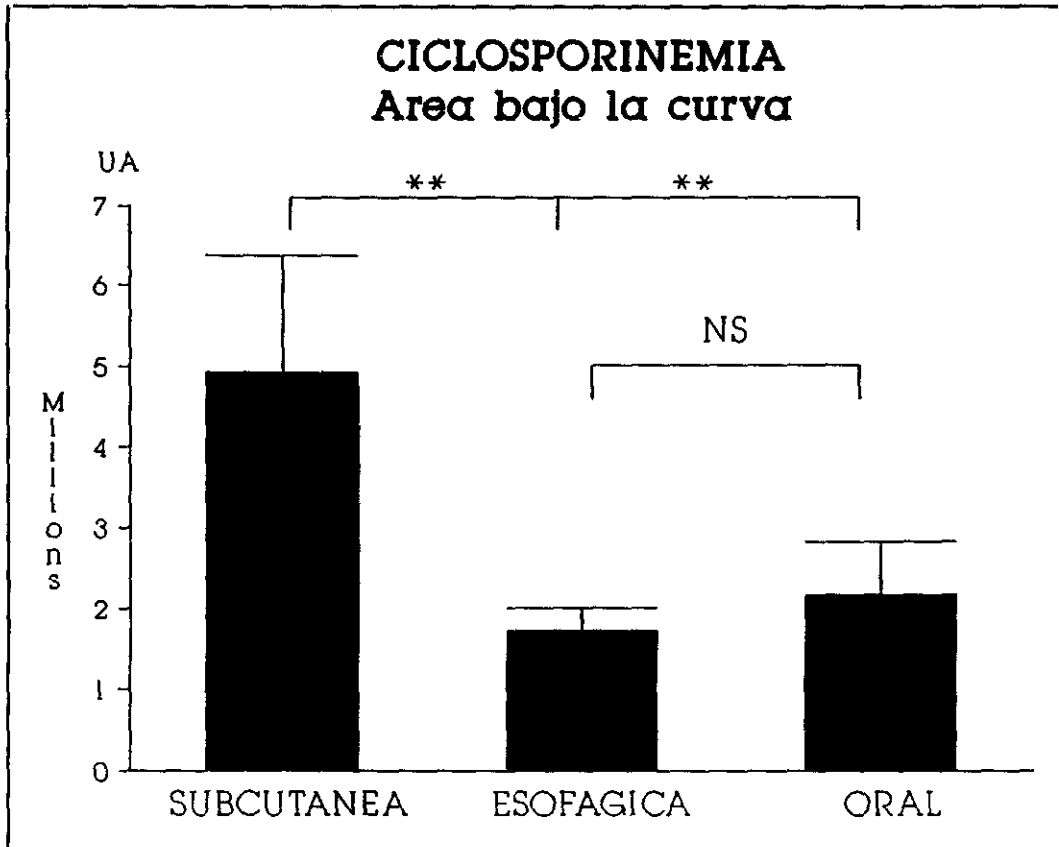
GRAFICA 20. Representación de las ciclosporinemias de las ratas a las que se administró CsA por vía oral tres días consecutivos. Se ha determinado el área total bajo la curva de la concentración de CsA en cada animal de forma individual mediante la regla del trapecoide a lo largo del total de días, representando los resultados como unidades arbitrarias (UA).



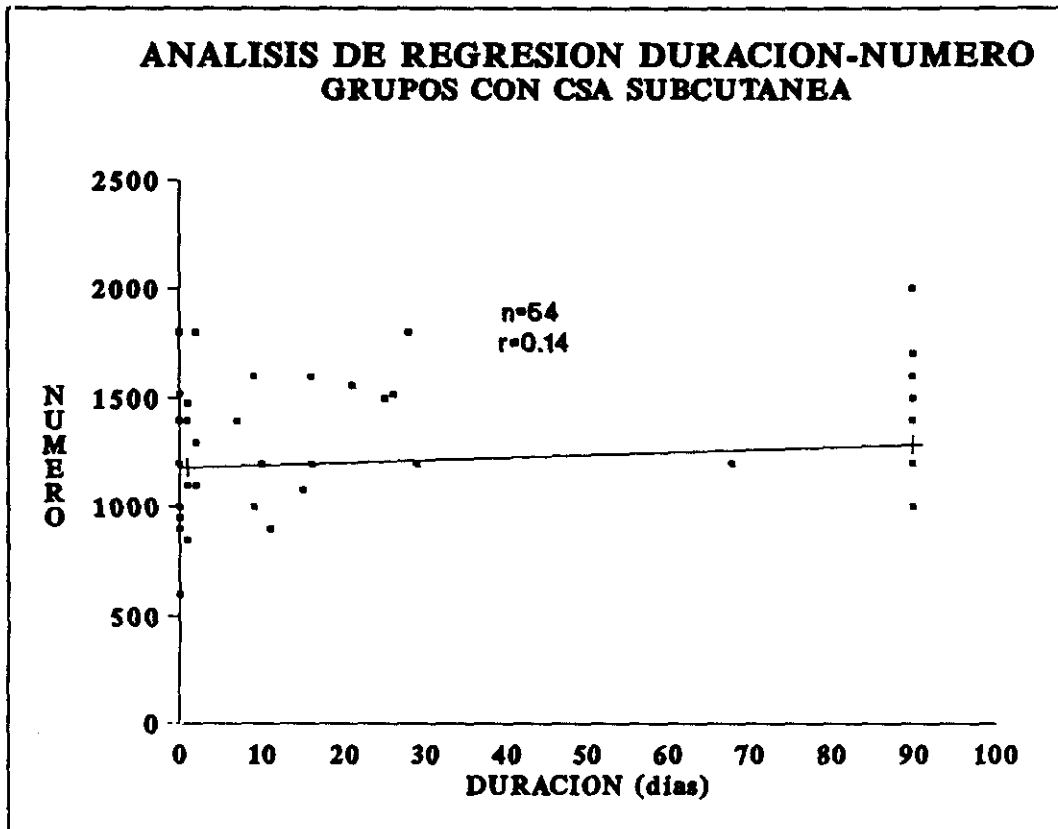
GRAFICA 21. Representación gráfica de las concentraciones plasmáticas de CsA en el grupo de ratas con CsA administrada mediante intubación esofágica, con sus respectivas áreas bajo la curva de las ciclosporinemias. (UA= unidades arbitrarias).



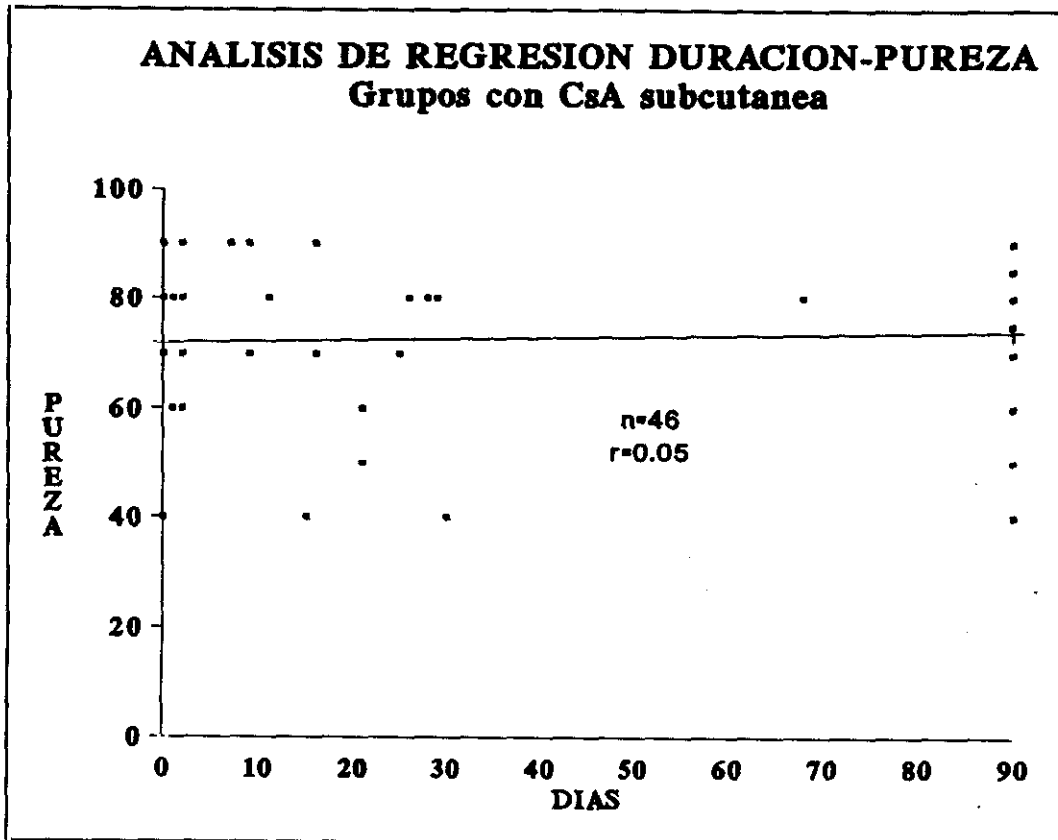
GRAFICA 22. Gráfica representativa de las ciclosporinemias del grupo tratado mediante vía subcutánea con sus respectivas áreas bajo la curva de los niveles plasmáticos de la droga. (UA= unidades arbitrarias).



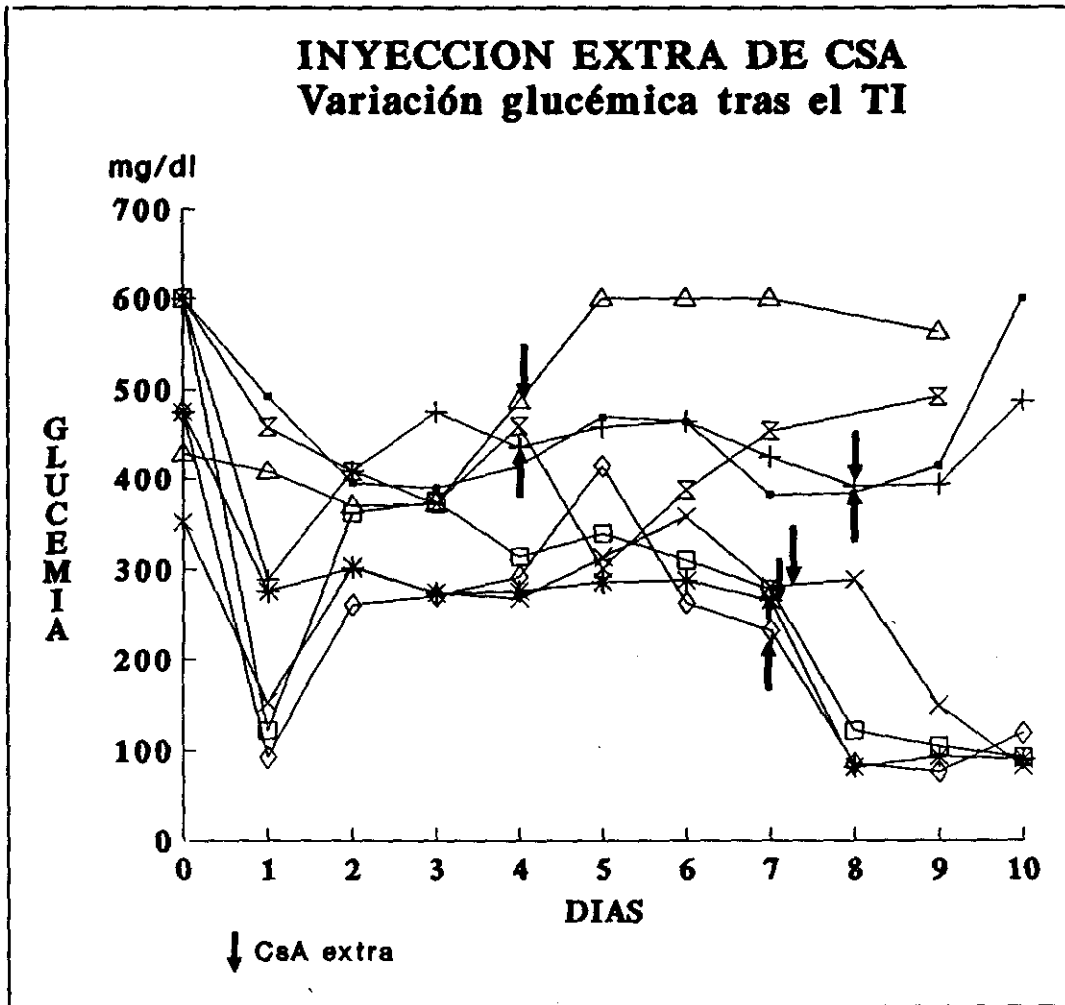
GRAFICA 23. Ciclosporinemias representadas mediante la suma de las áreas bajo la curva de las concentraciones plasmáticas de la droga en cada grupo tratado con CsA oral, esofágica y subcutánea. Mientras que las dos primeras no muestran una diferencia significativa (NS) el grupo tratado con CsA subcutánea muestra unos niveles superiores (**) a los otros dos grupos ($p < 0.01$).



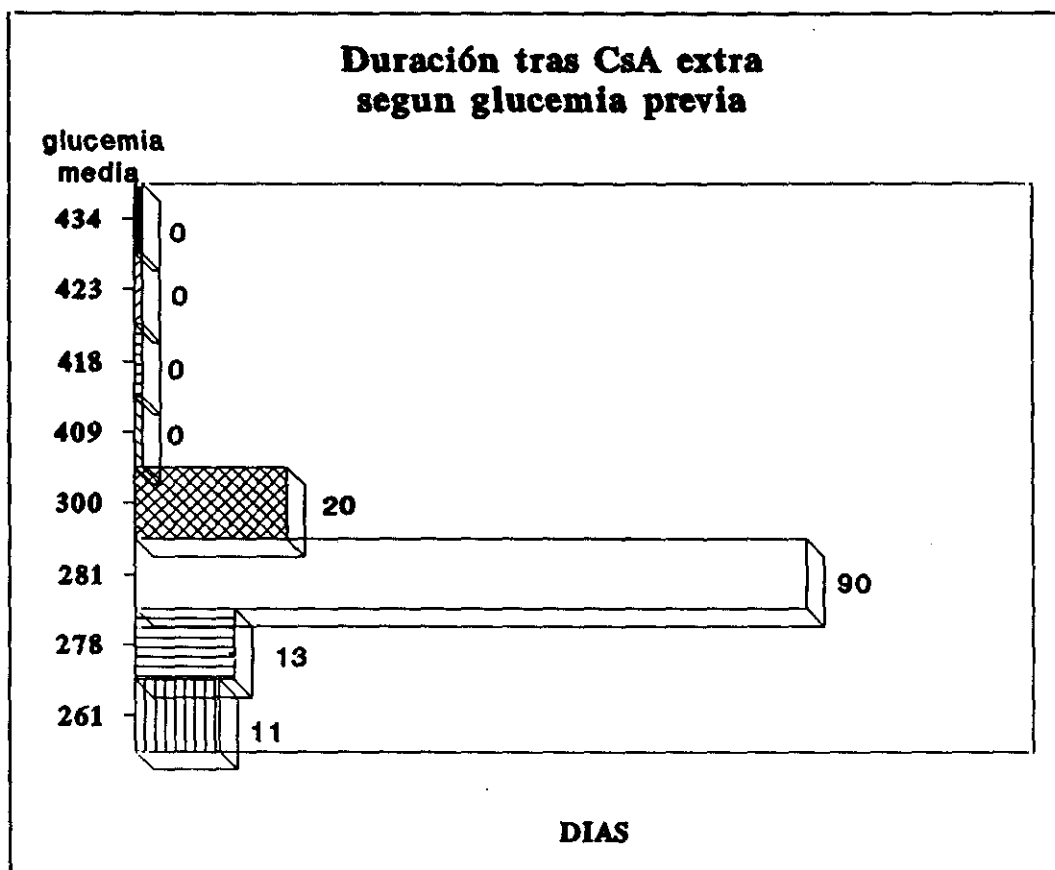
GRAFICA 24. Representación del análisis de regresión de la duración de la normoglucemia y el número de islotes trasplantados en el total de los grupos tratados con CsA subcutánea. Obsérvese que existe una muy débil positividad con un pobre coeficiente de correlación lo cual avala la ausencia de relación entre el número de islotes trasplantados y el resultado del TI cuando se utilizan un mínimo de islotes (>1000).



GRAFICA 25. La gráfica refleja el análisis de regresión entre la pureza de la preparación insular y el resultado del trasplante en las ratas en las que se utilizó CsA subcutánea. Es obvia la ausencia de correlación ($r=0.05$) entre ambas variables para las purezas estimadas, siempre superiores al 40%



GRAFICA 26. Se refleja el impacto que una dosis extra de CsA subcutánea ejerce sobre la glucemia de un grupo de ocho ratas sometidas a un TI con pauta perioperatoria de CsA subcutánea los días 0,1,2 que no mostraron una normalización de la glucemia tras la implantación. En dos ratas la CsA extra se administró el 4º día del TI, en otras dos se hizo el 8º día y en cuatro el día 7º. Mientras que 4 de las 8 ratas no vieron modificados sus niveles de glucemia previos otras 4 experimentaron una normalización glucémica tras la dosis extra de CsA que se prolongó durante un período variable de tiempo.



GRAFICA 27. En esta gráfica queda reflejada la respuesta de cada rata del grupo anterior tras la administración de una dosis extra de CsA y su relación con la glucemia media post-trasplante. Obsérvese que las cuatro ratas cuya glucemia media era mayor de 400 mg/dl (434, 423, 418, 409 respectivamente) no respondieron a la dosis extra. En cambio las cuatro ratas cuya glucemia no superaba los 300 mg/dl (300, 381, 278 y 261) mostraron una respuesta inicial que se prolongó durante un período variable de días. En tres de ellas la reversión de la diabetes fue transitoria (20, 13 y 11 días) mientras que en la cuarta fue prolongada (>90 días). En este subgrupo respondedor no se apreció una relación directa entre la glucemia previa y la duración de la normogluemia.

DISCUSSION

DIGESTION ENZIMATICA

El proceso de aislamiento de islotes pancreáticos en roedores agrupa una serie de etapas, cada una de ellas determinantes en el resultado final del aislamiento. El objetivo es conseguir el mayor número de islotes viables, con un máximo grado de pureza y con un funcionalismo intacto.

En primer lugar, siguiendo un orden cronológico del proceso, figura la digestión pancreática del tejido exocrino, la cual permite separar los islotes del resto de la estructura pancreática. Ello se consigue mediante la acción enzimática de la colagenasa, que provoca una disrupción de las conexiones fibrosas que unen los islotes a los acinis, así como a los septos interlobulares y cápsula pancreática.

Las preparaciones de **colagenasa** utilizadas en el aislamiento de islotes, procedentes del cultivo de *Clostridium histolyticum*, no son puras sino que se hallan contaminadas por otras enzimas que incluyen proteasas no específicas. Curiosamente, parecen más efectivos los preparados con contenido proteolítico inespecífico que los más puros (McShane y col. 1989). Por este motivo consideramos que la preparación utilizada es un factor importante a tener en cuenta debido a la diversidad de la actividad proteolítica de las diferentes preparaciones comerciales. Incluso dentro del mismo tipo de colagenasa existe una importante variabilidad según los distintos lotes.

Con el fin de trabajar siempre con una preparación uniforme en

nuestros trabajos hemos trabajado siempre con colagenasa tipo V de la casa comercial Sigma y, en lo posible, obtenida siempre de un mismo lote para evitar variaciones en el grado de digestión enzimática debidas a este motivo en los distintos experimentos. La elección de una determinada concentración de colagenasa se basa en la mayoría de los grupos de investigación en términos empíricos. Lo que sí parece guardar correlación es la actividad intrínseca del tipo de colagenasa utilizada y la concentración a la que se prepara (Gray y col. 1992). Así, la colagenasa Sigma tipo V, que posee una actividad de unas 500 unidades /mg de peso seco, se prepara generalmente a una concentración de 6 mg/ml, mientras que la colagenasa Sigma tipo XI posee una mayor actividad, del orden de 1500 u/mg, por lo que se prepara a concentraciones menores (3 mg/ml). Generalmente la solución de colagenasa se prepara mediante su dilución en solución de Hank (salina fisiológica).

La colagenasa puede ser administrada mediante una **inyección** intraductal, lo que se denomina técnica de cargado, o bien mediante un sistema de perfusión continua. Existen discrepancias entre la mayor eficacia de un sistema u otro (Warnock y col. 1989, Ricordi y col. 1988). El sistema de perfusión continua aporta la ventaja teórica de que alcanza una temperatura óptima más rápidamente debido a la presencia de un sistema de recirculación y la colagenasa llega mejor a todas las zonas del pancreas, pero añade una complejidad y coste al sistema que contrarresta sus probables ventajas.

Para la digestión pancreática hemos utilizado la técnica de la

distensión pancreática mediante inyección intraductal de colagenasa, descrita por Horaguchi y col. en perros en 1981, la cual fue posteriormente aplicada a ratas por Sutton y col. en 1986.

La **distensión** del pancreas por la colagenasa debe ser lo suficientemente completa como para permitir una diseminación de la colagenasa por todo el parénquima. Una adecuada distensión favorece asimismo la extirpación del órgano al hacer más ostensible la delimitación del órgano con las estructuras vecinas (duodeno, colon transverso, estómago y bazo). El volumen de solución de colagenasa inyectado y la presión de inyección son factores que pueden afectar el resultado de la digestión, pero existen pocos datos al respecto. En nuestros experimentos hemos inyectado 4 ml de solución de colagenasa en aproximadamente 20-30 seg. Un volumen excesivo (superior a los 2 ml/gr. de tejido) puede provocar rupturas del sistema ductal y ocasionar una extravasación de colagenasa sin mejorar a pesar de ello los resultados (Gray y col. 1992).

Se debe evitar la extravasación de colagenasa por el sitio de punción para lograr una buena distensión. Para ello es importante utilizar una cánula adecuada (21 o 23 g.), cuyo grosor es similar a la luz del ductus, inyectar la solución lentamente y, si es preciso, pinzar con hilo de sutura o bien digitalmente la zona del ductus que se canula.

La digestión enzimática se lleva a cabo en un baño de agua destilada en el cual se introducen los tubos que contienen los

pancreas distendidos sumergidos en solución MEM. En esta fase hay una serie de variables que influyen en el grado de separación de los islotes, como son la temperatura de incubación, la duración de la digestión y la existencia de una agitación continua. Esta última mejora la disrupción del tejido fibroso, especialmente los septos interlobulares y cápsula pancreática (Van Suylichem y col. 1987) los cuales son afectados por la colagenasa en menor medida y, por tanto, facilita una mejor liberación de los islotes. Para lograrlo, durante la incubación se activa el mecanismo de agitación del baño de forma suave y, una vez finalizada aquella, se efectúa una agitación del tubo de forma manual más enérgica durante 1 minuto.

La **actividad** de la colagenasa disponible comercialmente es mínima a temperaturas inferiores a los 4°C. Entre 4°C y 43°C la actividad enzimática se incrementa progresivamente y por encima de los 46°C comienza a descender, probablemente por denaturalización proteica (Gray y col. 1992). Podría pensarse que la eficacia de la colagenasa sería mayor a temperaturas más altas pero por encima de los 41°C se compromete la viabilidad del islote y además se obtiene un producto de digestión más impuro al modificar las densidades celulares que alterarán una diferenciación ulterior mediante gradientes de densidad.

La temperatura de incubación óptima para los islotes varía significativamente entre diversas especies aunque oscila entre los 37°C y 41°C en la mayoría de los mamíferos, incluido el humano (Sutton y col. 1989). Como excepción, parece ser que en el caso de los islotes porcinos se obtienen mejores resultados

a temperaturas más bajas, del orden de los 24°C (Ricordi y col. 1986). En el caso de los roedores varía entre los 37 y 39°C (Sutton y col. 1989). En nuestros trabajos hemos mantenido constante la temperatura de incubación en torno a los 37°C para evitar la posible influencia de diferentes temperaturas en el resultado de aislamiento.

En lo referente a la **duración** de la incubación, un tiempo de digestión excesivo altera la viabilidad del islote mientras que una digestión insuficiente no permite una liberación adecuada del mismo de sus conexiones fibrosas y, al tiempo que disminuye el número de islotes obtenidos, su separación incompleta origina racimos de islotes unidos al esqueleto fibroso que interferirán con el ulterior proceso de purificación con gradientes de densidad. La diferente actividad de los distintos tipos de colagenasa, junto a las variaciones entre los pancreas de las diversas especies, dificultan la estandarización del tiempo de digestión enzimática. Los tiempos de incubación estimados en roedores se establecen entre los 18-19 minutos, mientras que en humanos es del orden de los 21 minutos (Gray y col. 1984). Nosotros hemos mantenido constante el tiempo de incubación, 18 minutos, a los que sumamos un minuto adicional posterior, ya fuera del baño, durante el cual realizamos una agitación manual enérgica de los tubos con el material digerido, con objeto, como ya se ha mencionado previamente, de facilitar la disrupción de las conexiones fibrosas de los islotes que han resistido la acción de la colagenasa.

Una vez conseguida una digestión pancreática adecuada es preciso detener la reacción para evitar un daño del islote que afectaría la viabilidad y funcionalidad de la célula beta. Ello se lleva a cabo mediante el enfriamiento y dilución del producto de digestión -con o sin la adición previa de quelantes de calcio- mediante sucesivos lavados. Estos se realizan generalmente con soluciones salinas como la de Hank, o MEM (minimal essential medium), si bien hay investigadores que utilizan otras soluciones como Eurocollins o UW (University of Wisconsin) que al parecer mejoran la preservación del islote y su ulterior purificación (Van der Burg y col. 1990, Gray y col. 1992). Los pasos siguientes del proceso se realizan con los materiales previamente enfriados para evitar ascensos de la temperatura. Así, la malla de nylon con poros de 500 μm , el recipiente donde se recogen los islotes, los tubos universales y la solución de MEM se mantienen en hielo con este fin.

El **filtrado** del digerido a través de la malla de nylon permite una primera purificación grosera del material ya que impide el paso de la red fibrosa pancreática así como el tejido mesentérico y grasa visceral que pudiera estar adherida al pancreas. Inevitablemente habrá una indeterminada cantidad de islotes que se perderán en este filtrado pero es un precio que hay que pagar para intentar realizar una ulterior separación por gradientes más limpia. La proporción de material insular que se perderá en este paso dependerá en gran medida del grado de distensión previa del pancreas tras la inyección de colagenasa y del grado de digestión enzimática, de modo que cuando éstos no han sido óptimos se

observa una mayor cantidad de material pancreático que no pasa el filtro, y con él quedarán atrapados un mayor número de islotes.

GRADIENTES DE DENSIDAD

Una vez liberados de las estructuras conectivas vecinas, la separación de los islotes del resto del material digerido se consigue en gran medida mediante la utilización de gradientes de densidades de un determinado medio. Ya se comentó previamente la gran cantidad de medios que se han llegado a emplear para la formación de gradientes. Actualmente los más utilizados son el Ficoll y la BSA. La purificación de islotes se logra en base a la diferente densidad de los islotes respecto a los contaminantes exocrinos.

Los islotes pancreáticos de rata tienen una densidad que oscila entre los 1.063 y 1.067 g/ml mientras que la densidad de las células exocrinas es mayor de 1.082 g/ml (James y col. 1992). Otros contaminantes no exocrinos tales como el tejido ductal y linfoide tienen una densidad más baja, del orden de los 1.055 g/ml (Lake y col. 1989).

La utilización de Ficoll o BSA ha sido materia de controversia entre diferentes investigadores. El Ficoll comenzó a utilizarse como medio separador por Lindall en 1969, siendo variable los resultados obtenidos por diferentes grupos que lo utilizaban, lo que parecía relacionarse con una variabilidad en los diferentes lotes (Sharp 1973). La BSA fue introducida como medio de fraccionamiento de eritrocitos en 1964 (Leif y col. 1964) y posteriormente se utilizó para separar subpoblaciones de esplenocitos (Sunshine y col. 1978). En el aislamiento de islotes pancreáticos no se utilizó hasta 1987 (Lake y col. 1987).

Ficoll y BSA constituyen buenos medios de purificación insular si bien poseen peculiaridades diferentes que afectan al proceso de purificación. La solución de Ficoll es más clara que la BSA y facilita por ello la visión directa de los islotes. Además su naturaleza química y no biológica hace más difícil la contaminación por microorganismos (London y col. 1992). En cambio la BSA tiene una serie de propiedades que aventajan a otros medios. En primer lugar, debido a su alta concentración proteica impide la tendencia natural de las células a formar agregados. Por otro lado, ha sido demostrada la capacidad de la BSA para inhibir la liberación enzimática, ayudando de esta forma a preservar la viabilidad del islote (Wolters y col. 1990). Por último la BSA, tanto en forma de solución madre (35%) como en todas las diluciones que se preparan mediante la adición de MEM, poseen una osmolaridad fisiológica (alrededor de 320 mosm/kg) mientras que el Ficoll es hiperosmolar (400-450 mosm/kg) según la dilución de que se trate. La exposición mantenida de los islotes a soluciones hiperosmolares va en detrimento de su viabilidad aunque es preciso señalar, en defensa del Ficoll, que las células son capaces de recuperarse de exposiciones cortas a un ambiente hiperosmolar sin efectos deletéreos permanentes (James y col. 1992). En nuestro proyecto experimental de aislamiento de islotes comenzamos inicialmente utilizando Ficoll pero los resultados tanto en número como en pureza de islotes obtenidos han sido mejores con BSA por lo que decidimos cambiar a BSA como medio de constitución de los gradientes. Un importante factor a tener en cuenta es que existe una cierta variabilidad inherente a cada preparación comercial en lo referente a su

densidad y osmolaridad que es debida a la diferente precipitación de la albúmina durante el lavado y dializado de la misma dentro del proceso de purificación comercial (Lake y col. 1989).

Por ello la elaboración de las soluciones con diferente densidad para la creación de gradientes no se ajusta necesariamente a unas cantidades fijas de BSA y MEM, siendo preciso determinar mediante un densitómetro la densidad de cada solución recién elaborada, ajustando y variando las proporciones de ambos constituyente para obtener las densidades exactas que queramos lograr. Si no se realiza este ajuste podremos obtener densidades erróneas que provocarán una mala separación de los islotes del resto de la preparación, dando como resultado un material insular con una alta proporción de contaminantes exocrinos o incluso la ausencia de diferenciación de los islotes en su interfase correspondiente.

La elección de las densidades de BSA para la constitución de los gradientes la hemos establecido tras una serie de pruebas con diferentes combinaciones de densidades en función del grado de separación y pureza de los islotes. Hemos mantenido invariables las densidades extremas, 1.085 y 1.056, modificándose la densidad intermedia en función de los resultados obtenidos en cuanto a número y contaminación de material no endocrino. Cuando se utiliza 1.069 como densidad intermedia, los islotes se depositan pegados a la capa de tejido exocrino, que ocupa el fondo del tubo de gradiente, a nivel de la interfase 1.085/1.069. La recogida de los islotes conlleva inevitablemente un acompañamiento de impurezas muy importante. La utilización de la densidad 1.072 produce un depósito exiguo de islotes en la interfase adecuada

(1.072/1.056) al tiempo que la mayoría se depositan en la interfase inferior (1.085/1.072) junto al material exocrino.

Con el gradiente de 1.075 hemos obtenido mejores resultados, logrando que los islotes se depositen en la interfase superior (1.075/1.056) en ocasiones, pero no de forma invariable, de modo que en otras pruebas realizadas con esta densidad el depósito ha sido mayor en la interfase inferior.

La densidad que mejores resultados nos ha proporcionado ha sido la de 1.077, la cual se acompaña de un depósito prácticamente exclusivo de islotes en la interfase 1.077/1.056, produciéndose de esta forma una adecuada separación.

De este modo hemos optado por la formación de soluciones de 1.085, 1.077 y 1.056 g/ml por ser las que permiten obtener un mayor número de islotes y con un mayor grado de pureza, siendo posible la realización de trasplantes efectivos de rata a rata en proporción 1:1.

Otro importante factor que puede provocar resultados no uniformes en el aislamiento de islotes es la variabilidad en la densidad del tejido exocrino. Así mientras que las células endocrinas guardan una densidad bastante estable, las exocrinas pueden ver modificada su densidad, principalmente en función del estado secretorio de las células acinares debido a su rico aparato de síntesis y almacenaje de proteínas, de modo que cuando se hallan degranuladas en el período postingesta su densidad es menor que en estado postabsortivo (London y col. 1992).

Cuando los islotes van a ser utilizados para análisis de viabilidad u otros estudios fisiológicos es preciso obtener un

material sin ningún contaminante. Por ello es necesario pipetear uno a uno los islotes o bien recolectarlos mediante dispositivos de asas metálicas de forma individualizada. Si bien esto es relativamente sencillo para un número pequeño de islotes, se convertirá en un proceso largo y tedioso cuando lo que se pretende recoger son un número suficiente de islotes con vistas a la realización de un trasplante. Por tanto, cuando se trata de éste último, hemos preferido obtener un mayor número de islotes aún a costa de una pérdida relativa de pureza, siempre persiguiendo la mínima cantidad de contaminantes no endocrinos. La utilización de colorantes del tipo de la ditizona facilita en gran medida una valoración rápida del grado de digestión y del contaje y una estimación de la pureza de los islotes. La ditizona se fija al zinc de la molécula de insulina, tiñendo los gránulos de secreción de las células beta y dando a éstas una coloración rojiza, permitiendo de esta forma la identificación inmediata de los islotes y una apreciación del grado de liberación de los islotes del tejido exocrino (Latif y col. 1988).

ASPECTOS METABOLICOS

Durante el acto quirúrgico del trasplante intraportal de islotes hay una serie de factores que conviene considerar. En primer lugar, la rata diabética presenta una sensibilidad incrementada a los anestésicos por lo que es preciso evitar una sobreexposición al éter en la inducción anestésica que puede provocar una parada cardiorrespiratoria del animal. Por otra parte el incremento de la lipólisis secundaria a la insulinopenia del estado diabético conlleva la práctica desaparición del tejido graso subcutáneo y visceral y un mayor riesgo de perforación intestinal al incidir con el bisturí la piel y el peritoneo parietal. Esto es mucho más apreciable en las ratas con largo tiempo de diabetes sin una suplencia insulínica exógena. Asimismo las ratas diabéticas con deterioro orgánico marcado presentan alteraciones de hemostasia importantes que motivan serios problemas de sangrado al retirar la cánula de inyección de los islotes, y que si no se atajan convenientemente pueden suponer el fallecimiento del animal por shock hipovolémico.

Estas observaciones nos han movido a rechazar como receptores a aquellas ratas diabéticas con un deterioro físico evidente y a intentar evitar o minimizar los problemas metabólicos que puedan ocasionarse manteniendo bajo tratamiento insulínico a las ratas diabéticas. Si bien en estas condiciones las ratas se pueden conservar con un aceptable estado durante períodos prolongados, hemos utilizado preferentemente ratas cuya diabetes haya sido inducida dos o tres semanas antes.

Para tener siempre en reserva varias ratas diabéticas con vistas a trasplantes las hemos administrado tres dosis semanales de 13 unidades/kg de insulina de acción intermedia por vía subcutánea. Teniendo en cuenta que el peso de las ratas oscila entre los 250-300 gramos, cada dosis de insulina equivale a 3-4 unidades. Con esta insulinización, tolerada perfectamente por las ratas diabéticas, se conserva una adecuada integridad orgánica y metabólica del animal aunque no llegue a normalizar la glucemia. Los efectos de esa dosis de insulina no duran lo suficiente como para mostrar cambios equívocos de la glucemia cuando es analizada al día siguiente. Por ello cuando la rata presenta normoglucemia a las 24 horas del trasplante debería considerarse que es debido a la insulina liberada por el injerto insular y no por insulina exógena ya que en este último caso se podría objetivar una discreta disminución de la glucemia respecto a los valores previos pero difícilmente una normalización de la misma.

En nuestros primeros trasplantes se continuaba la administración de insulina a la misma dosis durante los primeros días tras la implantación. Esta práctica, sin embargo, ocasionaba en un porcentaje importante de ratas trasplantadas hipoglucemias severas que producían el fallecimiento del animal en gran parte de los casos. Esta observación nos movió a comparar y analizar la influencia del efecto hipoglucemiante de una dosis menor de insulina (5 mg/kg) administrada por vía subcutánea a ratas sanas, diabéticas y a las 36 horas, 7 días y al mes del trasplante.

(ver gráfica correspondiente). Los resultados, analizados como variación porcentual de la glucemia dentro de las primeras 10 horas tras la inyección de insulina, muestran en las ratas

diabéticas un descenso poco apreciable de la glucemia con una pronta recuperación hacia los niveles previos. En las ratas sanas presentan una caída máxima del 45% que a las 6 horas ya ha sido remontada. En lo referente a las ratas trasplantadas, en el grupo de las 36 horas el descenso glucémico es al 42%, 39%, 46%, 57% y 77% de la basal en muestras sucesivas. A la primera semana del trasplante las medias son del 30%, 22%, 35%, 47% y 53% mientras que al mes son del 37%, 36%, 111%, 98% y 106%

Estos resultados reflejan diferencias en el comportamiento glucémico de las ratas en diversos momentos tras el trasplante, mostrando en una fase inicial, representado por las determinaciones efectuadas a las 36 horas y 7 días un descenso mayor y más prolongado (a las 6 horas $p < 0.01$), especialmente en el último grupo (a las 4 horas y 10 horas $p < 0.001$ y $p < 0.01$ respectivamente), en comparación con las ratas sanas y tras 1 mes del trasplante, mostrando ya estas últimas una recuperación más rápida, similar a la de las ratas sanas.

Existe, por tanto, una hiperrespuesta a la insulina exógena en fases iniciales del trasplante de islotes que se normaliza posteriormente lo que sugiere una disrregulación de la secreción y/o liberación de insulina por los islotes implantados frente al efecto inhibitorio que supone la hipoglucemia inducida por la administración de insulina. Esto podría explicarse por defectos funcionales derivados del proceso de aislamiento, por la ausencia de mecanismos de regulación paracrinos o por la falta de una inervación inherentes a la propia condición de un injerto ectópico. En este sentido cabe reseñar que la reinervación de los islotes es un proceso que se desarrolla lentamente a partir del

órgano de implantación y que tarda varias semanas en llegar a completarse (Korsgren y col. 1993). Lo mismo ocurre con la revascularización del injerto, que comienza a mostrar signos de angiogénesis en la primera semana de la implantación (Menger y col. 1989, Méndola y col. 1994) pero que tarda alrededor de un mes en completarse, existiendo factores que afectan negativamente a este proceso, tales como la hiperglucemia (Jansson y col. 1989) o la propia CsA (Rooth y col. 1989).

De modo que la ausencia de una adecuada trama vasculonerviosa de un tejido alogénico obtenido tras una compleja metodología e implantado por otra parte de modo heterotópico puede ser la responsable de la falta de integridad funcional de los islotes y de unos adecuados mecanismos homeostáticos.

INMUNOSUPRESION

En el alotransplante de islotes pancreáticos se han empleado diversas estrategias en orden a evitar el rechazo del injerto. La inmunosupresión del receptor, el inmunoaislamiento de los islotes mediante membranas semipermeables, la inmunomodulación de los islotes previamente al trasplante (cultivo, radiación gamma, criopreservación, anticuerpos monoclonales) (Faustman y col. 1981, Lacy y col. 1979, Faustman y col. 1984, Lau y col. 1984) e incluso la inmunomodulación del receptor con objeto de provocar un estado de tolerancia inmunológica frente al injerto (inyección intratímica de islotes (Posselt y col. 1991) o de antígenos solubles de membrana de esplenocitos (Qian y col. 1993), infusiones de células de médula ósea (Barber y col. 1991). Aunque dichas estrategias han mostrado su eficacia en algunos modelos experimentales de diabetes en animales, sólo la inmunosupresión del receptor, bien de forma aislada o en combinación con otros tratamientos alternativos, ha conseguido resultados exitosos, aunque transitorios en la mayor parte de los casos, en el paciente diabético (Scharp y col. 1990), no pasando las otras vías de investigación de ser, hasta la fecha, sino interesantes y prometedoras terapéuticas futuras.

Varios autores han documentado la falta de eficacia del tratamiento con azatioprina- prednisona tanto en roedores como en mamíferos grandes (Bell y col. 1980, Kolb y col. 1979). En contraste, preparaciones de anticuerpos policlonales como el suero antilinfocítico o antitimocítico han demostrado una

prolongación permanente de la tolerancia al injerto en el alotransplante de rata (Beyer y col. 1979) y ratón (Frangipane y col. 1977) pero faltan estudios que documenten la eficacia aislada de los anticuerpos policlonales en mamíferos grandes.

La ciclosporina (CsA) es un derivado fúngico con una estructura undecapeptídica cíclica y un peso molecular de 1.203, que ejerce sus efectos esencialmente sobre las subpoblaciones linfocitarias relacionadas o inducidas por los linfocitos T helper o facilitadores. Las células B, macrófagos, granulocitos y células NK (natural killer) no muestran un funcionalismo alterado en presencia de CsA.

Desde la introducción de la CsA se ha acumulado una considerable experiencia en el campo del trasplante tanto experimental como clínico. El trasplante alogénico de islotes sin medidas adicionales de inmunosupresión o inmunomodulación comporta inevitablemente el rechazo del injerto (Gray y col. 1984). Dicho rechazo constituye un enérgico proceso que se hace aparente en los primeros días que siguen a la inyección de los islotes. En muchas de las ratas trasplantadas los islotes son tan rápidamente destruidos que no es posible detectar una normalización, aún breve, de la glucemia. No obstante, en ocasiones puede haber un descenso de la glucemia en el primer día del trasplante que es debido a la liberación de insulina por los islotes, estén dañados o no, y que puede perdurar uno o dos días. Por tanto al menos dos días consecutivos de normoglucesmia debe ser el criterio mínimo para considerar como exitoso antes de que se produzca el rechazo. El tiempo del rechazo depende de varios factores como son el

número de islotes trasplantados, el lugar del trasplante y la barrera de histocompatibilidad entre el donante y el receptor. Cuando un trasplante, bajo condiciones de inmunosupresión o inmunomodulación, es efectivo, la normalización de la glucemia es manifiesta pronto tras la inyección de los islotes.

En la rata el alotransplante de islotes pancreáticos se ha mostrado más sensible al proceso de rechazo que en trasplantes de otros órganos como puedan ser el cardíaco o el renal (Klempnauer y col. 1982, Klempnauer y col. 1983).

La administración de CsA, que proporciona una prolongación importante de la supervivencia del injerto en el caso del trasplante de segmentos pancreáticos, parece ser menos efectiva en el de islotes, especialmente cuando se lleva a cabo frente a una barrera mayor de histocompatibilidad (Gray y col. 1984). Los primeros estudios experimentales que demostraron una supervivencia indefinida de un alotransplante inducida por un tratamiento recortado con CsA se observaron en trasplantes cardíacos en ratas a principios de la pasada década (White y col. 1980). Un permanente estado de tolerancia era establecido tras 7 a 14 días de inmunosupresión.

El mecanismo por el cual la CsA produce un estado de tolerancia indefinida tras la discontinuación del tratamiento parece explicarse por el desencadenamiento de una supresión del proceso inmunológico de rechazo motivado por la generación de células supresoras que serían activadas o "desocupadas" en presencia de CsA (Kupiec 1984). Otro mecanismo alternativo sería la primación inicial de células T portadoras de idiotipo injerto específico cuya función efectora fuera bloqueada por la CsA y que no

obstante sirviera como antígeno para la generación de células T supresoras anti-idiotipo (Lafferty y col. 1986).

En cualquier caso la tolerancia inducida por CsA es un proceso activo que requiere un injerto inmunogénico capaz de iniciar una cadena de acontecimientos que conduzca a la generación de células T supresoras (Haug y col. 1987).

La ciclosporina es la droga inmunosupresora que más desarrollo ha experimentado en la última década en el campo del trasplante de órganos de modo que actualmente continua estando presente en la mayoría de protocolos de inmunosupresión y todavía no ha sido desplazada por los nuevos y prometedores fármacos que están apareciendo. Por ello hemos utilizado la ciclosporina como agente inmunosupresor en nuestro trabajo, intentando desarrollar una pauta perioperatoria de inmunosupresión que optimizase la tolerancia al injerto y la reversión prolongada de la diabetes. En animales de experimentación la CsA ha sido utilizada en multitud de protocolos de trasplante mediante diferentes rutas de administración: oral, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular e intravenosa.

En este trabajo hemos analizado las diferencias de las concentraciones de CsA circulante en función de la vía de administración de la droga. Para ello hemos determinado la ciclosporinemia en ratas sanas tras una dosis determinada de la droga administrada por vía enteral o subcutánea, distinguiendo en el primer caso la administración en cavidad oral y la efectuada mediante la canulación esofágica para analizar las diferencias relativas a una ingestión incompleta de la solución de CsA.

Los resultados (ver tablas 5 a 7 y gráfica 19) muestran unos niveles iniciales superiores como media tras la administración subcutánea respecto a la vía oral y esofágica aunque con una variabilidad interindividual importante. A partir del 2º día comienza a ser manifiesta una diferenciación importante que se va acentuando en los días siguientes cuando la ciclosporinemia en los grupos tratados con ambas vías enterales comienza un rápido declinar, siendo en el 7º día ya los niveles claramente infraterapéuticos. Cuando hemos analizado la biodisponibilidad de CsA mediante un análisis comparativo del área bajo la curva de la ciclosporinemia (gráficas 20 a 23) existe una clara diferenciación favorable a la administración subcutánea.

La manifiesta eficacia inmunosupresora de la CsA en diferentes protocolos de trasplante tanto experimentales como clínicos no elude los problemas inherentes a la variabilidad intra e interindividual de su farmacocinética y al estrecho margen entre el efecto inmunosupresor y el tóxico (Nankivell y col. 1994).

Por ello siempre ha habido un especial interés en los factores que puedan estar relacionados con el metabolismo de la droga (Kahan 1985) y con la forma mas adecuada de determinar sus niveles sanguíneos (Rosenthaler y col. 1990). Ha sido estudiada por otros autores la influencia tanto de la ruta de administración como la dosis de CsA sobre el patrón farmacocinético de la droga (Wassef y col. 1985). La administración oral de CsA produce una absorción muy variable, presentando una biodisponibilidad relativa del 10-30% (Ueda y col. 1984). Dosis bajas (5-10 mg/kg/día) por vía oral proporcionan unos niveles séricos inadecuados para lograr una

inmunosupresión correcta. La administración oral de CsA disuelta en aceite de oliva mejora claramente la biodisponibilidad pero ocasiona un enlentecimiento del vaciamiento gástrico que provoca retrasos de la absorción (Ueda y col. 1984). Por otra parte, para asegurar una adecuada ingestión de la droga es preferible introducir la solución de CsA directamente en el esófago del animal mediante canulación o intubación, lo cual requiere un manejo adecuado para evitar lesionar al animal. Otra forma de administrar la droga por vía oral es mezclándola con los alimentos pero de este modo es difícil asegurar una correcta y total ingestión de la CsA.

Las rutas parenterales parecen proporcionar una biodisponibilidad mucho mayor y más estable. Las vías intramuscular e intraperitoneal consiguen una rápida absorción, con unos picos muy elevados en las primeras horas tras la inyección. La vía subcutánea proporciona menores niveles en las primeras horas que las rutas anteriores y unos niveles más estables y mantenidos en días sucesivos, por lo que esta vía parece más adecuada que otras. Aparte de eludir, al igual que otras rutas parenterales, un primer paso hepático con su consiguiente metabolización, la administración subcutánea mediante solución oleosa proporciona una absorción más gradual ejerciendo un efecto depot (Dibelius y col. 1986). Además la técnica de administración es sencilla y no requiere medidas especiales de sujeción del animal que podrían resultar traumáticas.

Se desprende a juzgar por los resultados obtenidos que la administración subcutánea de CsA proporciona un perfil farmacocinético más apropiado que el determinado mediante la vía

enteral que se traduce en una mayor biodisponibilidad de la droga durante las primeras dos semanas tras su administración, lo que sin duda parece más idóneo con vistas a una inmunosupresión eficaz.

Con objeto de comprobar qué pauta de inmunosupresión es la más adecuada realizamos una serie de trasplantes en grupos de ratas bajo idéntica metodología de aislamiento en los que se realizaron diferentes protocolos de CsA en función de la vía de administración y la temporalidad de ésta última.

Los dos primeros grupos (grupos A y B) correspondían a ratas en las que no se llevó a cabo ninguna inmunosupresión. Las ratas del grupo A recibieron una escasa cantidad de islotes (media 475 +/- 64, rango 400-550), significativamente inferior al resto de los otros grupos ($p < 0.01$ en todos los casos). Las del grupo B recibieron un número elevado de islotes (media 1397 +/- 536, rango 880-2600) provenientes de dos donantes en su mayoría, siendo el grupo que recibió más islotes de todos los efectuados excepto el grupo I, aunque sin guardar una significación estadística con los otros grupos (salvo el ya comentado grupo A y el grupo I ($p < 0.05$)).

Mientras que en el grupo A no se observó ninguna variación glucémica respecto a los niveles pre-trasplante, en el grupo B hubo una normalización transitoria de la glucemia superior a un día en 4 de las 9 ratas correspondiendo la duración más prolongada a 8 días. Esta breve corrección glucémica tras el alotrasplante sin ninguna inmunomodulación es descrita por otros autores (Dibelius y col. 1986), y corrobora la adecuada secreción

insulínica de un injerto constituido por islotes funcionalmente intactos sobre los que todavía no se ha producido un daño originado por el proceso de rechazo inmunológico que se halla en marcha. No obstante en las cinco ratas restantes del grupo B no hubo variación glucémica tras el trasplante o ésta fue únicamente de un día lo cual, como ya se comentó previamente, no constituye una prueba concluyente de un trasplante efectivo al poder producirse una normalización glucémica en las primeras 24 horas debido a la liberación de los gránulos de secreción de insulina de unos islotes que pueden presentar no obstante problemas para obtener una adecuada implantación o bien estar funcionalmente alterados. Curiosamente los trasplantes efectuados que contenían mayor número de islotes (rata 8 y rata 9, con 2.600 y 1.700 islotes respectivamente) no superaron el primer día de euglucemia, situación que hemos comprobado en otros grupos ulteriores lo cual parece sugerir que el número de islotes no es un factor primordial, o al menos no el más importante, en el resultado de los trasplantes que hemos realizado, siempre conservando un mínimo de islotes implantados que parece situarse en los 900 islotes ya que por debajo de esta cifra nunca hemos obtenido reversiones significativas.

Los grupos C y D estaban constituidos por ratas a las que se efectuó un TI bajo inmunosupresión con CsA por vía oral de forma perioperatoria. En el grupo C se aplicó la droga mediante intubación esofágica los días 0, +1 y +2 y en el grupo D los días -2, -1 y 0. Cada dosis, al igual que en el resto de los grupos, fue de 30 mg/kg. Si bien en algunos de los trasplantes el número

de islotes utilizados fue algo escaso (ratas 1 y 2 del grupo C y ratas 5 y 6 del grupo D) en el resto se implantaron un número de islotes bastante satisfactorio con una media de 1.121 ± 330 (725-1650), en el grupo C y de 1.150 ± 484 (700-2000) en el grupo D. Pese a ello, invariablemente el resultado de los TI fue claramente negativo, no superando ninguna de las ratas el primer día de euglucemia. Estos malos resultados podrían explicarse en base a la cinética de la CsA cuando se aplica por vía enteral, como más adelante se detallará. No obstante la homogeneidad de los resultados contrasta con la de los otros grupos efectuados, en los que siempre coexisten resultados positivos con negativos. Quizás la rápida metabolización hepática de la droga impida una adecuada acción inmunosupresora haciéndose más ostensibles los efectos deletéreos que la propia ciclosporina ejerce sobre el funcionalismo del islote. Es bien conocido que la CsA afecta negativamente la secreción insulínica por parte de la célula beta y puede alterar la tolerancia a la glucosa (Hahn y col. 1986). El mecanismo por el que esto se lleva a cabo está poco aclarado. Aun no queda claramente establecido si CsA actúa sobre la síntesis de insulina por la célula beta, sobre la conversión de proinsulina a insulina o sobre el mismo proceso de secreción. Se ha demostrado incluso que tratamientos con CsA tan solo de 24 horas empeoran la secreción de insulina en respuesta a la glucosa, y que este efecto es dosis-dependiente (Ishizuka y col. 1993). Es posible por tanto que la ciclosporinemia alcanzada en el primer día tras la implantación ocasione más problemas que beneficios. Además de los efectos de CsA sobre el funcionalismo de la célula beta, se ha demostrado un efecto negativo de la

droga sobre la vascularización del islote trasplantado, al menos en el espacio subcapsular renal (Rooth y col. 1989). Esto podría suponer un freno a la implantación del injerto, sumándose a los problemas del asentamiento en un tejido heterotópico de un huésped extraño una alteración del funcionalismo del islote tanto por los niveles tan elevados de CsA como por el conocido efecto tóxico de la hiperglucemia sobre la célula beta. El hecho de que la glucemia de las ratas no muestre cambios apreciables en los primeros días tras el trasplante apoya este postulado, ya que si el problema fuera un fallo en la prevención del rechazo del injerto se observaría una disminución, siquiera parcial, de la glucemia en los primeros días del trasplante, antes de que sobreviniera el rechazo. Sin embargo las ratas han permanecido hiperglucémicas en todo momento, salvo en algún caso en que se ha observado una normalización glucémica en el primer día tras la implantación. Este hecho ya se comentó que no tenía validez porque es debido a la liberación de los gránulos de secreción de insulina almacenados por parte de los islotes trasplantados, independientemente de su viabilidad.

Los grupos E a I comparten la administración parenteral de CsA, concretamente subcutánea, variando la pauta temporal en cada grupo con el propósito de optimizar los resultados del TI.

Existen trabajos experimentales previos que han demostrado, en concordancia con otros estudios efectuados in vitro, que el comienzo de la administración de la CsA en relación con la exposición al antígeno ha demostrado ser de vital importancia en el trasplante de islotes. El máximo beneficio parece observarse

generalmente haciendo coincidir el comienzo de administración de la droga y la exposición antigénica (Rietz y col. 1981, Homan y col. 1981).

Los grupos E y F comparten la misma pauta de CsA (0,1,2) diferenciándose únicamente en la forma de presentación comercial de la CsA (grupo E: polvo, grupo F: solución oleosa- cremophor). Ambas presentaciones fueron vehiculizadas en aceite de oliva para su administración subcutánea para uniformizar su absorción. En el resto de los grupos se utilizó igualmente solución de CsA disuelta en aceite de oliva.

Los grupos G y H (-1,0,+7 y -1,+9 respectivamente) fueron formados en base a la constatación previa de que una sola dosis de CsA subcutánea era capaz de mantener niveles plasmáticos en rango terapéutico durante los primeros 10 días tras la inyección, de modo que la administración de una última dosis de CsA diferida del trasplante 7 o 9 días alargaría el período de inmunosupresión y, por tanto, hipotéticamente, podría mejorar la tolerancia del injerto y el resultado del trasplante. La primera dosis se administró en ambos grupos en el día previo al trasplante (día -1) para hacer coincidir el momento de la implantación con unos niveles plasmáticos elevados del inmunosupresor.

Los resultados de estos grupos, sin embargo, no se muestran superiores a la pauta de CsA 0,+1,+2. Mientras que en este grupo 3 de 8 ratas (37.5%) muestran una reversión de la diabetes por encima de los 90 días, en el grupo -1,0,+7 sólo 2 de 8 (25%), y en el grupo -1,+9 igualmente 2 de 8 (25%), superan los 90 días de euglucemia.

Los resultados de las distintas pautas de inmunosupresión parecen

otorgar a los primeros días del trasplante un papel primordial en la tolerancia al injerto, siendo irrelevante el hecho de que ya existan altos niveles de ciclosporinemia en el momento de la implantación, es decir, del contacto inicial del antígeno con el huésped. Esto sugiere que cuando realmente se necesita un nivel de inmunosupresión adecuado es en los primeros días de la implantación, es decir, cuando se pone en marcha el reconocimiento del sistema inmune del receptor y se comienza a generar la activación de las células T responsables del rechazo del injerto.

Esto estaría en concordancia con estudios in vitro en los que se demuestra que el momento más oportuno para iniciar la inmunosupresión con CSA es haciéndola coincidir con el contacto antigénico. Un tratamiento con CSA iniciado con una anterioridad de varios días al trasplante no tiene efectos beneficiosos suplementarios mientras que un retraso de varios días ocasiona el rechazo del injerto (Cohen y col. 1984).

La ausencia de una mayor eficacia de los grupos CSA -1,0,+7 y -1,+9 respecto al de CSA 0,+1,+2 viene a corroborar que el mantenimiento de una inmunosupresión más prolongada no aporta ventajas respecto a una inmunosupresión adecuada durante los primeros días. Es más, al reducirse los niveles de ciclosporinemia en los días inmediatos a la implantación podría afectar negativamente a la prevención del rechazo inmunológico. El grupo I se halla constituido por una pauta de CSA idéntica a la de los grupos E y F, esto es, los días 0,1 y 2, pero en el cual se han utilizado un mayor número de islotes (1600 ± 185 , $p < 0.005$), para lo cual se han utilizado tres pancreas de donantes

para cada dos receptores, es decir, se ha mantenido una relación donante- receptor de 1.5:1. A pesar del incremento de la masa insular trasplantada los resultados no han mejorado aquellos obtenidos con los grupos anteriores. Si bien inicialmente cinco de los ocho TI efectuado mostraron una reversión de la diabetes más allá de la primera semana sólo dos de ellos han presentado una reversión prolongada. Esto pone de manifiesto de forma clara que, si bien un incremento de la masa insular puede mejorar la respuesta secretoria del injerto en los primeros días tras el trasplante, no ayuda a mejorar la tolerancia del receptor por sí misma, manteniendo invariable la forma de inmunosupresión. Parece necesario por tanto introducir otros mecanismos de inmunomodulación bien del donante como del receptor para optimizar el resultado del alotrasplante.

Los últimos grupos (J y K) comparten también la misma pauta de inmunosupresión que los grupos E, F e I (CsA 0,1,2) pero en ellos se han llevado a cabo unos test de hipoglucemia con insulina exógena (5 u/kg) a las 36 horas, a los 7 días y al mes del TI. Estos test, como se ha discutido previamente, se han realizado con el fin de analizar la respuesta a la hipoglucemia de la rata sometida a un TI. Curiosamente estas ratas han sido las que han presentado un mayor índice de reversiones prolongadas. En ambos grupos se ha obtenido un 50% de ratas con euglucemia mantenida por encima de los 90 días. Si bien la comparación con los resultados obtenidos con los otros grupos no muestra una significación estadística, es obligado pensar en el papel que pueda jugar en ello la administración exógena de insulina.

El concepto de agotamiento de las células beta provocado por la

propia hiperglucemia viene avalado por diferentes observaciones y estudios experimentales y clínicos. Desde la recuperación de la propia secreción insulínica de las células beta en la fase de luna de miel de los pacientes diabéticos tipo I que debutan y son tratados con insulina exógena (Park y col. 1974, Turner y col. 1976) a la constatación de las situaciones de los pacientes con diabetes no dependiente de insulina que requieren insulino-terapia circunstancialmente hasta conseguir una normalización metabólica (Turner y col. 1978).

En el trasplante de islotes concurren varios factores que pueden contribuir a dicho agotamiento insular, como la descarga de hormonas contrarregulatorias, la administración de inmunosupresores (esteroides, ciclosporina, FK 506) y la alteración metabólica propia del estado diabético. En este sentido se ha demostrado en estudios experimentales que el estado hiperglucémico del receptor puede causar una disfunción de las células beta implantadas (Leahy y col. 1988). Al mismo tiempo un ambiente hiperglucémico persistente afecta a la revascularización del implante insular (Jansson y col. 1990).

Otros estudios demuestran reducciones importantes en la reserva insulínica de islotes que son crónicamente expuestos a un ambiente hiperglucémico (Gray y col. 1989). Este empeoramiento de la capacidad de producción de insulina del injerto no puede revertirse tras un tratamiento con insulina (Korsgren y col. 1989).

En este sentido se ha sugerido que la normalización del control metabólico previo al trasplante mediante insulina exógena podría favorecer la supervivencia y el funcionalismo del implante de

células beta en un receptor diabético.

Esto sería especialmente interesante en los casos en que la masa insular constitutiva del trasplante no fuera lo bastante importante como para normalizar de forma eficaz el metabolismo de la glucosa, es decir, en aquellas situaciones en los que una pérdida de islotes o de su capacidad secretoria podría suponer una falta de eficacia del injerto.

Por contra, un mayor control metabólico durante el período posttrasplante no se refleja en un incremento de la función del injerto, como ha sido comprobado al analizar el contenido hepático de insulina y los parámetros metabólicos en receptores de un TI una vez retirado el tratamiento con insulina (Daffoe y col. 1989, Keymeulen y col. 1993). En este sentido pensamos que el discreto mejor resultado de los TI que hemos obtenido en los grupos J y K es difícilmente atribuible a la administración de insulina que realizamos a las 36 horas y a los siete días del implante insular dado que la normalización de la glucemia derivada de ello queda reducida a unas horas en días aislados y separados entre sí, si comparamos esto con la ausencia de la mejora de la concentración hepática de insulina que se observa tras una administración diaria de insulina durante 10 semanas tras el TI referida por Keymeulen y col.

Es interesante analizar las diferencias en el comportamiento glucémico que hemos observado tras el TI. Mientras que en algunas ratas se observa una normalización franca de la glucemia de forma rápida tras la implantación de los islotes que se mantiene de forma prolongada y en otras ratas no hay una variación apreciable

de la glucemia respecto a los valores pre-trasplante, hemos observado que otros animales muestran en cambio una cierta caída de las cifras de glucemia en los primeros días tras la implantación que no llega a revertir completamente la hiperglucemia, en una situación que podría denominarse como de inestabilidad metabólica, la cual puede preceder a una ulterior normalización glucémica que se mantiene de forma prolongada o bien a la vuelta a los valores de glucemia pre-trasplante. Esta "ambigüedad glucémica" es una situación que queda enmarcada siempre en los primeros 10-11 días del TI en los cuales la rata muestra una hiperglucemia moderada que no sobrepasa generalmente los 300 mg/dl, a diferencia de los casos donde fracasa definitivamente el TI y que no muestran una variación apreciable con las previas a la implantación. Por tanto este período inicial tras el TI parece tener una importancia crucial en el devenir del injerto. Cuando se supera esta fase con un resultado favorable el comportamiento glucémico es mucho más estable, manteniéndose una normalización de la glucemia que persiste, bien de forma prolongada o transitoria, observándose en este último caso un ascenso abrupto de la glucemia que no plantea dudas sobre el rechazo inmunológico del injerto.

Estos casos de reversión parcial en fases iniciales del trasplante parecen corresponden a una situación en la que los islotes implantados, si bien exhiben una cierta capacidad secretoria de insulina, ésta no basta para revertir el estado diabético. Esto podría estar relacionado con una situación parcial de rechazo inmunológico que puede resolverse de una forma u otra. En este sentido es sabido que existe una considerable

variabilidad en la biodisponibilidad de la CsA por cualquiera de las rutas de administración utilizadas (Nooter y col. 1984, Ueda y col. 1984, Wassef y col. 1985). En el caso de la vía subcutánea este último grupo encontró una biodisponibilidad relativa de un 43-77% en relación con la misma dosis (10 mg/kg) administrada por vía endovenosa, con un índice de variabilidad del 31% en el seguimiento durante 24 horas de la concentración plasmática de CsA. En nuestro trabajo es igualmente notoria la dispersión de las ciclosporinemias obtenidas en distintas ratas a pesar de una dosificación uniforme y ajustada al peso de cada rata, lo cual podría causar un grado de inmunosupresión variable y, en consecuencia, que en unas ocasiones se evite y en otras no el rechazo del injerto.

En relación con el papel que pueda jugar el grado de inmunosupresión de la rata en la presencia de esta inestabilidad metabólica hemos analizado el impacto que ejerce una dosis suplementaria de CsA sobre la glucemia de la rata en situaciones de reversión parcial de la diabetes en fases iniciales del trasplante.

A una serie de ratas, no integrantes de ninguno de los grupos anteriores, a las que se realizó TI con pauta de inmunosupresión s.c. los días 0,+1,+2 y que no mostraban una normalización glucémica tras la implantación se les administró una inyección subcutánea de CsA (30 mg/kg) el día 7º u 8º del trasplante. El efecto de la dosis extra de CsA fue diferente en función de las glucemias que la rata presentaba en la primera semana tras el trasplante. De las 4 ratas que tenían una glucemia media mayor

de 400 mg/dl ninguna mostró cambios de la glucemia tras la dosis extra de CsA. En cambio, otras 4 ratas, cuya glucemia media en la primera semana del trasplante era inferior a 300 mg/dl, mostraron una normalización de la glucemia tras la CsA extra durante un período de tiempo variable ya que en 3 de 4 la reversión de la diabetes fue inferior a 20 días (11, 13 y 20 respectivamente) y en una rata se obtuvo una reversión prolongada (>90 días).

Creemos que este comportamiento glucémico es explicable únicamente por la presencia de una situación de rechazo parcial del injerto que puede llegar a ser reversible si se toman medidas para incrementar la tolerancia inmunológica del huésped antes de que la masa insular presente un daño irreparable. Si la reversión glucémica parcial en fases iniciales estuviera motivada por un número de islotes insuficiente trasplantado o por un daño funcional de las células beta derivado del proceso de aislamiento no tendría por qué responder a un incremento de la ciclosporinemia. Incluso podría decirse que dicho incremento de los niveles de la droga tendría un efecto negativo sobre la secreción insulínica de los islotes implantados. Por ello consideramos que la mejoría de la función insular guarda una estrecha relación con la supresión de un mecanismo de rechazo inmunológico que se halla todavía en fases iniciales y, por tanto, reversibles en cierta medida en función de la masa insular que permanezca sin destruir. Dependiendo de esto último la supervivencia del injerto será transitoria o prolongada.

Considerando el total de TI realizados con CsA parenteral,

incluidos conjuntamente las diferentes pautas de administración, y dejando aparte los efectuados con CsA oral, en los que no se observaron resultados positivos, hemos obtenido una reversión prolongada en 19 de los 54 trasplantes efectuados, lo que corresponde a un 35% de los mismos.

Esto supone que la vía subcutánea de administración de CsA, a diferencia de la vía oral, es capaz de proporcionar una tolerancia al injerto aunque a juzgar por la heterogeneidad de los resultados es evidente que existen otros factores que pueden influir en el proceso de rechazo.

Centrándonos en el proceso de aislamiento hay que tener en cuenta el número de islotes obtenido, la pureza de la preparación y el grado de viabilidad y funcionalismo de los islotes. Hemos visto con anterioridad que la masa insular trasplantada, que sin duda juega un papel determinante cuando resulta insuficiente (Kemp y col. 1973), como ocurre en nuestro grupo control A, no guarda una correlación con el resultado del TI cuando el número de islotes utilizados supera determinados márgenes, en nuestro caso los 900 islotes. De hecho otros grupos han conseguido excelentes resultados con el implante de alrededor de 1000 islotes (Dibelius y col. 1986) aunque fueron recogidos mediante "pesca" individual y, por tanto, más puros.

Es también asumido que la presencia de impurezas acinares y linfáticas que pueden ser trasplantadas junto a los islotes pueden influir en el proceso de rechazo (Lafferty y col. 1984, Lacy 1984), siendo éste el motivo del desarrollo de diferentes métodos destinados a eliminar la presencia de contaminantes no

endocrinos del injerto como se ha comentado con anterioridad. El hecho de que en nuestros trasplantes no hayamos efectuado otra purificación que la derivada de la separación mediante gradientes de densidad ha hecho de que las preparaciones de islotes hayan ido acompañadas de un número variable de impurezas. Esto se podría haber evitado recogiendo los islotes individualmente mediante asa metálica o pipeta pero habría hecho prácticamente inviable la realización de trasplantes en fresco al necesitarse un tiempo considerable para conseguir un número de islotes razonable. Sin dudar de la importancia de la pureza de la preparación (Hegre y col. 1984), sí hemos observado cómo en ocasiones han ocurrido reversiones prolongadas de la diabetes en ratas a las que se han implantado preparaciones con una pureza bastante inferior a la deseada, incluso del 40%. Dejando a un lado los casos individuales, cuando hemos analizado el total de los TI realizados tampoco hemos encontrado una relación directa entre la pureza de los islotes y la eficacia del trasplante. En este sentido es interesante reseñar los resultados obtenidos en humanos con preparaciones poco purificadas de islotes en los que se ha observado independencia de insulina utilizando nuevos inmunosupresores como la deoxispergualina (Gores y col. 1992). Estos resultados sugieren que el desarrollo de inmunosupresores más efectivos podría hacer innecesaria la consecución de preparaciones altamente purificadas, las cuales siempre conllevan una pérdida significativa de islotes en el proceso de aislamiento por lo que se requieren habitualmente varios pancreas para lograr una masa insular suficiente para un trasplante.

Es elemental que el funcionalismo inalterado de los islotes es primordial en el proceso, de forma que unos islotes incapaces de presentar una secreción adecuada de insulina convierten en irrelevante a cualquier otro factor. A pesar de que no hemos analizado individualmente la secreción insulínica de los islotes previamente a cada TI, la utilización de idéntica metodología en todos los procesos de aislamiento hace suponer que la funcionalidad de los islotes no debe variar de forma considerable de un caso a otro.

Considerando que estos factores mencionados no han ejercido una influencia determinante en los resultados debemos buscar otra explicación que justifique la heterogeneidad de los mismos.

Hablando de trasplante alogénico la actuación sobre el proceso inmunológico de rechazo ejerce una importancia obvia. En nuestros TI la única modificación inmunológica ha sido la pauta perioperatoria de CSA de modo que pensamos que las diferencias existentes en los resultados del trasplante deben analizarse en función de la eficacia de la inmunosupresión.

La similitud de los resultados obtenidos en los diferentes grupos de ratas tratadas con distintas pautas de CSA subcutánea dificulta una interpretación sobre la pauta más adecuada de inmunosupresión si bien los resultados de la administración consecutiva los días 0,+1,+2 no se han visto superados por otras alternativas. Agrupando todos los grupos que comparten dicha pauta hemos logrado una reversión mayor de 90 días en 15 de 38 ratas (39.4%).

De los trabajos realizados hay dos observaciones que señalan la importancia que puede jugar la ciclosporinemia en la tolerancia al injerto. En primer lugar la diferencia de los resultados obtenidos con la forma enteral y parenteral de administración de la CsA, que consideramos debido a la mayor biodisponibilidad de la droga mediante la vía subcutánea. En segundo lugar la constatación de una respuesta positiva al incremento de los niveles plasmáticos de CsA por la administración de una dosis extra del inmunosupresor en los casos en que existe una respuesta parcial de la glucemia y, por tanto presumiblemente quedan islotes viables en fase incipiente de rechazo. En este sentido existen trabajos en los que se atribuye a la CsA un efecto dependiente de dosis o, mas propiamente dicho, de nivel plasmático sobre la función y supervivencia del injerto (Kneteman y col. 1987, Cattral y col. 1989). Por contra el grado de ciclosporinemia también guarda una clara relación con los efectos tóxicos de la droga, principalmente renales, y con una alta mortalidad por infecciones a causa de la inmunosupresión provocada (Rynasiewicz y col. 1980), sin mencionar los ya comentados efectos sobre la funcionalidad de la célula beta. Por tanto parece que la optimización de la tolerancia al injerto debería buscarse, no por un incremento de la dosis de CsA sino por la asociación de otras medidas encaminadas a la potenciación de la inmunosupresión del receptor tales como la combinación a dosis bajas de varias drogas (Yakimets y col. 1993) o, preferiblemente a la disminución de la inmunogenicidad del injerto mediante una actuación inmunomoduladora más específica de forma previa al trasplante.

RESUMEN

RESUMEN

En este trabajo se recoge el resultado de una serie de experiencias encaminadas a conseguir una optimización del resultado del aislamiento de islotes pancreáticos de rata y la eficacia del alotrasplante en fresco, introduciendo como único factor de manipulación inmunológica la administración perioperatoria de ciclosporina.

El aislamiento de islotes se ha llevado a cabo mediante la digestión enzimática del páncreas con colagenasa inyectada a través del ductus pancreático y la purificación ulterior con gradientes discontinuos de densidad con BSA, variándose los tiempos de incubación enzimática y las diferentes densidades de BSA con el fin de mejorar el resultado del aislamiento y poder realizar alotrasplantes utilizando los islotes de una sola rata, es decir, manteniendo una relación donante-receptor 1:1.

Los trasplantes se han realizado mediante la implantación hepática de los islotes con la técnica de inyección intraportal a ratas con diabetes inducida experimentalmente con STZ.

Se han llevado a cabo un total de 103 alotrasplantes distribuidos en una serie de grupos en función esencialmente de la pauta de CsA perioperatoria empleada, y de otros factores como la masa insular trasplantada y la administración de insulina exógena.

Para valorar el grado de inmunosupresión con las diferentes pautas de CsA se ha analizado la concentración en sangre total de la droga a varios grupos de ratas sanas tras la administración de tres dosis de CsA en días consecutivos por vía oral, esofágica y subcutánea.

Los resultados muestran que el alotrasplante de islotes en rata llevado a cabo sin inmunosupresión sólo es capaz de conseguir, en el mejor de los casos, una normalización de la glucemia durante los primeros días tras el trasplante mientras se completa el rechazo inmunológico.

Otros factores analizados, como son la masa insular y la pureza de la preparación, no parecen guardar una relación directa con el resultado del trasplante, siempre teniendo en cuenta el margen de estos parámetros comprendidos en el presente trabajo. La administración perioperatoria de CsA como única estrategia inmunológica posibilita la tolerancia hacia los islotes y la reversión prolongada de la diabetes. No obstante la forma de administración de la droga influye de forma determinante en el resultado. Así, en los grupos en que se emplea CsA por vía oral no se consigue mejorar los resultados obtenidos sin inmunosupresión mientras que los grupos en los que se utiliza la vía subcutánea se logra, en conjunto, una normalización prolongada de la glucemia en un 35% de los casos.

Dentro de los grupos con CsA subcutánea, los resultados obtenidos con la administración de la droga los días 0,+1,+2 no han sido superados por las pautas conllevan una anticipación o prolongación de la administración de CsA lo que sugiere que el grado de inmunosupresión logrado durante los primeros 7-10 días tras el trasplante juega un papel determinante en el desarrollo y mantenimiento de la tolerancia del receptor hacia los islotes. Agrupando todas las ratas en las que se utilizó CsA sc los días 0,1,2 se observaron remisiones prolongadas de la diabetes en 15 de los 38 trasplantes efectuados (39.4%).

Analizando la biodisponibilidad de la CsA tras su administración enteral o subcutánea se observan diferencias apreciables a favor de ésta última, si bien existe una variabilidad interindividual importante, lo que podría explicar las diferencias obtenidas entre ambas formas de administración y la heterogeneidad de resultados en los grupos de ratas a las que se administra CsA por vía subcutánea.

La importancia del grado de inmunosupresión en fases iniciales del trasplante se ve reforzada por la constatación del efecto beneficioso que una dosis adicional de CsA puede ejercer sobre la evolución glucémica en situaciones de reversión parcial de la diabetes en los primeros días tras la implantación de los islotes.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1-Es posible un aislamiento de islotes pancreáticos relativamente libre de contaminantes no endocrinos tras digestión enzimática con colagenasa y purificación con gradientes de densidad discontinua con BSA.

2-Las densidades óptimas de BSA para el aislamiento de islotes de rata Wistar son 1059-1.077-1.085 g/ml.

3-Es posible obtener el suficiente número de islotes de un solo pancreas de rata para lograr alotrasplantes efectivos manteniendo una relación donante-receptor 1:1.

4-El alotrasplante de islotes en la rata Wistar puede mantenerse de forma prolongada con una inmunosupresión perioperatoria con CsA en un 39% de los casos.

5-La administración oral de CsA el día del trasplante y los dos previos o posteriores no consigue reversiones de la diabetes en el alotrasplante insular en la rata.

6-Por contra la administración subcutánea perioperatoria (días 0,1,2) de CsA posibilita una tolerancia indefinida al injerto insular y el mantenimiento de euglucemia prolongada en la rata trasplantada.

7-Un adelanto del inicio de la administración de CsA a días previos al del trasplante no mejora los resultados obtenidos con la pauta anterior.

8-Tampoco la prolongación de la inmunosupresión durante más días ofrece una mejoría de la tasa de reversiones prolongadas.

9-La vía de administración de CsA ofrece diferencias apreciables en su perfil farmacocinético, siendo la biodisponibilidad claramente superior en administración subcutánea que en enteral.

10-Existe una heterogeneidad de resultados bajo unas condiciones metodológicas aparentemente idénticas que parecen estar relacionadas con diferencias interindividuales en la biodisponibilidad de CsA.

11-Un número de islotes trasplantados inferior a 900 no es capaz de revertir el estado diabético de la rata.

12-Por encima de dicho mínimo de islotes, un incremento de la masa insular trasplantada no guarda una correlación significativa con la duración del trasplante.

13-La pureza de la preparación obtenida mediante gradientes de densidad de BSA no parece relacionarse de un modo decisivo con el resultado del alotrasplante.

14-La influencia de ambos parámetros, número y pureza queda supeditada a la existencia de un grado de inmunosupresión adecuado.

15-Una disminución parcial de la hiperglucemia en fases iniciales no implica un fracaso del trasplante. Existe en estos casos una inestabilidad metabólica que puede derivar en la tolerancia o el rechazo del injerto.

16-La potenciación de la inmunosupresión de los casos de reversión parcial inicial puede posibilitar la tolerancia del injerto.

17-Existe una hiperrespuesta a la insulina exógena en fases iniciales tras la implantación que se halla normalizada al mes del trasplante.

BIBLIOGRAFIA

-
- Alvarez S, Arranz A, Andía V et al. Valoración de la eficacia del alotransplante de islotes pancreáticos en rata en el hígado, midiendo la insulinemia en venas cava inferior y porta. *Endocrinología* 1994;41,supl 3:31.
- Anderson A, Buschard F. Culture of isolated pancreatic islets: Its application for transplantation purposes. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 1977;23:342-346.
- Anderson A, Borg H, Hallberg A et al. Long-term effects of cyclosporin a on cultured mouse pancreatic islets. *Diabetologia* 1984;27:66-69.
- Ashcroft SJH, Bassett JM, Randle PJ. Isolation of human pancreatic islets capable of releasing insulin and metabolizing glucose in vitro. *Lancet* 1971;888-889.
- Ballinger WF, Lacy PE. Transplantation of intact pancreatic islets in rats. *Surgery* 1972;72:175-186.
- Bank HL, Davis RF, Emerson D. Cryogenic preservation of isolated rat islets of Langerhans: effect of cooling and warming rates. *Diabetologia* 1979;16:195-199.
- Bank HL. Rapid assessment of islet viability with acridine orange and propidium iodide. *In Vitro Cell Dev Biol* 1988; 24:266-273.

-Barber Wh, Mankin JA, Laskow DA et al. Long term results of a controlled prospective study with transfusion of donor-specific bone marrow in 57 cadaveric renal allograft recipients. *Transplantation* 1991;51:70-75.

-Barker CF, Frangipane LG, Silver WK. Islet transplantation in genetically determined diabetes. *Ann Surg* 1977; 186:401-410.

-Bell PRF, Wood RFM, Peters M, Nash JR. Comparison of various methods of chemical immunosuppression in islet cell transplantation. *Transplant Proc* 1980;12:291-293.

-Beyer MM, Friedman EA. Histocompatibility-dependent long term islet of Langerhans survival induced by antithymocyte globulin. *Transplant Proc* 1979;11:1436-1439.

-Borel JF. Comparative study of in vitro and in vivo drug effects on cells mediated cytotoxicity. *Immunology* 1976;31:631-641.

-Borel JF, Feurer C, Magnee C, Stahelin H. Effects of the new anti-lymphocytic peptide cyclosporin A in animals. *Immunology* 1977;32:1017-1025.

-Bretzel RG, Beule B, Federlin K. Function and morphology of adult rat islets after culture and transplantation. In: Federlin K, Bretzel RG (eds). *Islet isolation, culture and criopreservation*. Stuttgart:G Thieme 1981:96-108.

-Bretzel RG, Blum BE, Holl E et al. Rat islet allograft survival following different immunomodulative and immunosuppressive treatment. *Exc Med ICS* 1986;717:181-186.

-Bretzel RG, Flesch BK, Willing J et al. Effects of ganglioside (Cronassial) treatment on MHC Ia antigen expression and allograft survival of pancreatic islets in diabetic rats. *Diabetologia* 1990; 22:212.

-Bretzel RG, Hering BJ, Stroedter D et al. Experimental islet transplantation in small animals. In: Ricordi (ed). *Pancreatic islet cell transplantation*. Georgetown, RG Landes Co. 1992:249-260.

-Britland ST, Zimmermann O von, Sharma EK et al. The effect of pancreatic islet transplantation on experimental diabetic neuropathy. *J Neurol Sci* 1991;105:168-174.

-Brooks JR, Gifford GH. Pancreatic homotransplantation. *Transplant Bull* 1959;6:100-103.

-Brown J, Heininger D, Kuret J, Mullen Y. Islet cells grow after transplantation of fetal pancreas and control of diabetes. *Diabetes* 1981;30:9-13.

-Browning H, Resnick P. Homologous and heterologous transplantation of pancreatic tissue in normal and diabetic mice. *Yale J Biol Med* 1951;24:141-152

-Brunstedt J. Rapid isolation of functionally intact pancreatic islets from mice and rats by Percoll gradient centrifugation. *Diabete et Metab* 1980;6:87-89.

-Buitrago A, Gylfe E, Henriksson C, Pertoft H. Rapid isolation of pancreatic islets from collagenase digested pancreas by sedimentation through Percoll at unit gravity. *Biochem Biophys Res* 1977;79:823-828.

-Buschard K, Rygaard J. Restitution of streptozotocin induced diabetes mellitus in nude mice with pancreatic graft from the rat. *Acta Path Microbiol scand (Sect C)* 1976;84:221-226.

-Cattral MS, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. Transplantation of purified single-donor canine islet allografts with cyclosporine. *Transplantation* 1989;47:583-587.

-Cohen DJ, Loertscher R, Rubin M, Tilney NL, Carpenter CB, Strom TB. Cyclosporine: a new immunosuppressive agent for organ transplantation. *Ann Intern Med* 1984;101:667-682.

-Cohen DJ, Loertscher R, Rubin MF et al. Cyclosporine: a new immunosuppressive agent for organ transplantation. *Ann Intern Med* 1984;101:667-682.

-Collier SA, Mandel TE, Carter WM. Effects of duration of organ culture and gestational age on the function of fetal pancreas grafts. *Transplant Proc* 1984;16:1052-4.

-Daffoe DC, Campbell DA, Rosenberg L, Merion RM, Ucros I, Vinik AI, Klandorf H, Turcotte JG. No improvement of pancreas transplant endocrine function by exogenous insulin infusion (islet rest) in the postoperative period. *Transplantation* 1989;48:22-26.

-Danilovs JA, Hofman FM, Taylor CR, Brown J. Expression of HLA-DR antigens in human fetal pancreas tissue. *Diabetes* 1982;31:23-28.

-Darquy S, Reach G. Immunoisolation of pancreatic B cells by microencapsulation. *Diabetologia* 1985;28:776-780.

-Davalli AM, Ricordi C, Socci C, Braghi S et al. Abnormal sensitivity to glucose of human islets cultured in a high glucose medium: reversibility after an additional culture in a normal glucose medium. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;72:202-208

-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;41:426-430.

-Fau MY, Lum ZP, Fu XW et al. Reversal of diabetes in BB rats by transplantation of encapsulated pancreatic islets. *Diabetes* 1990;39: 519-522.

-Faustman DL, Hauptfeld V, Lacy PE, Davie JM. Prolongation of murine islet allograft survival by pretreatment of islets with

antibody directed to Ia determinants. Proc Natl Acad Sci USA 1981;78:5156-5159.

-Faustman DL, Steinman RM, Gebel HM, Hauptfeld V, Davie JM. Prevention of rejection of murine islet allograft by pretreatment with anti-dendritic cell antibody. Proc Natl Acad Sci USA 1984;81:3864-68.

-Federlin KF, Bretzel RG. The effect of islet transplantation on complications on experimental diabetes of the rat. World J Surg 1984;8:169-178.

-Flesch BK, Entenmann H, Milde K et al. Islet transplantation in experimental diabetes of the rat.XIII. Criopreservation reduces MCH class II but not class I antigens of rat pancreatic islets. Horm Metab Res 1991;23:1-8.

-Forsen JW, Blum BE, Bretzel RG, Federlin K. Islet transplantation in experimental diabetes of the rat.IX. In vitro culture reduces Ia-bearing cells in rat islets. Horm Metab Res 1984;16:671-672.

-Frangipane LG, Barker CF, Silvers WK. Importance of weak histocompatibility factors in survival of pancreatic islet transplant. Surgical Forum 1977;28:294-296.

-Gores PF, Najarian JS, Stephanian E et al. Insulin independence in type I diabetes after transplantation of unpurified islets

from single donor with 15-deoxyspergualin. *Lancet* 1993;341:19-21.

-Gotoh M, Maki T, Kiyozumi T, Satomi S, Monaco AP. An improved method for isolation of mouse pancreatic islets. *Transplantation* 1985;40:437-438

-Gray DW, Millard PR, McShane P, Morris PJ. The use of the dye neutral red as a specific non-toxic, intra-vital stain of islets of Langerhans. *Br J Exp Pathol* 1983;64:553-558.

-Gray DWR, McShane P, Grant A, Morris PJ. A method for isolation of islets of Langerhans from the human pancreas. *Diabetes* 1984;33:1055-1061.

-Gray DW, Morris PJ. Cyclosporine and pancreas transplantation. *World J Surg* 1984;8:231-232.

-Gray DW, Warnock GL, Sutton R. Successful autotransplantation of isolated islets of Langerhans in the cynomolgus monkey. *Br J Surg* 1986;73:850-853.

-Gray DW, Morris PJ. The use of fluorescein diacetate and ethidium bromide as a viability stain for isolated islets of Langerhans. *Stain Technol* 1987;62:373-381.

-Gray DW, Cranston D, McShane P et al. The effect of hyperglycaemia on pancreatic islets transplanted into rats beneath the kidney capsule. *Diabetologia* 1989;32:663-667.

-Gray DWR, Leow CK. Non-automated methods for islet isolation. En: C Ricordi (ed). Pancreatic islet cell transplantation. Georgetown, RG Landes Co. 1992:89-98.

-Hahn HJ, Laube F, Lucke S et al. Toxic effects of cyclosporine on the endocrine pancreas of Wistar rat. Transplantation 1986;41:44-47.

-Haug CE, Gill RG, Babcock SK et al. Cyclosporine-induced tolerance requires antigens capable of initiating a immune response. J Immunol 1987;139:2947-2949.

-Hayek A, Lopez AD, Beattie GM. Factors influencing islet transplantation. Transplantation 1989;49:224-225.

-Hegre OD, Hichly GE, Marshall S, Serie JR. Modification of allograft immunogenicity in perinatal islets isolated and purified in vitro. Transplantation 1984;3:227-233.

-Hehmke B, Kohnert KD, Odselius R. The use of a new dextran gradient medium for rapid isolation of functionally intact neonatal rat pancreatic islets. Diabetes Res 1986;3:13-16

-Hering BJ, Muench KP, Schelz J et al. The evaluation of neutral density separation utilizing Ficoll-sodium diatrizoate and Nycodenz and centrifugal elutriation in the purification of bovine and canine islet preparations. Horm Metab Res 1990;25:57-63.

-Hering BJ, Geier C, Schultz AO, Bretzel RG, Federlin K. International Islet Transplant Registry. 14th AIDSPIT Meeting. Igls, Austria, Enero 1995.

-Hess AD, Tutschka PJ. Effect of cyclosporin A on human lymphocyte responses in vitro.I.CsA allows for the expression of alloantigen- activated suppressor cells while preferentially inhibiting the induction of cytolytic effector lymphocytes in MLR. J Immunol 1980;124:2601-2608.

-Hess AD, Tutschka PJ, Santos GW. Effect of cyclosporin A on human lymphocyte responses in vitro.II. Induction of specific alloantigen unresponsiveness mediated by nylon wool adherent suppressor cell. J Immunol 1981;126:961-968.

-Hess AD, Tutschka PJ, Pu Z, Santos GW. Effects of cyclosporin A on human lymphocyte responses in vitro.IV. Production of T cell stimulatory growth factors and development of responsiveness to the growth factors in CsA-treated primary MLR cultures. J Immunol 1982;128:360-367.

-Holt DW, White DJG. How to measure cyclosporine. Lancet 1984; Sept 15:228.

-Homan WP, Williams KA, Millard PR, Morris PJ. Prolongation of renal allograft survival in the rat by pretreatment with donor antigen and cyclosporin A. Transplantation 1981;31:423-427.

-Horaguchi A, Merrell RC. Preparation of viable islet cells from dogs by a new method. *Diabetes* 1981;30:455-458.

-Hullet DA, Falany JL, Love RB et al. Human fetal pancreas- a source for transplantation. *Transplantation* 1987;43:18-22.

-Ishizuka J, Gugliuzza KK, Wassmuth Z et al. Effects of FK506 and cyclosporine on dynamic insulin secretion from isolated dog pancreatic islets. *Transplantation* 1993;56:1486-1490.

-James RFL, Lake SP, Chamberlain J et al. Long-term survival of rat islet allografts after pretreatment with low dose gamma irradiation. *Transplant Proc* 1989; 21:2725-2726.

-James RFL. Density gradient separation of mammalian islets of Langerhans. In: Jara (ed). *Islet transplantation. International symposium. Madrid, Ed. Panamericana* 1992;81-90.

-Jansson L, Sandler S. Influence of hyperglycemia on blood perfusion of autotransplanted pancreatic islets in diabetic rats. *Diabetes* 1989 suppl 1;38:196-198.

-Jansson L, Sandler S. Altered blood flow regulation in autotransplanted pancreatic islets in rats. *Am J Physiol* 1990;259:E52.

-Kahan BD. Individualization of cyclosporine therapy using pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters. *Transplantation*

1985;40:457.

-Kanai T, Porter J, Gotoh M et al. Effect of gamma irradiation on mouse pancreatic islet allograft survival. *Diabetes* 1989; 38 suppl 1:154-156.

-Kemp CB, Knigth MJ, Scharp DW et al. Effect of transplantation site on the results of pancreatic isografts in diabetic rats. *Diabetologia* 1973;9:486-491.

-Kemp CB, Knight MB, Sharp DW, Lacy PE, Ballinger WF. Transplantation of isolated pancreatic islets into the portal vein of diabetic rats. *Nature* 1973;244:447-451.

-Keymeulen B, Vetri M, Gorus F, Vanbrabandt B, Pipeleers DG. The effect of insulin treatment on function of intraportally grafted islets in streptozotocin- diabetic rats. *Transplantation* 1993;56:60-64.

-Klempnauer J, Kawahara K, White DJ et al. Differential susceptibility to cyclosporin A immunosuppression of fully allogeneic vascularized heart and pancreas transplants in the rat. *Eur Surg Res* 1982;14:128-129.

-Klempnauer J, Wagner E, Steiniger B et al. Pancreas and kidney allograft rejection responds differently to cyclosporine immunosuppression. *Transplant Proc* 1983;15:3001-3003.

-Kneteman NM, Alderson D, Scharp DW. Long-term normoglycemia in pancreatectomized dogs following pancreatic islet allotransplantation and cyclosporine immunosupresion. *Transplantation* 1987;44:595-599.

-Kneteman NM, Cattal MC, Warnock GL et al. Immunosuppression and pancreatic islet transplantation. *Horm Metab Res* 1989, suppl series 25: 193-199.

-Kneteman NM, Warnock GL, Evans MG et al. Prolonged function of canine pancreatic fragments autotransplanted to the spleen by venous reflux. *Transplantation* 1990;49:679-681.

-Kolb E, Urfer K, Largiadier F. Early rejection of allotransplanted pancreatic islets in the dog. *Transplant Proc* 1979;11:543-548.

-Koncz L, Zimmerman CE, DeLellis RA, Davidoff F. Transplantation of pancreatic islets into the spleen of diabetic rats and subsequent splenectomy. *Transplantation* 1976;21:427-434.

-Korsgren O, Jansson L, Anderson A. Effects of hyperglycemia on function of isolated mouse pancreatic islets transplanted under kidney capsule. *Diabetes* 1989;38:510-515.

-Korsgren O, Jansson L, Anderson A, Sundler F. Reinnervation of transplanted pancreatic islets. *Transplantation* 1993; 56:138-143.

- Kramp RC, Congdon CC, Smith LH. Isogeneic and allogeneic transplantation of duct-ligated pancreas in streptozotocin diabetic mouse. *Eur J Clin Invest* 1975;5:249-254.
- Kupiec-Wegliski JW, Filho MA, Strom TB, Tilney NL. Sparing of suppressor cells: a critical action of cyclosporine. *Transplantation* 1984;38:97-101.
- Lacy PE, Kostianowsky M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 1967;16:35-39.
- Lacy PE, Finke EH, Conant S, Naber S. Long-term perfusion of isolated rat islets in vitro. *Diabetes* 1976;25:484-493.
- Lacy PE, Davie JM, Finke EH. Prolongation of islet allograft survival following in vitro culture (24° degrees C) and a single injection of ALS. *Science* 1979;204:312-313.
- Lacy PE. Experimental immunoalteration. *World J Surg* 1984;8:198-203.
- Lafferty KJ, Prose SJ. Theory and practice of immunoregulation by tissue treatment prior to transplantation. *World J Surg* 1984;8:187-197.
- Lafferty KJ, Gill R, Babcock S. Tolerance induction in adult animals: the cyclosporine anomaly. *Prog Allergy* 1986;38:247.

-Lake SP, Anderson J, Chamberlain J, Gardner SJ, Bell PRF, James RFL. Bovine serum albumine density gradient isolation of rat pancreatic islets. *Transplantation* 1987;43:805-808.

-Lake SP, Chamberlain J, Husken P, Bell PRF et al. In vivo assessment of isolated pancreatic viability using the streptozotocin-induced diabetic nude rat. *Diabetologia* 1988;31:390-394.

-Lake SP, Chamberlain J, Bassett PD, London NJ et al. Successful reversal diabetes in nude rats by transplantation of isolated adult human islets of Langerhans. *Diabetes* 1989;38:146-151.

-Lake SP, Chamberlain J, Walczak K, Bell PRF, James RFL. A test gradient system for optimizing density gradient isolation of pancreatic islets. *Transplantation* 1989;48:354-357.

-Latif ZA, Noel J, Alejandro R. A simple method of staining fresh and cultured islets. *Transplantation* 1988;45:827-830.

-Lau H, Reemtsma K, Hardy MA. Prolongation of rat islet allograft survival by direct ultraviolet irradiation of the graft. *Science* 1984;223:607-609.

-Leahy JL, Weir GC. Evolution of abnormal insulin secretory responses during 48-h in vivo hyperglycemia. *Diabetes* 1988;37:217-222.

-Leif RC, Vinograd J. The distribution of buoyant density of human erythrocytes in bovine albumin solutions. Proc Nat Acad Sci USA 1964;51:520.

-Leow CK, Gray DWR, Morris PJ. Successful reversal of diabetes by single donor isologous islets transplantation. Third International Congress on Pancreatic and Islet Transplantation and Symposium on Artificial Insulin Delivery Systems. Lyon, France 1991.

-Lindall AW, Steffes M, Sorensen R. Immunoassayable content of subcellular fractions of rat islets. Endocrinology 1969;85:218-223.

-London NJM, James RFL, Bell PRF. Islet purification. In: Ricordi (ed). Pancreatic islet cell transplantation. Georgetown, RG Landes Co. 1992:113-123.

-Maitland JE, Parry DG, Turtle JR. Perfusion and culture of human fetal pancreas. Diabetes 1980;29 (suppl 1):57-63.

-Mandel TE, Higginbotham L. Organ culture and transplantation of fetal mouse pancreatic islets. Transplant Proc 1979;11:1505-1506.

-Mandel TE, Georgiou HM. Xenotransplantation of human fetal islets in nude mice. Transplant Proc 1984;16:849-850.

-Maratos E, Taub RN, Bramis J. Amelioration of streptozotocin-

induced diabetes in mice by the implantation of pancreatic islets in diffusion chambers. Mt Sinai J Med 1976;43:415-422.

-Mauer SM, Steffes MW, Sutherland DER et al. Studies of the rate of regression of the glomerular lesions of diabetic rats with pancreatic islets transplantation. Diabetes 1975; 24: 280-285.

-McShane P, Sutton R, Gray DWR, Morris PJ. Protease activity in pancreatic islet isolation by enzymatic digestion. Diabetes (suppl) 1989;38:126-128.

-McShane P, Gray DW, Hughes D, Morris PJ. Collagen type in human and rat pancreas. Localisation and relation to digestion. Diabetic Med (Suppl 2) 1990;7:17-27.

-Méndola JF, Fernandez-Alvarez J, Saenz A et al. Effect of hyperglycemia and of one-week culture on the revascularization of pancreatic islet isograft. Transplant Proc 1992;26:689-691.

-Menger MD, Jaeger S, Walter P et al. Angiogenesis and hemodynamics of microvasculature of transplanted islets of Langerhans. Diabetes 1989,38,supl 1:199-201.

-Morris PJ, Gray DW, Sutton R. Pancreatic islet transplantation. Br Med Bull 1989;45:224-241.

-Moskalewski S. Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig. Gen Comp Endocrinol 1965;5:342-353.

-Naji A, Silvers WK, Barlett ST et al. Immunologic factors in pathogenesis and treatment of human and animal diabetes. World J Surg 1984;8:214-220.

-Nakagawara G, Yamasaki G, Kimura S et al. Insulin-releasing activity and successful transplantation of pancreatic islets preserved by tissue culture. Surgery 1978;83:188.

-Nankivell BJ, Hibbins M, Chapman JR. Diagnostic utility of whole blood cyclosporine measurements in renal transplantation using triple therapy. Transplantation 1994;58:989-996.

-Nooter K, Schultz F, Sonneveld P. Evidence for a possible dose-dependant pharmacokinetics of cyclosporine-A in the rat. Res Commun Chem Phatol Pharmacol 1984;43:407-412.

-Offord RE, Halban PA. Isolation of pancreatic islets of Langerhans by filtration on nylon mesh. Biochem Biophys Res Commun 1978;82:1091-1097.

-Okeda T, Ono J, Takadi R, Todo S. Simple method for the collection of pancreatic islets by the use of Ficoll-Conray gradient. Endocrinol Japan 1979;26:495-499

-Olack B, Swanson C, McLearn M et al. Islet purification using Euro-Ficoll gradients. Transplant Proc 1991;23:774-776.

-Park BN, Soeldner JS, Gleason RE. Diabetes in remission: insulin

secretory dynamics. *Diabetes* 1974;23:616-620.

-Posselt AM, Barker CF, Tomaszewski JE, Markmann JF, Choti MA, Naji A. Induction of donor-specific unresponsiveness by intrathymic islet transplantation. *Science* 1990;249:1293-95.

-Povlsen CO, Skakkebaek NE, Rygaard J, Pensen G. Heterotransplantation of human foetal organs to the mouse mutant nude. *Nature* 1974;248:247-249.

-Qian T, Schachner R, Brendel M, Kong SS, Alejandro R. Induction of donor-specific tolerance to rat islet allografts by intrathymic inoculation of solubilized spleen cell membrane antigens. *Diabetes* 1993;42:1544-46.

-Rajotte RV, Warnock GL, Bruch LC, Procyshyn AW. Transplantation of criopreserved and fresh rat islets and canine pancreatic fragments: comparison of criopreserved protocols. *Criobiology* 1983;20:169-184.

-Rajotte RV, Evans MG, Warnock GL, Kneteman NM. Islet criopreservation. *Methods in Islet Transplantation Research* 1989;25:72-80.

-Rajotte RV, Warnock GL, Kneteman NM. Methods of islet cryopreservation. En: Ricordi (ed). *Pancreatic islet cell transplantation*. Georgetown, R.G. Landes Co. 1992: 124-131.

-Raydt G. Isolation of functionally intact pancreatic islets by centrifugation in metrizamide gradients. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 1977;79:823-828.

-Ricordi C, Finke EH, Lacy PE. A method for the mass isolation of islets from the adult pig pancreas. *Diabetes* 1986;35:649-653.

-Ricordi C, Lacy PE, Finke EH et al. Automated method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes* 1988;37:413-420.

-Ricordi C, Scharp DW, Lacy PE. Reversal of diabetes in nude mice after transplantation of fresh and 7-day cultured (24°C) human pancreatic islets. *Transplantation* 1988;45:994-996.

-Ricordi C, Gray DWR, Hering BJ et al. Islet isolation assesment in man and large animals. *Acta Diabetol Lat* 1990;27:185-195.

-Rietz BA, Bieber CP, Raney AA et al. Orthotopic heart and combined heart and lung transplantation with cyclosporin-A immune suppression. *Transplant Proc* 1981;13:393-396.

-Rooth P, Dawidson I, Lafferty K et al. Prevention of detrimental effect of cyclosporin A on vascular ingrowth of transplanted pancreatic islets with verapamil. *Diabetes* 1989 suppl 1;38:202-205.

-Rooth P, Dawidson I, Lafferty K et al. Prevention of detrimental effect of cyclosporin A on vascular ingrowth of transplanted

pancreatic islets with verapamil. Diabetes 1989;
38 suppl 1:202-205.

-Rosenthaler J, Keller HP. Comment on cyclosporine assay techniques: an attempt for recommendations. Transplant Proc 1990;22:1160-1165.

-Roza A, Markmann JF, Brayman KL et al. Isolated islets cells are more vulnerable to recurrent diabetes than vascularized pancreas grafts. Surg Forum 1987;38:373.

-Rynasiewicz J, Sutherland DE, Kawahara K, Gorecki P, Najarian JS. Cyclosporine A prolongation of segmental and islet allograft function in rats. Transplant Proc 1980;12:270-275.

-Sandler S, Kojima Y, Anderson A. Criopreservation of mouse pancreatic islets: effects of fast cooling on islets B cell function and on the outcome of islet transplantation. Transplantation 1986;42:588-593.

-Scharp DW, Kemp CB, Knigth MJ, Ballinger WF, Lacy PE. The use of Ficoll in the preparation of viable islets from the rat pancreas. Transplantation 1973;16:686-691.

-Scharp DW, White DJ, Ballinger WF, Lacy PE. Transplantation of intact islets of Langerhans after tissue culture. In vitro 1974;9:364.

-Scharp DW, Lacy PE, Santiago JV et al. Insulin independence after islet transplantation into type I diabetic patient. *Diabetes* 1990;39:515-518.

-Scharp DW, Swanson CJ, Olack BJ et al. Protection of encapsulated human islets implanted without immunosuppression in patients with type I or type II diabetes and in nondiabetic control subjects. *Diabetes* 1994;43:1167-1170.

-Shibata A, Ludvigsen CW, Naber SP, McDaniel ML, Lacy PE. Standardization of a digestion-filtration method for isolation of pancreatic islets. *Diabetes* 1976;25:667-672

-Sibley RK, Sutherland DER, Goetz F, Michael AF. Recurrent diabetes mellitus in the pancreas iso- and allograft: A light in electron microscopic immunohistological analysis in four cases. *Lab Invest* 1985;53:132-138.

-Siebers U, Zekorn T, Horcher A et al. In vitro testing of rat and porcine islets microencapsulated in barium alginate beads. *Transplant Proc* 1992.

-Soon-Shiong P, Heintz RE, Merideth N et al. Insulin independence in a diabetic patient after encapsulated islet transplantation. *Lancet* 1994;343:950-951.

-Ssobolew LW. Zur normalen und pathologischen morphologie der inneren secretion der bauchspeicheldruse. *Virchows. Arch Path*

Anat 1902;168:91.

-Steffes MW, Brown DM, Basgen JM, Mauer SM. Amelioration of mesangial volume and surface alteration following islet transplantation in rats. Diabetes 1980;29:509-514.

-Strautz RL. Studies of hereditary-obese mice (ob/ob) after implantation of pancreatic islets in Millipore filter capsules. Diabetologia 1970,6:306-312.

-Strodter D, Schuster KR, Mogk M et al. Reversibility of diabetic cardiomyopathy with islet transplantation in rats. Diabetes 1989, 38,suppl 1; 319.

-Sunshine GH, Basch RS, Coffey RG et al. Thymopoietin enhances the allogeneic response and cyclic GMP levels of mouse periferial, thymus-derived lymphocytes. J Immunol 1978;120:1594.

-Sutherland DER. Pancreas and islet transplantation. Experimental studies. Diabetología 1981;20:161-185.

-Sutherland DER. Pancreatic transplantation: an update. Diabetes Rev 1993;1:1-14.

-Sutton R, Peters M, McShane P, Gray DWR, Morris PJ. Isolation of rat pancreatic islets by ductal injection of collagenase. Transplantation 1986;42:689-691.

-Sutton R, Peters M, McShane P, Gray DWR, Morris PJ. An improved method for isolation of islets of Langerhans from the adult rat pancreas. *Transplant Proc* 1986;18:1819-1820

-Sutton R, Hammonds P, Hughes D. Isolation of islets from human pancreas using increased incubation temperatures and variable density gradients. *Horm Metab Res* 1989;25:35-36.

-Taunton-Rigby A. Transplantation of encapsulated islets. *Transplant Proc* 1986;18:1841-1844.

-Tuch BE, NG ABP, Jones A, Turtle JR. Histologic differentiation of human fetal pancreatic explants transplanted into nude mice. *Diabetes* 1984;33:1180-1187.

-Turner RC, McCarthy ST, Holman RR, Harris E. Beta-cell function improved by supplementing basal insulin secretion in mild diabetes. *Br J Med* 1976;1252-1261.

-Turner RC, Holman RR. Beta cell function during insulin or chlorpropamide treatment of maturity-onset diabetes mellitus. *Diabetes* 1978; 27(suppl):241-247.

-Tze WJ, Wong FC, Tingle AJ. The use of hypaque ficoll in the isolation of pancreatic islets in rats. *Transplantation* 1976;22:201-205.

-Tze WJ, Wong FC, Chen LM, O'Young S. Implantable artificial

endocrine pancreas used to restore normoglycemia in the diabetic rat. *Nature* 1976;264:466.

-Ueda CT, Lemaire M, Gsell G, Misslin P, Nussbaumer K. Apparent dose-dependant oral absorption of cyclosporine A in rats. *Biopharm Drug Dispos* 1984;5:141.

-Van der Burg MPM, Goozen HG, Ploeg RJ et al. Pancreatic islet isolation with UW solution: a new concept. *Transplant Proc* 1990;22:2050-2051.

-Van Suylichem PT, Pasma A, Wolters GH, Van Schilfgaarde R. Microscopic aspects of the structure and collagen content of the pancreas from the perspective of islet isolation. *Transplant Proc* 1987;19:3958-3959.

-Violettes B, Sutherland DER, Payne WA et al. Synergistic effect of donor specific soluble membrane antigen injection and antilymphocyte globulin administration on the survival of islets allografts in rats. *Transplantation* 1978;25:336-340.

-Viviani GL, Borgoglio MG, Fontana I et al. Azathioprine decreases insulin secretion in human islets. *Transplant Proc* 1989;21:2714-2718.

-Walter PK, Dickneite G, Schorlemmer HU et al. Prolongation of graft survival in allogenic islet transplantation by 15-deoxyspergualin in the rat. *Diabetologia* 1987;30:38-40.

- Warnock GL, Gray DW, McShane P et al. Survival of criopreservated isolated adult human pancreatic islets of Langerhans. *Transplantation* 1987;44:75-82.
- Warnock GL, Ellis DK, Cattral M, Untch D, Kneteman NM, Rajotte RV. Viable purified islets of Langerhans from collagenase-perfused human pancreas. *Diabetes (suppl)* 1989;38:136-139.
- Wassef R, Cohen Z, Langer B. Pharmacokinetic profiles of cyclosporine in rats. *Transplantation* 1985;40:489-493.
- White DJ, Rolles K, Ottawa T, Turrel O. Cyclosporin-A-induced long-term survival of fully incompatible skin and heart grafts in rats. *Transplant Proc* 1980;12:261-265.
- Woehrle M, Markman JF, Beyer K, Naji A, Bretzel RG, Federlin K. The influence of the implantation site (kidney capsule vs. portal vein) on islet survival. In: Federlin K, Bretzel RG, Hering BJ (eds). *Methods in Islet Transplantation Research. Horm Metab Res* 1990 suppl ser 25:163-165.
- Woloszczuk W, Schindler J, Hamilton G, Roth E. How to measure cyclosporine. *Lancet* 1984;638.
- Wolters GHJ, Van Suylichem PTR, Van Deijnen JHM, Van Schilfgaarde R. Factors influencing the isolation process of islets of Langerhans. *Horm Metab Res* 1990 suppl 25:20-26.

-Yakimets WJ, Lakey JRT, Yatscoff RW et al. Prolongation of canine pancreatic islet allograft survival with combined rapamycin and cyclosporine therapy at low doses. *Transplantation* 1993;56:1293-1298.

-Yasunami Y, Ryu S, Kamei T. Characterization of the immunosuppressive activity of FK 506 in rat islet allografts. *Transplant Proc* 1990;22:875.

-Zekorn T, Siebers U, Bretzel RG et al. Protection of islets of Langerhans from interleukin-1 toxicity by artificial membranes. *Transplantation* 1990; 50:391-394.

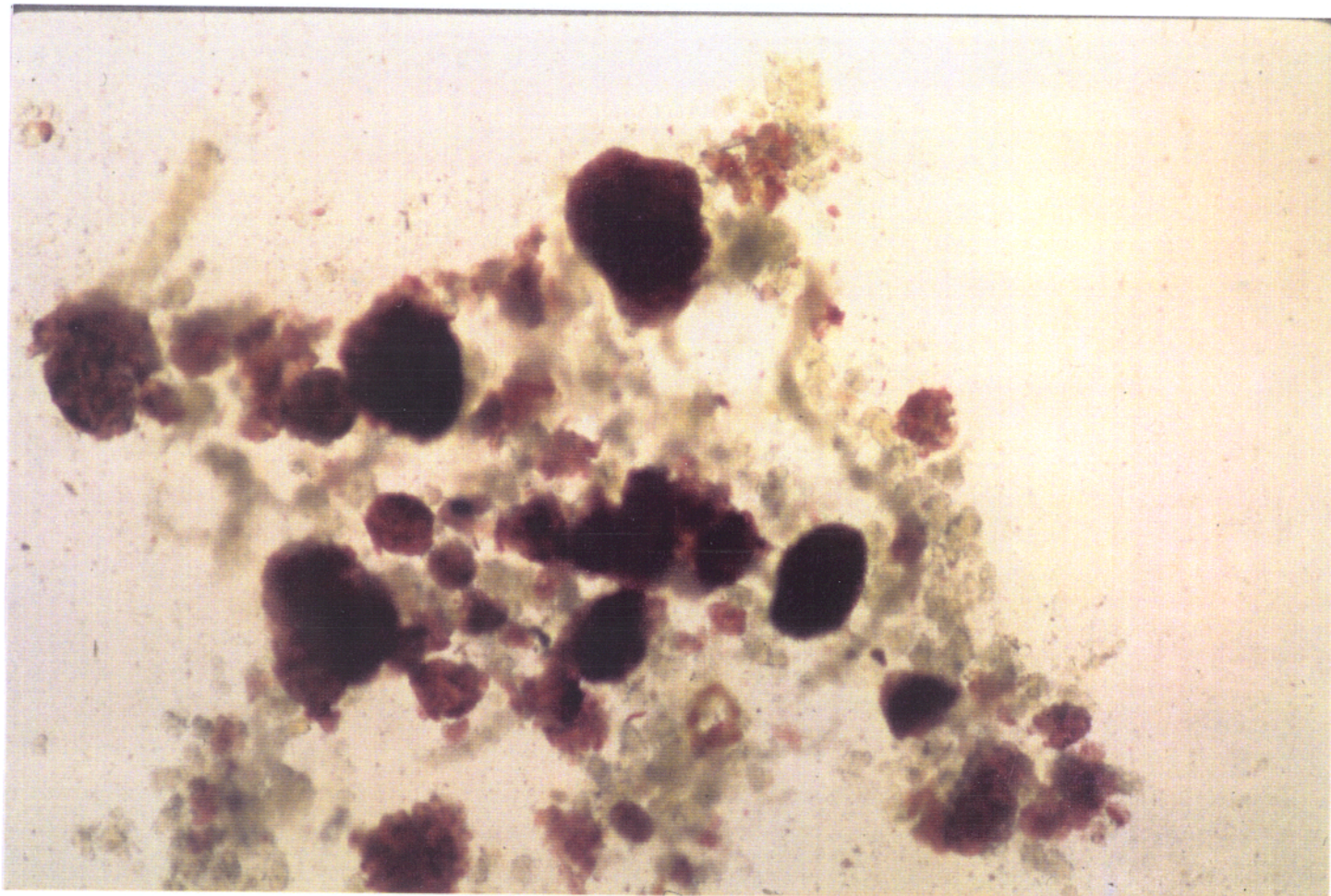
APENDICE

ABREVIATURAS

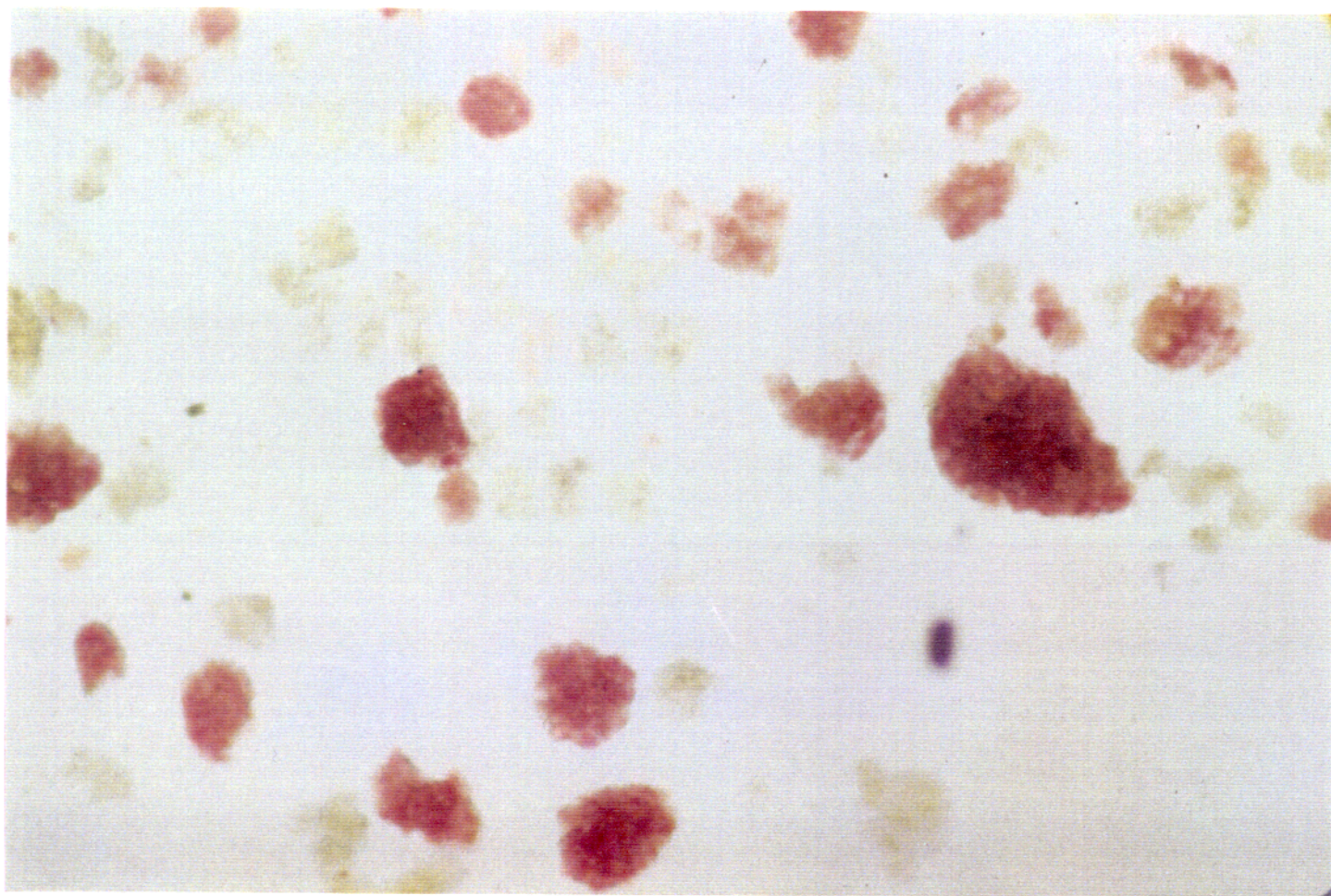
- ALG... globulina antilinfocítica
ALS... suero antilinfocítico
ATG... globulina antitimocítica
BB.... bio-breeding
BE.... bromuro de etidio
BSA... albúmina sérica bovina
col... colaboradores
CsA... ciclosporina
EIA... enzimoimmunoanálisis
FDA... diacetato de fluoresceína
FPIA.. inmunoanálisis de polarización de fluorescencia
HPLC.. cromatografía líquida de alta resolución
IP.... ioduro de propidio
mcm... micrómetro
MCH... complejo mayor de histocompatibilidad
MEM... minimal essential medium
mosm.. miliosmoles
NA.... naranja de acridina
NOD... non-obese diabetic
RIA... radioimmunoanálisis
sc.... subcutánea
STZ... estreptozotocina
TI.... trasplante de islotes
UA.... unidades arbitrarias
vo.... vía oral

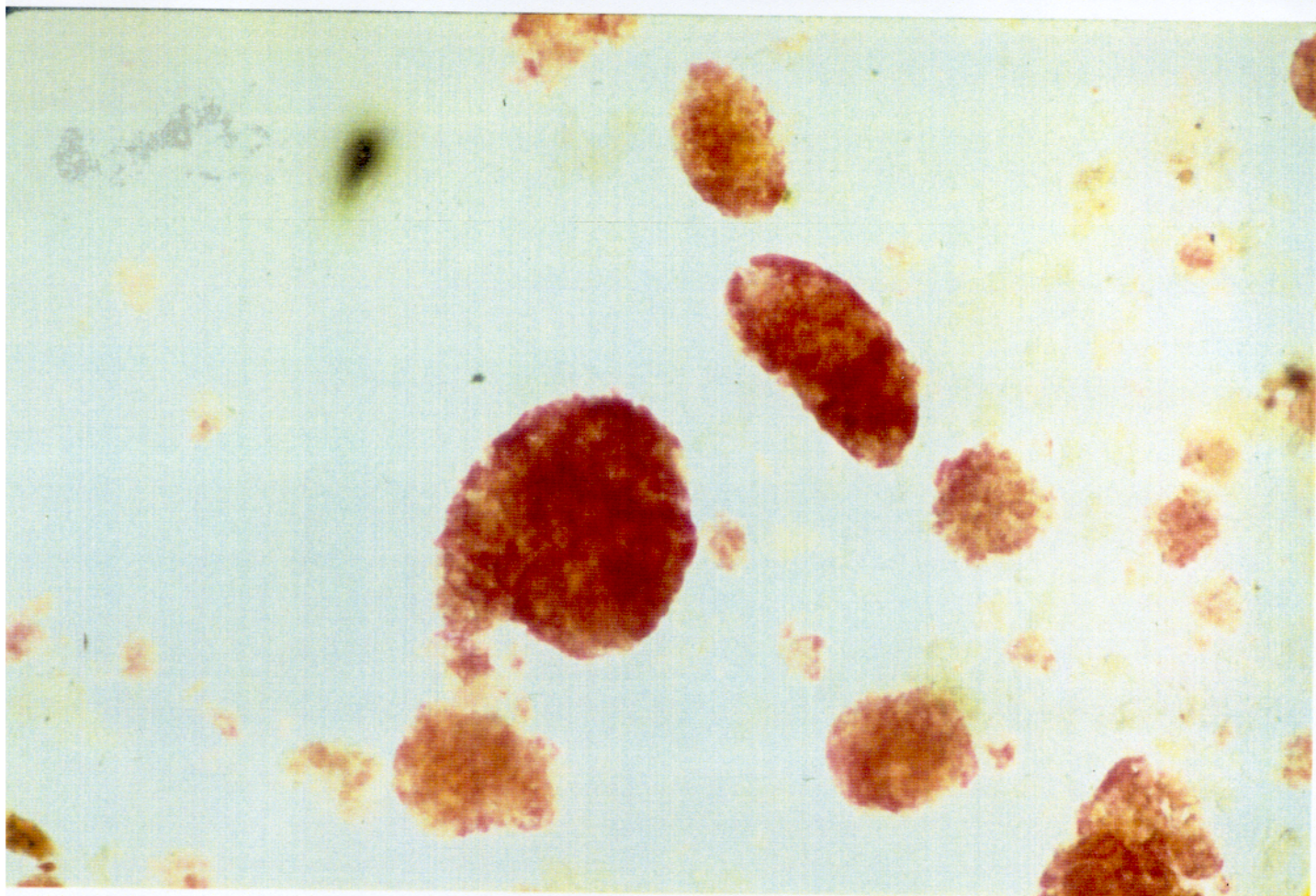
RELACION DE TABLAS Y GRAFICAS

- TABLAS 1-A a 1-K. Peso y glucemia pre y post-STZ en los diferentes grupos A a K
- TABLAS 2-A a 2-K. Masa y pureza insular en los diferentes grupos A a K
- TABLA 3. Gradientes de densidad
- TABLA 4. Resultados de trasplantes. Todos los grupos
- TABLA 5. Ciclosporinemia tras administración 0,1,2 vo
- TABLA 6. Ciclosporinemia tras administración 0,1,2 esofágica
- TABLA 7. Ciclosporinemia tras administración 0,1,2 sc
- GRAFICA 1. Efectos de CsA sobre la activación de las células T
- GRAFICA 2. Glucemia y peso pre y post-STZ. Todos los grupos
- GRAFICA 3. Masa insular. Todos los grupos
- GRAFICA 4. Pureza insular. Todos los grupos
- GRAFICA 5. Secreción estática de insulina
- GRAFICAS 6 a 16. Evolución tras TI en los diferentes grupos
- GRAFICA 17. Respuesta a insulina exógena (13 u/kg)
- GRAFICA 18. Respuesta a insulina exógena (5 u/kg)
- GRAFICA 19. Ciclosporinemias. Admon. oral-esofágica-subcutánea
- GRAFICA 20. Area bajo la curva. CsA oral
- GRAFICA 21. Area bajo la curva. CsA esofágica
- GRAFICA 22. Area bajo la curva. CsA subcutánea
- GRAFICA 23. Area bajo la curva. Comparativo de grupos
- GRAFICA 24. Análisis de regresión duración-numero de islotes
- GRAFICA 25. Análisis de regresión duración-pureza insular
- GRAFICA 26. Evolución glucémica tras dosis extra de CsA
- GRAFICA 27. Respuesta a CsA extra según glucemia previa



FOTOGRAFIA SUPERIOR. Aspecto de la preparación de islotes tras digestión con colagenasa antes de los gradientes de densidad.
FOTOGRAFIA INFERIOR. Preparación de islotes de un 60% de pureza estimada resultante de la separación con gradientes de densidad.
En ambos casos están teñidos con ditizona.





FOTOGRAFIA SUPERIOR. Islotes teñidos con un 80% de pureza estimada tras separación con gradientes de BSA.
FOTOGRAFIA INFERIOR. Aspecto de un islote aislado teñido con ditizona.

