

T
526

90896

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



Casa Abierta al Tiempo

**TRASPLANTE DE CÉLULAS INSULARES DE
PÁNCREAS ELECTROFUSIONADAS CON
CÉLULAS DÉRMICAS EN RATAS DIABÉTICAS**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T A

M. C. EDUARDO BARRERA ESCORCIA

COMITÉ TUTORAL

DIRECTOR: DR. RUBÉN ROMÁN RAMOS

ASESOR: DR. JOSÉ DOMINGO MÉNDEZ FRANCISCO

ASESOR: DR. JOSÉ MIGUEL BETANCOURT RULE

MÉXICO, D.F.

FEBRERO, 2005

El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad
Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados
de Excelencia del CONACYT y cuenta con el apoyo del mismo
Consejo, con el convenio PFP-20-93

El Jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la Tesis que

Presentó:

EDUARDO BARRERA ESCORCIA

El día 14 de febrero del año 2005

Sinodales:

DR. RUBÉN ROMÁN RAMOS



DR. JOSÉ DOMINGO MÉNDEZ FRANCISCO



DR. MIGUEL BETANCOURT RULE



Dr. FRANCISCO J. ALARCÓN AGUILAR



Dr. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN



DIRECTOR DE TESIS

DR. RUBÉN ROMÁN RAMOS

Profesor Titular "C", Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel II

ASESOR

DR. JOSÉ DOMINGO MÉNDEZ FRANCISCO

Investigador Titular B, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades
Metabólicas. Hospital de Especialidades. CMN Siglo XXI. IMSS.
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores Nivel I

ASESOR

DR. MIGUEL BETANCOURT RULE

Profesor Titular "C", Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel II

Este estudio se realizó en:
Laboratorio de Biorregulación. FES Iztacala UNAM.
Laboratorio de Farmacología. UAM-I

Investigación financiada y apoyada por:

Departamento de Investigación de la FES Iztacala. UNAM
Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud. UAM-Iztapalapa.

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Metabólicas. Centro Médico
Nacional Siglo XXI. IMSS.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente al Dr. Rubén Román Ramos su participación y acertada dirección en ésta investigación. También agradezco su apoyo, confianza y sobre todo su amistad.

Agradezco al Dr. José Domingo Méndez Francisco su apoyo y dedicación en la asesoría y elaboración de éste trabajo, así como del trabajo publicado. Gracias también por su fino trato, optimismo y amistad.

Gracias al Dr. José Miguel Betancourt Rule por su asesoría y valiosas aportaciones para la elaboración de este trabajo. Agradezco también su amistad de 30 años.

Gracias al Dr. Luis Arturo Baiza Gutman y al Dr. Francisco Alarcón Aguilar por su dedicación y tiempo en la revisión de esta Tesis y sus valiosas aportaciones, así como sus consejos y palabras de aliento.

Agradezco muy especialmente el apoyo leal e incondicional de mis amigos compañeros de equipo del laboratorio de Biorregulación de la FES Iztacala; en orden de antigüedad en el proyecto: Biol. Martha fregoso Padilla. Biol. José Martínez Aguilar. Biol. Irma Castillo Padilla. Cand. a Dr. Alonso Vilches Flores. Biol. Antonio Muñoz Torres. Biol Agustín Vargas Vera.

DEDICATORIAS

A mi querida esposa Patricia, quien me devolvió mis sueños.

A mis queridas hijas Tania y Katia que mantienen mis sueños vivos.

A mi padre, un hombre dulce, que fue víctima de esta enfermedad.

A mi madre, una mujer admirable y amorosa, que padece de esta enfermedad.

A mis queridos hermanos Guadalupe y Héctor, con quienes cuento
incondicionalmente.

A mis leales y divertidos amigos de mi vida académica M.C. Federico Rivas Vilchis
y Dr. Rodolfo Velazco Lezama.

A mis amigos compañeros de laboratorio, cuya ayuda en esta empresa es
inapreciable.

INDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xv
1 INTRODUCCIÓN	1
LA DIABETES MELLITUS	1
1.1 Definición	1
1.2 Clasificación	2
1.3 Epidemiología	3
1.4 Patogenia de la diabetes mellitus tipo 1	6
1.5 Patogenia de la diabetes mellitus tipo 2	12
1.6 Manifestaciones clínicas	16
1.7 Tratamiento	17
1.8 Complicaciones agudas	26
1.9 Complicaciones tardías	29
1.10 Resistencia a la insulina	37
1.11 Tratamientos experimentales	40
2 ANTECEDENTES	42
LA FUSIÓN CELULAR	42
2.1 La célula híbrida	43
2.2 Métodos de hibridación	45
2.3 La electrofusión	46
3 JUSTIFICACIÓN	50
4 HIPÓTESIS	52

5 OBJETIVOS	53
5.1 Objetivo general	53
5.2 Objetivos particulares	53
6 MATERIAL Y MÉTODOS	54
6.1 Animales	54
6.2 Obtención de células dérmicas	56
6.3 Obtención de células insulares	57
6.4 Electrofusión	57
6.5 Trasplante de células electrofusionadas	58
6.6 Parámetros clínicos y bioquímicos ..	59
6.7 Ensayo hemolítico inverso	60
6.8 Análisis estadístico	62
7 RESULTADOS	63
7.1 Parámetros clínicos	63
7.2 Parámetros bioquímicos en sangre.....	67
7.3 Parámetros bioquímicos en orina.....	71
7.4 Ensayo hemolítico inverso	73
8 DISCUSIÓN	75
9 CONCLUSIONES	80
10 PERSPECTIVAS	81
11 REFERENCIAS	82

ANEXO

PUBLICACIÓN ACEPTADA

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Procedimiento experimental para el trasplante de células insulares pancreáticas y dérmicas electrofusionadas en ratas diabéticas (esquema metodológico).

Figura 2a. Parámetros clínicos: Valores de peso corporal a los 30, 60 y 90 días.

Figura 2b. Parámetros clínicos: Ingesta de alimento durante 24 h, valores registrados a los 30, 60 y 90 días.

Figura 2c. Parámetros clínicos: Ingesta de agua durante 24 h, valores registrados a los 30, 60 y 90 días.

Figura 2d. Parámetros clínicos: Diuresis durante 24 h, valores registrados a los 30, 60 y 90 días.

Figura 3a. Parámetros bioquímicos: Glucemia en ayunas, valores registrados a los 30, 60 y 90 días.

Figura 3b. Parámetros bioquímicos: Concentración de insulina en sangre, valores registrados a los 30, 60 y 90 días.

Figura 3c. Parámetros bioquímicos: Hemoglobina glicada, valores registrados a los 30, 60 y 90 días.

Figura 4a. Parámetros bioquímicos: Glucosuria, valores registrados a los 30, 60 y 90 días.

Figura 4b. Parámetros bioquímicos: Cuerpos cetónicos, valores registrados a los 30, 60 y 90 días

Figura 5. Célula híbrida (pancreática X dérmica)

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Actividad de transaminasa glutámico pirúvica a los 90 días.

Tabla 2. Actividad de transaminasa glutámico oxaloacética a los 90 días.

INDICE DE ABREVIATURAS

AGE	Advanced glycation end products
CA	Corriente alterna
CD	Corriente directa
DM	Diabetes mellitus
DMG	Diabetes mellitu gestacional
FNT	Factor de necrosis tumoral
GAD	Glutamic acid descarboxilase
GLP	Glucagon like peptide
GLUT	Glucose transporter
HbA1c	Hemoglobina glicada
HDL	High density lipoprotein
HLA	Complejo de histocompatibilidad
IGF	Insuline growth factor
ISCI	Infusión subcutánea continúa de insulina
ISM	Infusión subcutánea múltiple
KDa	Kilodalton
LDL	Low density lipoprotein
MHz	MegaHertz
PEG	Polietilenglicol
RF	Radiofrecuencia
TGO	Transaminasa glutámico oxaloacética
TGP	Transaminasa glutámico pirúvica.

RESUMEN

Este trabajo fue diseñado con el fin de estudiar un método alternativo para el tratamiento de la diabetes mellitus, realizando un trasplante de células híbridas obtenidas por electrofusión de células insulares del páncreas de un donador sano con células dérmicas del receptor diabético. Las células híbridas podrían conservar la capacidad productora de insulina, su regulación y el control natural de la glucemia, así como los factores de histocompatibilidad para evitar el rechazo.

Fueron formados cuatro grupos de cuatro ratas: Grupo 1. Animales sanos (control sano). Grupo 2. Animales diabetizados sin tratamiento (control diabético). Grupo 3. Ratas receptoras de trasplante con extracción de células dérmicas, las cuales fueron mezcladas con células insulares pancreáticas de un donador sano (trasplante sin fusión) y Grupo 4. Ratas receptoras de trasplante con extracción de células dérmicas, las cuales fueron electrofusionadas con células pancreáticas insulares de un donador sano (trasplante con fusión).

Para el grupo 4, las células fueron combinadas y sometidas a condiciones de dielectroforesis con un pulso de corriente alterna de 15 segundos de 10 Volts RMS de 0.5 MHz. La fusión fue realizada con un pulso de corriente directa de 1 milisegundo de 300 Volts.

Se registraron los signos clínicos (peso, diuresis, ingesta de agua y alimento) y fueron determinados varios parámetros bioquímicos en sangre, los cuales incluyeron glucemia basal, ácido úrico, colesterol, triglicéridos, transaminasa glutámico oxaloacética, transaminasa glutámico pirúvica, urea, creatinina, insulina y hemoglobina glicada. Adicionalmente, cuerpos cetónicos y glucosa fueron medidos

en orina. Todas las determinaciones fueron realizadas a los 0, 30, 60 y 90 días de realizado el trasplante.

Con el fin de comprobar si las células híbridas conservan la capacidad secretoria de insulina, se realizó un ensayo hemolítico inverso.

Los animales del grupo 1 mantuvieron sus parámetros dentro de los rangos normales. Las ratas del grupo 2 presentaron alteraciones correspondientes a un estado diabético en casi todos los parámetros medidos, ninguno de los animales mostró tendencia a mejorar espontáneamente, dos de las ratas murieron a los 66 y 72 días. El grupo 3 mostró un perfil similar al grupo control diabético, sin mejoría, sólo una rata murió al día 33; mientras que en las ratas trasplantadas con fusión (Grupo 4) se observó una mejoría substancial en el peso corporal, la ingesta de agua y la concentración de insulina sérica y una mejoría discreta de la glucemia. No obstante que la concentración de insulina estuvo abajo del rango normal fue significativamente mayor que en el grupo 3; ninguna rata de este grupo murió.

El ensayo hemolítico inverso comprobó la capacidad secretoria de las células híbridas.

Estos resultados muestran que es posible mejorar el cuadro diabético en el animal receptor, por medio del trasplante de células dérmicas del mismo, fusionadas con células insulares de páncreas de un donador sano y que las células trasplantadas son capaces de secretar insulina.

Palabras clave: Diabetes mellitus, trasplante de células insulares pancreáticas, trasplante de páncreas, electrofusión, células híbridas.

ABSTRACT

This work was designed to study an alternative treatment of diabetes mellitus by using a transplant of hybrid cells obtained by the electrofusion of pancreatic islet cells from a healthy donor with dermic cells from a diabetic recipient. The hybrid cells could keep the capacity of insulin production, its regulation, and the natural control of glycemia, as well as the factors of histocompatibility to avoid the rejection.

Four groups of four rats each were established: Group 1. Healthy animals (healthy control), Group 2. Diabetized non-treated animals (diabetic control), Group 3. Transplant recipient rats with extraction of dermic cells which were mixed with pancreatic insular cells from a healthy donor (transplant without fusion), and Group 4. Transplant recipient rats, with extraction of dermic cells which were electrofused with pancreatic insular cells from a healthy donor (transplant with fusion).

For group 4, the cells were combined and they were submitted to dielectrophoresis conditions with an alternating current pulse of 15 seconds of 10 Volts RMS of 0.5 MHz. The fusion was made with a direct current pulse of 1 milliseconds of 300 Volts.

Clinical signs were registered (weight, diuresis, food and water intake), and several biochemical parameters in blood were measured, including basal glycemia, uric acid, cholesterol, triglycerides, glutamate oxalacetate transaminase, glutamate pyruvate transaminase, urea, creatinine, insulin and glycated hemoglobin. Additionally, ketone bodies and glucose were measured in urine. All determinations were made at 30, 60, and 90 days after transplantation.

In order to probe that hybrid cells were able of produce insulin, a reverse haemolytic plaque assay was made.

Animals of group 1 maintained its parameters within the normal ranges. Rats of group 2 presented alterations corresponding to a diabetic state in almost all the parameters measured, none of the animals showed a tendency to improve spontaneously, two of the rats died at 66 and 72 days. The group 3 showed a clinical profile similar to the diabetic control group without improvement, only one rat died at day 33, while in the rats trasplanted with fusion (Group 4) an improvement was observed on some parameters including body weight, water intake and glycemia. Although insulin concentration was lower than the normal range, it was higher than in the Group 3. None rat died.

The reverse haemolytic plaque assay probe the secretory capacity of the hybrid cells.

These results indicate that it is possible to improve the diabetic profile in the recipient animal by the transplant of dermic cells from these animal, fused with insular cells from a healthy donor and that trasplanted cells are capable of secreting insulin.

Keywords: Diabetes mellitus, pancreatic islet cell transplantation, pancreas transplantation, electrofusion, hybrid cells.

1 INTRODUCCIÓN

LA DIABETES MELLITUS

1.1 Definición

La diabetes mellitus (DM) es un grupo de enfermedades metabólicas determinadas genéticamente, que involucran alteraciones de los procesos bioquímicos de los carbohidratos, grasas y proteínas, cuyo factor común es la hiperglucemia, ocasionada por la pérdida parcial o total de la secreción de insulina o falta de acción de ésta. La hiperglucemia crónica ocasionada por la diabetes mellitus provoca a largo plazo daño, disfunción y falla de varios órganos; especialmente ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos [1].

La incidencia de la DM es difícil de determinar por los diferentes criterios diagnósticos y las características socioeconómicas de los pueblos, sin embargo, se piensa que oscila entre el 4 al 10 % (1-2% si la hiperglucemia en ayunas es el criterio diagnóstico) de la población mundial y representa la tercera causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares y oncológicas [2, 3].

El diagnóstico de la DM no es difícil de establecer cuando es sintomática y todos los signos y síntomas son atribuibles a una diuresis osmótica acompañada de hiperglucemia. También el diagnóstico es relativamente sencillo en los pacientes asintomáticos que presentan elevación persistente de la concentración plasmática de glucosa en ayunas. Sin embargo, no es fácil cuando se trata de pacientes asintomáticos con glucemia normal, en los cuales está indicado un

estudio de sobrecarga oral de glucosa y se busca una disminución de la tolerancia a la glucosa [3].

“En la última década se ha incrementado el conocimiento de la etiopatogenia de la enfermedad, empero, de manera incompleta. Hasta ahora se sabe que la diabetes es no sólo la simple elevación de glucosa en sangre, sino un trastorno muy heterogéneo que implica varias anormalidades. Esta heterogeneidad significa que hay diferencias entre grupos de pacientes en cuanto a etiología y patogenia genéticas, ambientales e inmunológicas, así como en la historia natural y en la respuesta al tratamiento. De tal forma, la diabetes no es una simple enfermedad, sino un síndrome que debe enfocarse desde el punto de vista integral”[4]

1.2 Clasificación

Debido a la complejidad en la etiopatogenia de la DM y con el fin de unificar criterios a nivel mundial, el diagnóstico y clasificación ha cambiado significativamente, abandonándose términos como, diabetes química, limitrofe, diabetes juvenil, diabetes del adulto, diabetes insulino dependiente, diabetes no insulino dependiente, diabetes subclínica, etc. La clasificación aceptada por los especialistas en este campo es la del "Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus" [1], en la que es caracterizada de la siguiente manera:

Diabetes Mellitus tipo 1 (destrucción de células, con deficiencia absoluta de insulina). Con dos subclases: A) Provocada por alteraciones inmunológicas y B) Idiopática.

Diabetes Mellitus tipo 2 (Deficiencia relativa de insulina con resistencia a ella en diferentes grados, que puede variar desde una resistencia a la insulina predominante con una deficiencia relativa de ella, hasta un defecto secretorio predominante acompañado de cierta resistencia a la insulina).

Otros tipos específicos (Diabetes debida a defectos genéticos de células y a alteraciones en la acción insulínica, secundaria a otros padecimientos y al uso de fármacos y químicos). Con ocho subclases: A) Defectos genéticos de la función de la célula β . B) Defectos genéticos en la acción de la insulina. C) Enfermedades del páncreas exócrino. D) Endocrinopatías. E) Inducida por fármacos o químicos. F) Infecciones. G) Formas raras de diabetes causada por alteraciones inmunológicas. H) Otros síndromes genéticos algunas veces asociados a la diabetes.

Diabetes Mellitus Gestacional (DMG). Hiperglucemia durante la segunda mitad del embarazo, debida a insuficiencia insulínica temporal.

1.3 Epidemiología

La prevalencia de la diabetes mellitus en todo el mundo ha aumentado dramáticamente en las últimas dos décadas. Se piensa que el número de

individuos con diabetes mellitus continuará aumentando en el futuro cercano. Entre 1976 y 1994, por ejemplo, la prevalencia de la enfermedad en adultos se incrementó de 8.9 a 12.3% en los Estados Unidos. Estos hallazgos, basados en datos epidemiológicos de ese país, incluyen individuos con un diagnóstico confirmado y los no diagnosticados formalmente como diabéticos (con criterios diagnósticos idénticos). La prevalencia de anormalidad en las glucemias en ayunas se incrementó del 6.5% al 9.7% en el mismo período. No obstante que la prevalencia de los tipos de diabetes mellitus 1 y 2 se ha incrementado también en todo el mundo, se espera que la de tipo 2 aumente más rápidamente en el futuro debido al incremento de la obesidad y la reducción de los niveles de actividad.

Existe una considerable variación geográfica en la incidencia para ambos tipos de diabetes (1 y 2). Por ejemplo, Escandinavia tiene el rango más alto de diabetes mellitus tipo 1 (en Finlandia la incidencia es de 35/100,000 por año). El área del Pacífico tiene un rango mucho más bajo (en Japón y China la incidencia es de 1 a 3/100,000 por año). En el norte de Europa y en los Estados Unidos la incidencia es de 8-17/100,000 por año. Mucho del incremento del riesgo para la diabetes tipo 1 se piensa que refleja la frecuencia de alelos HLA de alto riesgo entre los grupos étnicos en diferentes localizaciones geográficas.

La prevalencia de la diabetes tipo 2 y la intolerancia a la glucosa, son mayores en algunas islas del Pacífico y en los países intermedios entre la India y los Estados Unidos y relativamente baja en Rusia y China. Esta variabilidad es probablemente debida tanto a factores de tipo genético como ambientales. Existe también una considerable variación en la prevalencia de la diabetes mellitus entre diferentes poblaciones étnicas en un mismo país.

En 1998, aproximadamente 16 millones de individuos fueron diagnosticados como diabéticos en los Estados Unidos, esto representa aproximadamente el 6% de la población. Alrededor de 800,000 desarrollan la enfermedad cada año, de los cuales, más del 90% fueron diagnosticados como diabéticos tipo 2. El número de casos aumenta con la edad con una incidencia de 1.5% en individuos de 20 a 39 años y una incidencia de 20% para mayores de 75 años. La prevalencia de la diabetes mellitus es dos veces mayor en afroamericanos, hispanoamericanos e indios americanos que en blancos no hispanos. La incidencia de la diabetes mellitus tipo 2 en estos grupos étnicos se incrementa rápidamente y las razones para estas diferencias no están claras [1, 3, 5, 6, 7, 8].

En México la Secretaría de Salud establece que en nuestro país alrededor de 3.6 millones de personas mayores de 20 años padecen DM, con una prevalencia de 7.5% en mayores de 50 años y se ubica como tercer lugar de mortalidad general; México ocupa el primer lugar en América Latina y el séptimo a nivel mundial, con ese tipo de alteración metabólica [2].

La DM tipo 2 la padecen del 90 al 95% de los diabéticos y la DM tipo 1 la padecen del 5 al 10% de los diabéticos. Existen otros padecimientos de origen metabólico que se asocian con la diabetes mellitus y que probablemente se relacionen con resistencia a la insulina; tal es el caso de la hipertensión arterial que se presenta en 23.8% de la población, la obesidad en 21.5%, la microalbuminuria en 11.7%, la hipercolesterolemia en 8.3%, la enfermedad renal en 3.5% y la gota en 3.2% [3].

1.4 Patogenia de la diabetes mellitus tipo 1

Al momento de la manifestación de la diabetes mellitus, la mayor parte de las células β del páncreas se encuentran destruidas; aunque se desconocen bien a bien los detalles, este fenómeno se atribuye a procesos autoinmunitarios. La secuencia de eventos patogénicos se inicia con la presencia de susceptibilidad genética a la enfermedad, el segundo evento es el efecto del factor ambiental para iniciar el proceso en los sujetos susceptibles. Es probable que las infecciones virales sean el factor desencadenante, pero no se excluyen otros agentes no infecciosos. El tercer evento es la respuesta inflamatoria del páncreas (insulinitis), con infiltración de los islotes de Langerhans con monocitos, macrófagos y linfocitos T activados. El cuarto evento es la alteración de la superficie de la célula β , por lo que ya no es reconocida como propia para el sistema inmunitario. El quinto evento es la respuesta inmunitaria con la aparición de anticuerpos citotóxicos. El resultado final es la destrucción de la célula β y la aparición de la diabetes mellitus. En raras ocasiones puede ocurrir sin la intervención de un factor ambiental, es decir que la causa puede ser puramente genética [3].

La diabetes tipo 1 es frecuente en ciertas familias, pero su mecanismo hereditario en términos mendelianos no se conoce bien. Se ha propuesto una transmisión autosómica dominante, recesiva y mixta, pero ninguna de ellas se ha confirmado. Probablemente, la predisposición genética es de tipo permisivo y no causal.

El análisis de árboles genealógicos muestra una prevalencia reducida de transmisión directa vertical. La probabilidad de desarrollo de diabetes tipo 1 en los

familiares de primer grado es únicamente del 5 al 10%. La identidad HLA aumenta el riesgo de diabetes en los hermanos, mientras que la falta de identidad lo reduce. La haploidentidad (cuando se comparte un genotipo HLA) conlleva un riesgo intermedio. La presencia de enfermedad no insulino dependiente en uno de los padres aumenta el riesgo de diabetes insulino dependiente en la descendencia. No se sabe si la mezcla de diabetes tipo 1 y tipo 2 en la misma familia representa un mismo rasgo genético o si coexisten dos tipos de predisposición genética común en ella por azar, influyendo cada uno en la expresión del otro. El riesgo de diabetes es cinco veces mayor cuando el padre padece la enfermedad que cuando la presenta la madre [9].

Dada la estrecha asociación entre diabetes y algunos antígenos leucocitarios humanos codificados por la región de histocompatibilidad mayor del cromosoma 6, uno de los genes de susceptibilidad para la diabetes tipo 1 probablemente reside en este cromosoma. Existe una clara asociación entre los alelos de clase I de la región B (B8 y B15), con la diabetes tipo 1, pero el locus D se considera de mayor importancia. La atención se ha centrado en el locus DQ. Ciertos alelos de la clase II se encuentran asociados a la susceptibilidad para la diabetes mellitus tipo 1, mientras que otros tienen efectos neutros o protectores. Aunque el mecanismo para la predisposición o la protección de los distintos alelos HLA no se conoce, es probable que sea mediante afinidades diferentes a la hora de presentar los péptidos diabetógenos al sistema inmunitario. Aún cuando se ha insistido en la importancia de la región HLA como el lugar de los genes reguladores y el desarrollo de la diabetes tipo 1, es probable que estén implicados también otros genes. Además, se ha informado que ciertas asociaciones HLA

encontradas en niños pueden no actuar cuando la enfermedad se desencadena en la edad adulta [9,10].

Aunque se le ha conferido una importancia definitiva a la carga genética como predisponente para la diabetes tipo 1, existe un factor no genético, cuya influencia tiene una proporción significativa, para ejemplificar esto es necesario remarcar que aún en gemelos monocigóticos, en ocasiones no se manifiesta la enfermedad de igual manera, lo cual revela la importancia de los factores no genéticos (ambientales) en la aparición de la diabetes mellitus. De la misma manera, no se encuentra concordancia ni con la identidad HLA ni la haploididad [3].

Es una idea generalizada que los virus son el factor ambiental más común en la aparición de la diabetes mellitus tipo 1. La asociación de infecciones virales y la enfermedad se observó originalmente con la coincidencia de las variaciones estacionales de las enfermedades de origen viral y la aparente relación con la diabetes mellitus (episodios precedentes de parotiditis, hepatitis, mononucleosis infecciosa, rubéola e infecciones por virus coxsackie). Posteriormente, la evidencia de la producción de diabetes mellitus en ratones susceptibles, infectados con ciertas cepas de virus de encefalomiocarditis reforzó esta sospecha. El aislamiento de virus coxsackie B4 del páncreas de un niño previamente sano que murió de cetoacidosis y la inducción de diabetes en animales de experimentación inoculados por este mismo virus, aumentaron aún más la evidencia del papel que juegan los virus en el desencadenamiento de la enfermedad. Aún más, en estudios realizados en los Estados Unidos, existe una clara relación entre la rubéola congénita y el desarrollo posterior de diabetes

mellitus tipo 1 del 20 %. Los genes de citomegalovirus se han detectado en el genoma de la quinta parte de los pacientes con diabetes mellitus tipo 1 y genes retrovirales han sido encontrados en los componentes de las células β de los ratones NOD. En conclusión, es muy probable que las infecciones virales del páncreas induzcan diabetes por dos mecanismos: alteración inflamatoria directa de los islotes e inducción de la respuesta inmunitaria [3].

Aún con esta evidencia se debe guardar cierta reserva, ya que los estudios serológicos de búsqueda de pruebas de infección viral reciente en pacientes diabéticos no son concluyentes.

Existen algunas sospechas sobre la ingestión de leche de vaca o de productos lácteos en una etapa precoz de la vida, como un factor desencadenante ambiental de la DM 1, ya que la albúmina bovina podría actuar por un mecanismo de mímica molecular. Los sujetos diabéticos presentan anticuerpos a la albúmina bovina, que también se ligan a una proteína de 69 KDa (p69) localizada en la superficie de la célula β del páncreas. Se presume que el anticuerpo destruye a las células β que expresan al péptido p69, el cual no se encuentra de manera universal, pero que puede ser inducido por acción del interferón gamma sintetizado a consecuencia de infecciones virales recurrentes. Tampoco existen pruebas concluyentes al respecto [11].

La observación de que las endocrinopatías de causa inmunitaria se asocian, en general, con una infiltración leucocitaria del tejido afectado, coincide con el hallazgo de linfocitos T activados y macrófagos infiltrados en los islotes pancreáticos de los animales antes o de forma simultánea al desarrollo de la diabetes. Los linfocitos también han sido detectados en los islotes de personas

jóvenes que mueren con diagnóstico reciente de diabetes tipo 1. Sin embargo, no está claro que la insulinitis preceda a la secuencia destructiva de la diabetes autoinmunitaria.

Dado que el sistema inmune habitualmente no ataca a los tejidos "propios", resulta correcto definir a la diabetes tipo 1 como una enfermedad autoinmune. La enfermedad se asocia con frecuencia a otras endocrinopatías autoinmunitarias, como la insuficiencia suprarrenal y la tiroiditis de Hashimoto y se ha observado que el uso precoz de la ciclosporina disminuye los síntomas de forma temporal.

Se desconoce el mecanismo de activación del sistema inmune, sin embargo, parece ser preciso un factor desencadenante ambiental (virus, toxina, alimento). El agente podría actuar de tres maneras diferentes:

a) La destrucción directa de las células β por un virus o una toxina podría exponer antígenos crípticos, lo cual induciría una respuesta inmunitaria. Aún más, un déficit relativo de los componentes iniciales del complemento podría retardar la eliminación de los virus de las células de los islotes (fenómeno parecido a la infección persistente por virus en la hepatitis B), lo cual prolongaría la estimulación del sistema inmune por el antígeno críptico. Otra posibilidad es que el agente pudiera formar un neoantígeno al asociarse a componentes normales de la membrana o moléculas HLA,

b) La posibilidad de la formación de un antígeno por mímica molecular por homología accidental entre un antígeno extraño y una cadena pequeña de aminoácidos de un tejido normal (efecto similar a la fiebre reumática).

c) La posibilidad de que la infección viral, mediante la liberación de citocinas, induzca la aparición de moléculas de la región HLA-D en el páncreas (donde no suelen estar presentes), lo que podría transformar a uno o más tipos celulares en células presentadoras de antígeno [11].

Aunque se plantea la necesidad de un "disparador" en la diabetes mellitus tipo 1, es posible que algunos casos sean puramente genéticos si se recuerda que durante la etapa neonatal se destruyen normalmente en el timo células T autorreactivas (reducción clonal). Las células que escapan a este proceso se transforman en anérgicas o suprimidas en la sangre por las células T reguladoras. Una falla en cualquiera de estos procesos dejaría un grupo de células capaces de reaccionar frente a antígenos "propios" tras la lesión celular.

La diabetes mellitus tipo 1 con frecuencia tiene un inicio brusco con hiperglucemia sintomática, sin embargo, actualmente se piensa que en la mayoría de los casos se produce una pérdida progresiva de la reserva de insulina a lo largo de años. El primer signo de anormalidad es el desarrollo de anticuerpos contra las células β de los islotes en un momento en el que existe normoglucemia y tolerancia normal a la glucosa, también la respuesta insulínica a la sobrecarga es normal. A continuación, aparece una disminución de la tolerancia a la glucosa, pero la glucemia en ayunas permanece normal. En el siguiente estadio, la glucemia en ayunas se encuentra alta, pero sin cetosis, aún cuando no esté controlada la diabetes. El cuadro clínico es aparentemente el de una diabetes tipo 2. Con el paso del tiempo se establece la dependencia a la insulina y a veces la cetoacidosis, sobre todo en casos de estrés [11].



La destrucción de las células β ocurre por mecanismos probablemente humorales o celulares. Los anticuerpos contra las células β inicialmente fueron clasificados como citoplasmáticos y de superficie (fijadores de complemento), sin embargo en la actualidad se conocen varios antígenos específicos: insulina, proinsulina, dos tipos de descarboxilasa del ácido glutámico (GAD 65 y GAD 67), carboxipeptidasa H, dos antígenos de los gangliósidos (GT3 y GM2-1). Se han establecido también anticuerpos como ICA 69 (un anticuerpo que reacciona con el péptido p69 de la albúmina bovina) y anticuerpos anti GLUT2.

Las células β son atacadas por una serie de células citolíticas, como los linfocitos T citotóxicos (CD8) y los macrófagos. El proceso final de la destrucción de la célula β se debe a la liberación de citocinas como la interleucina 1 (IL1) y el factor de necrosis tumoral α (FNT α) por los macrófagos activados.

Cuando se presenta el cuadro diabético franco, la mayoría de las células productoras de insulina han desaparecido y la masa de células endocrinas del páncreas ha disminuido de 1395 a 413 mg y los 850 mg de células β han disminuido hasta no ser posible cuantificarlas [11].

1.5 Patogenia de la diabetes mellitus tipo 2

Siendo la diabetes mellitus tipo 2 una enfermedad de conocida transmisión familiar, el mecanismo de herencia de ésta permanece desconocido, la manera en que se transmite no sigue reglas muy claras; quizá la forma más conocida desde este aspecto sea aquella que en las clasificaciones anteriores se conoce como diabetes juvenil de inicio en la madurez (DJIM), la cual se caracteriza por hiperglucemia leve en personas jóvenes resistentes a la cetosis y

cuyo comportamiento hereditario la coloca como un rasgo autosómico dominante. Los estudios genéticos han demostrado una asociación entre este tipo de diabetes y mutaciones en el gen de la glucoquinasa (brazo corto del cromosoma 7).

En la diabetes mellitus tipo 2 se ha encontrado con frecuencia la presencia de polimorfismo en el gen de la glucógeno sintetasa, pero se desconoce su trascendencia, ya que la síntesis del glucógeno está alterada en la diabetes mellitus tipo 2 [12].

Respecto al HLA no se ha encontrado relación alguna con la diabetes tipo 2 y no se considera en general que los mecanismos autoinmunitarios tengan mucha relación con ella. Aunque se ha tratado de obtener alguna información con la búsqueda de mutaciones en moléculas candidatas como GLUT 2 y GLUT 4 (transportadores de glucosa en páncreas e hígado y en músculo y grasa respectivamente), así como el receptor de la insulina y el péptido amiloidogénico (amilina), dichas mutaciones no han sido demostradas [13].

Aún cuando su naturaleza no es clara, la influencia genética presentada es notoria: la tasa de concordancia en gemelos monocigóticos con diabetes tipo 2 es cercana al 100%, comparativamente con la diabetes tipo 1, el riesgo para la descendencia y los hermanos del diabético tipo 2 es mayor. Aproximadamente cuatro de cada diez hermanos y la tercera parte de la descendencia terminan presentando intolerancia a la glucosa o diabetes clínica.

Es común encontrar en los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 la participación de dos defectos fisiológicos: Anomalías en la secreción de insulina y resistencia a la acción de ésta en los tejidos blanco. Aunque no se conoce cual de las dos alteraciones es el proceso primario, es probable que ambos procesos

sigan una secuencia de aparición en tres fases: La primera implica la normoglucemia a pesar de una resistencia a la insulina que puede ser demostrada por medio del laboratorio, esta normoglucemia se conserva debido a que la concentración plasmática de insulina se encuentra elevada. En la segunda fase la resistencia a la insulina tiende a aumentar, de manera que a pesar de la elevación de la concentración de insulina, la intolerancia a la glucosa se hace manifiesta como hiperglucemia postprandial. En la tercera fase, la resistencia a la insulina no se agrava, pero se reduce la secreción de la hormona, lo cual provoca hiperglucemia en ayuno y diabetes franca. La mayoría de los autores considera que la resistencia a la insulina es el evento primario y la hiperinsulinemia secundaria, como consecuencia de la tendencia de compensación a la resistencia. Sin embargo, es posible que la hipersecreción de insulina (¿y de amilina?) por su parte ocasione resistencia a la insulina, es decir, un trastorno primario de las células de los islotes ocasiona hipersecreción de insulina y ésta, por su parte, conduce a la resistencia a la insulina [14, 15].

Existen otras hipótesis, entre las cuales se relaciona la síntesis de grasas en el hígado, estimulada por la insulina, con el transporte de grasas (a través de las lipoproteínas de baja densidad), lo que conduce a acumulación de las grasas en el músculo. La oxidación aumentada de las grasas alteraría la captación de glucosa y la síntesis de glucógeno. La alteración tardía de la liberación de insulina podría deberse a los efectos tóxicos de la glucosa sobre los islotes o ser consecuencia de un trastorno genético subyacente. La mayoría de los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 son obesos y la propia obesidad ocasiona resistencia a la insulina, sin embargo, los parientes no obesos de estos pacientes pueden

presentar hiperinsulinemia y reducción de la sensibilidad a la insulina, lo cual podría hacer pensar que la obesidad no es una causa única de diabetes mellitus tipo 2, aunque si puede influir en su comportamiento, ya que una pequeña reducción en el peso de estos pacientes suele causar una mejoría notable en el control de la glucemia [16].

En la diabetes mellitus tipo 2 la masa de células β se conserva intacta a diferencia con la diabetes tipo 1. La población de células α aumenta, elevándose la relación entre ambas estirpes celulares, lo que explica el exceso relativo de glucagón con respecto a la insulina que caracteriza a la diabetes tipo 2 y que constituye un rasgo característico de todos los estados hiperglucémicos.

En un tiempo se consideró que la resistencia a la insulina en la diabetes tipo 2 se asociaba principalmente a la disminución de los receptores a la insulina, sin embargo actualmente se piensa que la resistencia es de tipo post-receptor. Desde hace tiempo se han descrito depósitos de sustancia amiloide en el páncreas de los pacientes con diabetes tipo 2. Este material, formado por un péptido de 37 aminoácidos se denomina amilina. Esta sustancia se almacena normalmente dentro de los gránulos secretores y se libera en respuesta a los estímulos secretagogos de insulina. Al parecer, la amilina induce resistencia insulínica a los animales. Su depósito en los islotes puede ser consecuencia de hiperproducción secundaria a la resistencia insulínica, a la que contribuye. Por otra parte, ya que la amilina induce aparentemente la resistencia a la insulina, la acumulación de amilina en los islotes facilita el fracaso tardío de la producción de insulina en la diabetes tipo 2 de larga evolución. No se ha establecido el papel fisiológico de la amilina [17].

Independientemente del mecanismo de resistencia a la insulina, sus consecuencias fisiológicas son claras. No existe una alteración importante en la captación de la glucosa por la célula, ni en su metabolismo oxidativo a CO₂, H₂O y lactato. Más bien el bloqueo metabólico principal se produce en la síntesis de glucógeno [12, 14].

Existe una forma rara de diabetes mellitus tipo 2 que evoluciona con pocos síntomas, secundaria a la producción de una insulina anómala que no se une adecuadamente a los receptores de insulina. Estos pacientes responden de manera normal a la insulina exógena [18].

1.6 Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas son variables según el paciente. En general los enfermos acuden al médico por síntomas debidos a la hiperglucemia (poliuria, polidipsia y polifagia), aunque algunas veces el cuadro se presenta repentinamente con una descompensación metabólica o coma diabético. En ocasiones la primera manifestación es consecuencia de una complicación como la neuropatía sin una hiperglucemia manifiesta. Las alteraciones son secundarias al déficit relativo o absoluto de la insulina o su acción y al exceso relativo o absoluto de glucagón. Una alteración de la respuesta biológica a cualquiera de las dos hormonas provocaría el mismo efecto. Por lo tanto la resistencia insulínica produce los efectos metabólicos que cabe esperar del aumento del cociente glucagón:insulina, Típicamente las manifestaciones clínicas de la DM1 y la DM2 son diferentes:

DM1. Suele comenzar antes de los 40 años en promedio alrededor de los 14 años. El inicio suele ser brusco, con poliuria, polidipsia, polifagia y pérdida de peso que se desarrolla a lo largo de varios días. La insulina plasmática está disminuida o ausente, los niveles de glucagón pueden ser elevados pero disminuibles por la administración de insulina [1, 3, 4].

DM2. Se inicia en edades avanzadas o intermedias, generalmente el paciente es obeso y los síntomas se presentan gradualmente, el diagnóstico suele hacerse al descubrir una elevación de la glucosa plasmática en algún estudio indicado por otra razón. Los niveles plasmáticos de insulina son normales o elevados, si bien menores que los esperados por la hiperglucemia, ello refleja el defecto secretor de la insulina. No suele presentarse cetoacidosis, la razón no es conocida (probablemente por la resistencia del hígado al glucagón), sin embargo las descompensaciones suelen evolucionar hacia un síndrome de coma no cetósico hiperosmolar [1, 3, 4].

1.7 Tratamiento

Dieta: La ingesta calórica debe calcularse de acuerdo al peso corporal ideal. Las recomendaciones calóricas para el adulto con actividad física media se reducen con la edad y oscilan entre 42 Kcal/Kg en los varones de 18 años hasta las 33 Kcal/Kg en las mujeres de 75 años. En general se aconseja una ingesta menor a la recomendada: 36 Kcal/Kg en los varones y 34 Kcal/Kg en las mujeres [19].

La demanda de proteínas mínima para una buena nutrición es aproximadamente de 0.9 g/Kg de peso por día. El contenido de carbohidratos es

del 40 al 60% de la ingesta energética total, suplementando con grasa para cubrir el nivel energético deseado, subrayando la importancia de las grasas poliinsaturadas como medida antiaterogénica. La sacarosa no se autoriza habitualmente, aunque hay informes acerca de la poca influencia que tiene la ingesta moderada de sacarosa en la hiperglucemia postprandial. La administración de una dieta con un 50% de grasa (33% de monoinsaturados) y 35 % de carbohidratos reduce los niveles de glucemia, las necesidades de insulina y la concentración de lipoproteínas de muy baja densidad, mientras que aumenta las de alta densidad. La distribución de las calorías es también importante en los diabéticos insulino dependientes para evitar la hipoglucemia. En principio, se puede administrar un 20% del total de las calorías con el desayuno, un 35% con la comida, un 30% con la cena y un 15% antes de acostarse. La distribución puede variar según las costumbres [20].

El método tradicional del tratamiento dietético ha sido cuestionado como consecuencia de los experimentos realizados determinando la respuesta de la glucemia a los alimentos ingeridos. Actualmente se sabe que las sustancias intercambiables no son necesariamente equivalentes, es decir, los alimentos con la misma composición de grasas, hidratos de carbono y proteínas y peso similar determinan un aumento post-prandial diferente de la glucosa plasmática. El término índice glucémico se acuñó para poder definir estas diferencias. El índice glucémico se calcula midiendo la concentración plasmática media de glucosa durante 2 ó 3 horas después de la ingestión de una comida de prueba y comparando esta respuesta con un alimento de referencia de composición conocida. Este método, que en principio resulta atractivo, no se ha podido aplicar

a la población diabética en general. Uno de los principales problemas del índice glucémico es que no puede aplicarse a una comida mixta normal, aunque haya sido determinado para un alimento concreto [20].

En los pacientes insulino dependientes, sobre todo aquellos con tratamientos insulínicos intensivos, la composición de la dieta no tiene una importancia vital, ya que la insulina se puede ajustar para cubrir las variaciones de la dieta alimentaria. Sin embargo, en los pacientes no insulino dependientes que no reciben insulina exógena, se necesita un seguimiento más riguroso de una determinada dieta, ya que la reserva endógena de insulina es limitada. Estos paciente no son capaces de responder a un aumento de la demanda producida por una ingestión excesiva de calorías o de hidratos de carbono de absorción rápida [19, 20].

Insulina: La insulina es necesaria para el tratamiento de todos los pacientes con DM tipo 1 y de muchos con enfermedad no insulino dependiente. Todos los pacientes con DM tipo 2 que no responden a la dieta deben ser tratados con esta hormona, si el médico no emplea hipoglucemiantes orales. Los síntomas de la diabetes se controlan bastante bien con insulina, pero es difícil mantener los niveles normales de glucemia a lo largo de 24 h, incluso con inyecciones múltiples de insulina rápida o con bombas de infusión. El mantenimiento de una glucemia normal es aún más difícil con el tratamiento insulínico convencional basado en la aplicación de una o dos inyecciones al día.

No existe un único modelo de administración de insulina y los planes de tratamiento varían de un médico a otro y en un mismo médico para cada paciente. Existen tres tipos de modalidades terapéuticas: convencional, inyecciones

subcutáneas múltiples (ISM) e infusión subcutánea continua de insulina (ISCI) [21].

El tratamiento insulínico convencional consiste en la administración de una o dos inyecciones al día de insulina de acción intermedia, del tipo de la insulina con cinc (insulina lenta) o insulina con isofano (insulina NPH) con o sin la adición de pequeñas cantidades de insulina regular. En general se administran 15 a 20 unidades al día en adultos de peso normal (la producción diaria estimada de insulina de los sujetos no diabéticos de peso normal es aproximadamente de 25 unidades al día). En los pacientes obesos se suele administrar 25 a 30 unidades al día, por la resistencia insulínica. Cuando es necesario deben hacerse ajustes, pero estos no deben ser mayores de 5 a 10 unidades de una sola vez. Probablemente, la administración de una sola inyección de insulina permite un control adecuado de los pacientes con cierta capacidad residual de secreción de insulina. En cambio, los pacientes mal controlados deben recibir un tratamiento repartido en dos dosis, suministrando aproximadamente dos terceras partes de la insulina total antes del desayuno y el resto antes de la cena. Muchos médicos añaden de forma sistemática insulina regular en la dosis de insulina intermedia, incluso en el momento de iniciar el tratamiento. La mayoría de los pacientes que reciben dos inyecciones de insulina al día también son tratados con una mezcla de insulina intermedia y regular (25 unidades de NPH más 10 unidades de insulina regular antes del desayuno y 10 unidades de NPH más 5 unidades de insulina regular antes de la cena). La insulina comercial premezclada (70/30 intermedia/cristalina) resulta aceptable y adecuada para muchos pacientes. Es

necesario que todos los pacientes aprendan a reducir la dosis de insulina cuando se realiza una actividad o un ejercicio intenso adicionales (5 a 10 u.) [21].

Inyecciones subcutáneas múltiples (ISM): La técnica de inyecciones subcutáneas múltiples de insulina suele consistir en la administración de insulina de efecto intermedio o prolongado por la noche en dosis únicas, junto con insulina regular antes de cada comida. En estos pacientes, cuyo objetivo es la normalización de la glucosa plasmática, es necesario el autocontrol a domicilio de la glucemia, los ajustes de la dosis dependen de la respuesta de la glucosa plasmática. Se han utilizado diversos protocolos, en los que se representan las escalas de dosificación de insulina en función de la glucosa plasmática.

El régimen ISM es eficaz para el control de la glucosa plasmática y sus resultados son similares a los del ISCI, según algunos estudios. La infusión subcutánea continua de insulina consiste en la administración de insulina por vía subcutánea en la pared abdominal con una pequeña bomba, cargada con una batería, a través de una aguja de tipo mariposa de 27G. El sistema ISCI permite liberar la insulina con un ritmo basal continuo a lo largo del día y aumentar la infusión de forma programada antes de cada comida. El ajuste de la dosis depende de los valores de glucosa capilar determinados de forma similar a lo expuesto para el ISM. En general, aproximadamente el 40 % de la dosis diaria total se administra de forma basal y el resto a modo de emboladas preprandiales. Sin ninguna duda, el ISCI mejora el control diabético con respecto al tratamiento convencional.

La mayoría de los pacientes experimentan una sensación de bienestar a medida que mejora el control. El peligro de hipoglucemia es real, sobre todo por la

noche, en los pacientes que mantienen una glucosa plasmática por debajo de 5.5 mmol/L (100 mg/dL). Un descenso de la glucosa plasmática de 2.7 mmol/L (50 mg/dL) no tiene importancia si la cifra inicial es de 8.3 mmol/L (150 mg/dL), pero puede resultar de consecuencias mortales si se parte de una cifra de 3.3 mmol/L (60 mg/dL). De hecho se han producido varias muertes por hipoglucemia en los usuarios de las bombas. También existe un aumento de frecuencia de cetoacidosis diabética en las personas que utilizan ISCI. Sólo se deben prescribir bombas en pacientes disciplinados y motivados que son controlados por un médico con experiencia amplia en su uso. En algunos centros, los catéteres de la bomba de infusión se han colocado por vía intravenosa y no subcutánea. En principio, aunque no se han observado problemas, esta vía no debe recomendarse de modo habitual. Las bombas de insulina intraabdominales con un reservorio, que se rellena desde el exterior, se han probado en protocolos experimentales y, de momento, no aportan ninguna ventaja aparente, excepto por el hecho de que no se transporta el aparato externamente. La administración de insulina mediante insuflación nasal, aunque inicialmente resulta atractiva, no ha demostrado su utilidad y ya no se encuentra disponible ningún preparado comercial de este tipo [19, 20, 21].

Agentes antidiabéticos orales. La DM tipo 2 que no se controla con dieta suele responder a las sulfonilureas. Estos fármacos son fáciles de utilizar y no plantean en principio problemas.

Las sulfonilureas actúan fundamentalmente estimulando la liberación de insulina de la célula beta. Estos fármacos aumentan también el número de receptores de insulina en los tejidos efectores y la utilización de glucosa

estimulada por la insulina, de forma independiente al incremento de la unión de la insulina, aunque todos estos efectos carecen de significación fisiológica. Los niveles medios de insulina plasmática no se elevan después del tratamiento con las sulfonilureas, a pesar de la mejoría significativa de la concentración media de la glucosa plasmática.

El efecto inicial de estos fármacos consiste en aumentar la liberación de insulina y reducir la glucosa plasmática. Sin embargo, a medida que disminuye la glucosa plasmática, también lo hacen los niveles de insulina, puesto que la glucosa constituye el estímulo principal para la liberación de insulina; de esta forma se enmascara el estímulo inicial de la liberación insulínica. Este efecto insulinógeno se desenmascara nuevamente, elevando la glucosa hasta las concentraciones previas. Las sulfonilureas no son eficaces en la DM tipo 2, en la que se reduce la masa de células beta, lo que confirma que el efecto pancreático de estos fármacos es el efecto primario, y que los mecanismos extrapancreáticos desempeñan un papel de segundo orden [22, 23].

Los fármacos nuevos como la glipicida y la gliburida son eficaces en dosis más pequeñas, pero, por lo demás, no se diferencian apenas de los agentes utilizados desde hace tiempo como la clorpropamida y la tolbutamida. La tolbutamida o la tolazamida se deben utilizar en los pacientes con enfermedad renal significativa, ya que se metabolizan e inactivan únicamente en el hígado. La clorpropamida sensibiliza el túbulo renal al efecto de la hormona antidiurética y, por tanto, resulta útil en algunos pacientes con diabetes insípida parcial, aunque produce retención hídrica en los pacientes con diabetes mellitus. La hipoglucemia es menos frecuente con los medicamentos antidiabéticos orales que con la

insulina, pero cuando aparece suele ser grave y prolongada. De hecho, es necesario administrar infusiones masivas de glucosa durante varios días después de la última dosis de sulfonilurea en algunos pacientes. Por este motivo, todo paciente con hipoglucemia inducida por sulfonilureas debe ingresar en el hospital [22, 23, 24].

Las biguanidas como la fenformina son agentes orales utilizados fuera de Estados Unidos. La fenformina se retiró del mercado por orden de la Food and Drug Administration como consecuencia de su posible asociación con acidosis láctica. Se considera que las biguanidas reducen la glucemia mediante inhibición de la gluconeogénesis, aunque también pueden aumentar la actividad o el número de receptores de insulina. No se deben administrar biguanidas a los pacientes con nefropatías y el tratamiento se debe interrumpir en presencia de náuseas, vómitos, diarrea o cualquier enfermedad intercurrente [22, 23, 25, 26].

Los derivados tiazolidínicos (tiazolidinedionas), son otro grupo de agentes orales para el tratamiento de la DM tipo 2. La pioglitazona, que es el prototipo de este grupo, reduce la glucemia, los ácidos grasos libres y los triglicéridos y reduce también la resistencia a la insulina, quizá mediante un incremento en la actividad cinasa del receptor de insulina [27].

Actualmente se están investigando dos péptidos naturales como tratamiento coadyuvante de la DM tipo 2. El factor de crecimiento insulinoide 1 (IGF-1, somatomedina) y el péptido de tipo glucagón 1 (GLP-I, del inglés, glucagon like peptide 1), un péptido derivado de la molécula de proglucagón, reducen la glucemia en sujetos normales y en pacientes diabéticos. Las amidas (7-36) y

(7-37) del GLP-I son las principales insulintropinas en desarrollo. Todavía no se ha establecido su verdadera utilidad [27].

El cálculo de la concentración media de la glucosa es muy sencillo en los pacientes que efectúan mediciones frecuentes de la glucosa en sangre para ajustar las dosis de insulina. En los demás pacientes, se suele medir la hemoglobina A1c para evaluar el control a largo plazo y comprobar la precisión de las autodeterminaciones. La hemoglobina A1c, es uno de los componentes de la hemoglobina (de movimiento electroforético rápido), que está presente en las personas normales y aumenta en presencia de hiperglucemia. La mayor movilidad electroforética se debe a la glucosilación no enzimática de los aminoácidos valina y lisina.

La glucosa en su configuración lineal (aldehído) se condensa con un grupo amino libre para formar una base de Schiff (aldimina o pre-A1c). La base de Schiff sufre una reorganización para formar la hemoglobina A1c, que es una cetoamina. El porcentaje de hemoglobina glicada, si se determina correctamente, ofrece una estimación del control diabético de los tres meses anteriores. Los valores normales dependen de cada laboratorio, aunque, por término medio, los sujetos no diabéticos presentan un valor de Hb A1c del 6 % aproximadamente y los niveles de los pacientes mal controlados oscilan entre el 10 y 12 %. La medición de la hemoglobina glicada constituye un método objetivo de valoración del control metabólico [28, 29].

1.8 Complicaciones agudas.

Además de la hipoglucemia, los diabéticos son susceptibles a dos complicaciones diabéticas agudas principales: cetoacidosis diabética y coma hiperosmolar no cetósico. La primera es una complicación de la DM tipo 1 y la segunda suele ocurrir en la DM tipo 2. La cetoacidosis se desarrolla rara vez, si acaso, en la DM tipo 2 verdadera [30].

Cetoacidosis diabética. Para que ocurra la cetoacidosis diabética es necesaria la combinación de un déficit de insulina y un aumento relativo o absoluto de la concentración de glucagón. Este estado suele producirse al suspender la insulina, o como consecuencia del estrés físico (por ejemplo, infección, cirugía) o emocional, a pesar de mantener el tratamiento insulínico. En el primer caso, la concentración de glucagón aumenta de forma secundaria a la desaparición de la insulina, mientras que el estímulo operativo durante el estrés para la liberación de glucagón es probablemente la liberación de adrenalina. La adrenalina, aparte de estimular la secreción de glucagón, bloquea probablemente la liberación de la pequeña cantidad de insulina residual de algunos pacientes con DM tipo 1 e inhibe el transporte de glucosa inducido por la insulina en los tejidos periféricos. Estos cambios hormonales poseen múltiples efectos, pero hay dos de ellos que resultan esenciales: 1) La gluconeogénesis se eleva al máximo y la utilización periférica de la glucosa se reduce, apareciendo una hiperglucemia grave. El glucagón facilita la gluconeogénesis, ya que induce un descenso de fructosa-2,6-bifosfato, producto intermedio que estimula la glucólisis por activación de la fosfofructocinasa y bloquea la gluconeogénesis por inhibición de la fructosa-bifosfatasa. El descenso

de la concentración de fructosa-2,6-bifosfato inhibe la glucólisis y potencia la gluconeogénesis. La hiperglucemia resultante origina una diuresis osmótica que produce reducción de volumen y deshidratación, características de la cetoacidosis.

2) Se activa el proceso cetógeno y se inicia el desarrollo de la acidosis metabólica.

Para que ocurra la cetosis, es necesario que se produzcan cambios en el tejido graso y en el hígado. Los ácidos grasos libres de los depósitos de grasa constituyen el sustrato primario de la formación de cuerpos cetónicos, mientras que los niveles plasmáticos de ácidos grasos libres deben elevarse para que se desarrolle la cetogénesis. Sin embargo, los ácidos grasos que se liberan en el hígado se reesterifican y se almacenan únicamente en forma de triglicéridos hepáticos o se convierten en lipoproteínas de muy baja densidad que regresan de nuevo a la circulación, a menos que se active la maquinaria oxidativa hepática de los ácidos grasos. La liberación de ácidos grasos libres es directamente estimulada por el déficit de insulina, pero la aceleración de la oxidación hepática de los ácidos grasos se induce fundamentalmente por el glucagón mediante su efecto sobre el sistema de carnitina palmitoiltransferasa, grupo de enzimas responsables del transporte de los ácidos grasos a las mitocondrias. Cuando los ácidos grasos de cadena larga alcanzan el hígado, se esterifican primero con la coenzima A (CoA). La acil-CoA grasa no puede atravesar la membrana mitocondrial hasta que se esterifica con la carnitina. La carnitina palmitoiltransferasa I transesterifica la acil-CoA grasa hacia acilcarnitina grasa, que atraviesa la membrana mitocondrial interna a través de la translocasa. Esta reacción se invierte internamente por efecto de la carnitina-palmitoiltransferasa II. La carnitina-palmitoiltransferasa I se encuentra inactiva en estado postprandial, por

lo que los ácidos grasos de cadena larga no alcanzan las enzimas de la beta oxidación para la producción de cuerpos cetónicos. Sin embargo, este sistema se activa durante el ayuno y en la diabetes mal controlada, en cuyo caso la tasa de cetogénesis representa una función de primer orden de la concentración de ácidos grasos que llegan hasta la transferasa I.

Clínicamente, la cetoacidosis se inicia por anorexia, náuseas y vómitos, junto con un aumento de la diuresis. A veces, hay dolor abdominal. Si no se trata la cetoacidosis, se desarrolla una alteración de la conciencia e incluso coma. La exploración física inicial suele revelar una respiración de Kussmaul con signos de reducción de volumen. En raras ocasiones, la reducción de volumen produce colapso vascular e insuficiencia renal. La temperatura corporal es normal o disminuye por debajo de lo normal en la cetoacidosis no complicada: por eso, la fiebre sugiere una infección. La leucocitosis, a menudo muy marcada, representa una característica de la acidosis diabética y no indica necesariamente infección [30].

Coma hiperosmolar. El coma diabético hiperosmolar no cetósico suele ser una complicación de la DM tipo 2. Se trata de un síndrome de deshidratación profunda provocado por la diuresis hiperglucémica mantenida en condiciones en las que el paciente no es capaz de beber suficiente agua para afrontar las pérdidas de líquido por la orina. Habitualmente, los ancianos diabéticos, que viven solos o en residencias geriátricas, presentan un ictus o una infección, que empeora la hiperglucemia e impide una ingestión adecuada de agua. El síndrome pleno probablemente no se manifiesta hasta que la reducción de volumen es lo suficientemente grave como para reducir la diuresis. El coma hiperosmolar

también aparece tras maniobras terapéuticas como la diálisis peritoneal o la hemodiálisis, la alimentación por sonda con fórmulas ricas en proteínas, la venoclisis de sobrecargas intensas de hidratos de carbono o el empleo de fármacos osmóticos como el manitol y la urea. La difenilhidantoína, los esteroides, los agentes inmunosupresores y los diuréticos pueden desencadenar el trastorno.

La ausencia de cetoacidosis es un hecho fisiopatológico relevante. Cuando se desarrolla la cetoacidosis, el paciente acude al médico por presentar náuseas, vómitos y hambre, antes de que aparezca una deshidratación extrema. Este mecanismo protector no opera en la diabetes de comienzo del adulto, resistente a la cetoacidosis. Clínicamente, estos pacientes presentan hiperglucemia extrema, hiperosmolaridad y reducción de volumen, junto con signos dependientes del sistema nervioso central que oscilan desde disminución del nivel de conciencia hasta coma. No es raro que aparezcan convulsiones, a veces de tipo jacksoniano, ni tampoco hemiplejia transitoria. Las infecciones, sobre todo la neumonía y la sepsis por gramnegativos, son frecuentes e indican un pronóstico desfavorable [30].

1.9 Complicaciones tardías

Algunos enfermos no presentan nunca estos problemas y otros muestran un comienzo precoz de los síntomas, aunque en general éstos se desarrollan a los 15 a 20 años de la manifestación de la hiperglucemia. A veces, un determinado enfermo sufre varias complicaciones simultáneas, y en otros casos, sólo predomina una de ellas.

Alteraciones circulatorias. La aterosclerosis se produce de forma más extensa y precoz que en la población general. No se conoce la causa de la aterosclerosis acelerada, aunque, como se expone más adelante, podría influir la glicación no enzimática de las lipoproteínas. La lesión aterosclerótica parece desencadenarse por acción de lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDL del inglés - Low Density Lipoproteins) con una reacción en cascada complicada, mediada por el receptor acetil-LDL o «basurero». Tanto las lipoproteínas de alta densidad (HDL del inglés High Density Lipoproteins) como los antioxidantes presentan capacidad para alterar la oxidación de las LDL, de manera que ejercen una acción antiaterogénica. En los animales de experimentación la diabetes acelera el proceso oxidativo. Aunque las lipoproteínas se encuentran generalmente en cifras normales, las concentraciones de HDL tienden a reducirse mientras que las de LDL son superiores a lo normal o elevadas. Una relación LDL/HDL elevada favorece la aterogénesis y el transporte inverso de colesterol desde las lesiones ya establecidas se altera en presencia de concentraciones bajas de HDL. Las concentraciones de lipoproteína(s) se elevan en la DM tipo 1 pero no en la DM tipo 2.

Otros factores discutidos son el aumento de la adherencia plaquetaria como consecuencia de un aumento de la síntesis de tromboxano A2 y la disminución de la síntesis de prostaciclina. Se ha informado que la hiperglucemia aumenta la secreción de endotelina-1 *in vitro* y que la síntesis de óxido nítrico se encuentra disminuida en la aorta de las ratas diabéticas y en la microvascularización coronaria de los seres humanos. Estos hallazgos no se han confirmado en la diabetes humana. La endotelina es un vasoconstrictor potente con acción

mitógena sobre el músculo liso vascular, mientras que el óxido nítrico es un vasodilatador que con acción antimitógena sobre el músculo liso vascular, que inhibe la agregación plaquetaria [31, 32, 33].

Retinopatía. La retinopatía diabética es una causa fundamental de ceguera, aunque la mayoría de los diabéticos no se quedan ciegos. Las lesiones de retinopatía se clasifican en dos grandes categorías: simple (de base) y proliferativa. El signo más precoz de la retinopatía consiste en un aumento de la permeabilidad capilar, que se pone de manifiesto por el escape de colorante hacia el humor vítreo tras la inyección de fluoresceína. Posteriormente, tiene lugar la oclusión de los capilares de la retina y la formación de aneurismas saculares y fusiformes. También, se observan cortocircuitos arteriovenosos. Las lesiones vasculares se acompañan de la proliferación de las células de revestimiento endotelial y la pérdida de los pericitos que rodean y apoyan estos vasos. La frecuencia de la retinopatía diabética varía, al parecer, con la edad de comienzo y la duración de la enfermedad. Aproximadamente el 85 % de los pacientes acaba presentando esta complicación, aunque algunos no llegan nunca a presentar lesiones, ni siquiera después de 30 años de enfermedad [34, 35].

Nefropatía diabética. La enfermedad renal es una causa fundamental de muerte e incapacidad en la diabetes. Aproximadamente la mitad de las enfermedades renales en fase terminal de EE. UU. se deben a nefropatía diabética. Alrededor del 35 % de los pacientes con DM tipo 1 presentan esta complicación. Algunas familias con varios miembros diabéticos muestran una baja frecuencia de enfermedad renal, mientras que en otras más del 80 % de los

afectados presentan un riesgo elevado de nefropatía. Esta complicación de la diabetes permanece silente durante mucho tiempo (10 a 15 años).

La nefropatía diabética se manifiesta por dos patrones patológicos característicos que pueden o no coexistir: difuso y nodular; en ambos se observa una hialinización de las arteriolas aferentes y eferentes, «gotas» en la cápsula de Bowman, capuchones de fibrina y oclusión de los glomérulos. La albúmina y otras proteínas se depositan en los glomérulos y túbulos renales [36, 37].

Neuropatía diabética. La neuropatía diabética puede afectar a cualquier parte del sistema nervioso, con excepción posiblemente del encéfalo. Esta complicación rara vez es causa directa de mortalidad, pero constituye una causa importante de morbilidad. Se conocen diversos síndromes, que pueden presentarse de forma simultánea en el mismo paciente. El patrón más habitual es el de la polineuropatía periférica. Los síntomas, generalmente bilaterales, consisten en acorchamiento, parestesias, hiperestesias intensas y dolor. El dolor, que suele ser profundo e intenso, empeora por la noche y a veces es de tipo lancinante o urente, similar al de la tabes dorsal (pseudotabes). Por fortuna, los síndromes dolorosos suelen remitir espontáneamente y duran desde unos meses hasta algunos años. La afectación de las fibras propioceptivas determina anomalías de la marcha y aparición de las articulaciones típicas de Charcot, sobre todo en los pies. La mononeuropatía es menos frecuente que la polineuropatía. De forma típica, se produce una caída de la mano, del pie, o parálisis de los pares craneales III, IV o VI. También se ha descrito la afectación de otros nervios, como el laríngeo recurrente. La mononeuropatía se manifiesta por un alto grado de reversibilidad espontánea, generalmente a lo largo de varias semanas. La

radiculopatía es un síndrome sensitivo en el que el dolor aparece en la distribución de uno o varios nervios raquídeos, generalmente de la pared torácica o del abdomen. El dolor intenso simula un herpes zoster o un abdomen quirúrgico agudo. Esta lesión, al igual que la mononeuropatía, suele remitir espontáneamente. La neuropatía autónoma se presenta de diversas formas. El aparato gastrointestinal es uno de los más afectados, y aparece disfunción esofágica con dificultades para la deglución, retraso del vaciamiento gástrico, estreñimiento o diarrea. La diarrea suele ser nocturna. La incompetencia del esfínter anal interno puede simular una diarrea diabética. También se ha descrito paro cardiorrespiratorio y muerte súbita, atribuidas a neuropatía autónoma. La disfunción o parálisis vesical resulta particularmente molesta para el paciente y suele obligar a la colocación de una sonda permanente. La disfunción eréctil y la eyaculación retrógrada constituyen otras manifestaciones adicionales en el hombre. La disfunción eréctil se asocia con un fallo en la síntesis de óxido nítrico en la vascularización del pene [38].

Úlceras en el pie del diabético. Uno de los problemas especiales que plantean los pacientes diabéticos es el desarrollo de úlceras en los pies y extremidades inferiores. Estas úlceras se deben, en principio, a una distribución anormal de la presión como consecuencia de la neuropatía diabética. Este problema se agrava cuando se produce una distorsión ósea del pie; la formación de callo suele ser la anomalía inicial. Otras veces, la úlcera comienza al llevar zapatos mal ajustados, que producen ampollas en los pacientes con deficiencias sensitivas que impiden el reconocimiento del dolor. Las heridas y punciones con cuerpos extraños del tipo de agujas, clavos y vidrios son frecuentes y no es raro

encontrar este tipo de cuerpos extraños en las partes blandas de los pacientes que no son conscientes del dolor. La enfermedad vascular, con disminución de la perfusión sanguínea, contribuye al desarrollo de la lesión, que con frecuencia se infecta por varios microorganismos. No se conoce ningún tratamiento específico de las úlceras diabéticas, pero el tratamiento de soporte suele evitar la amputación de la extremidad [39].

La causa de las complicaciones diabéticas se desconoce y probablemente es multifactorial. Se ha sugerido que la vía del poliol, por la cual la glucosa se reduce a sorbitol a través de la enzima aldosa-reductasa, desempeña un papel de primer orden. El sorbitol, que funciona en principio como una toxina tisular, ha sido implicado en la patogenia de la retinopatía, la neuropatía, las cataratas, la nefropatía y la enfermedad aórtica. El mecanismo de acción se conoce sobre todo en la neuropatía diabética experimental, en la que la acumulación de sorbitol se asocia a una disminución del contenido de mioinositol, anomalías del metabolismo de los fosfoinosítidos y reducción de la actividad Na^+ , K^+ -ATPasa. La preponderancia de la vía del poliol en el inicio de la neuropatía experimental se demostró al comprobar que la inhibición de la aldol-reductasa impedía el descenso del contenido tisular de mioinositol y la disminución de la actividad de la ATPasa. La inhibición de la aldol-reductasa evita las cataratas y la retinopatía experimentales. Así pues, es probable que la neuropatía y la retinopatía dependan fundamentalmente de la activación de la vía poliólica, que, a su vez, podría intervenir en la nefropatía diabética [3].

La glicación proteica es el segundo mecanismo patogénico que hay que considerar (actualmente, se emplea el término glicación para la adición no

enzimática de las hexosas a las proteínas y el de glucosilación para la adición enzimática). El efecto de la glicación sobre la hemoglobina ya se ha comentado, aunque son numerosas las proteínas del organismo que se alteran de forma similar, modificando su función. Algunos ejemplos son la albúmina plasmática, las proteínas del cristalino, la colágena, las lipoproteínas y el sistema de reconocimiento glucoproteico de las células endoteliales hepáticas. El efecto de la glicación sobre las lipoproteínas es muy interesante. Las LDL glicadas no son reconocidas por el receptor normal de LDL, con lo que aumenta su vida media plasmática. Por el contrario, las HDL glicadas sufren un recambio más rápido que las HDL nativas. Se ha sugerido que la colágena glicada atrapa las LDL a una velocidad dos a tres veces superior a la de la colágena normal [40].

Aunque la glicación no enzimática de las proteínas resulta atractiva para explicar las complicaciones degenerativas, los datos son menos concluyentes que con la vía de poliol. El enlace entre la vía poliólica y la secuencia de glicación tiene lugar a través de la glicación de la colágena y otras proteínas por la fructosa generada a partir del sorbitol. El índice de glicación de la fructosa es siete u ocho veces mayor que el de la glucosa.

Las proteínas glicadas también forman productos finales de glicación avanzada (AGE; del inglés Advanced Glycation End products) mediante una serie de reacciones bioquímicas poco conocidas. Los receptores para los AGE se encuentran en macrófagos y células endoteliales. La unión de los AGE a los receptores puede inducir la liberación de citocinas, endotelina-I y factor tisular. Este último desempeña un papel destacado en el inicio de la coagulación. Experimentalmente, la síntesis de los AGE puede resultar alterada o bloqueada

por la aminoguanidina, un agente usado actualmente en los ensayos clínicos en seres humanos [40].

El aumento del flujo sanguíneo renal, se ha propuesto como elemento iniciador de las complicaciones diabéticas, probablemente por aumento de la filtración glomerular de las macromoléculas que actúan como toxinas tisulares. Existen pruebas que apoyan la importancia de la hiperfusión en la nefropatía diabética, pero la hipótesis hemodinámica no resulta tan atractiva como las dos citadas anteriormente.

La evidencia clínica apoya la idea de que el ambiente metabólico *per se* influye u ocasiona complicaciones, con independencia de los factores genéticos. Por ejemplo, los riñones de donantes que no padecen diabetes ni tienen antecedentes familiares de dicha enfermedad acaban presentando las lesiones características de la nefropatía diabética entre 3 y 5 años después de ser trasplantados a un receptor diabético. Por otra parte, no se observó nefropatía diabética en un paciente diabético, cuya enfermedad se corrigió mediante trasplante pancreático antes del trasplante renal. También se ha descrito una normalización de las lesiones de nefropatía diabética al trasplantar este tipo de riñones a receptores normales. Todos estos hallazgos sugieren que la hiperglucemia o los trastornos metabólicos de la diabetes causan o influyen en el desarrollo de las complicaciones. No hay que olvidar que otros factores, probablemente genéticos, también contribuyen en gran medida, como se deduce del hecho de que algunos pacientes diabéticos con control muy deficiente a lo largo de varios decenios no llegan nunca a sufrir las complicaciones tardías, en

tanto que otras veces se detectan complicaciones diabéticas típicas en pacientes recién diagnosticados o que no padecen hiperglucemia.

Se ha descrito que el control meticuloso con bombas de infusión de insulina reduce la microalbuminuria, mejora la velocidad de conducción de los nervios motores, reduce las lipoproteínas plasmáticas y disminuye el escape capilar de fluoresceína de la retina. Al parecer, también disminuye la anchura de la membrana basal capilar del músculo esquelético. En general, estos cambios son de escasa magnitud y significación biológica dudosa. Así, no existe ninguna prueba definitiva de que las complicaciones tardías puedan evitarse o se corrijan tras la casi normalización prolongada de la glucosa plasmática. De hecho, se ha descrito la progresión de la retinopatía a pesar de la desaparición de la diabetes tras el trasplante pancreático. La progresión de las complicaciones de la diabetes tras alcanzar cifras de glucemia normales o casi normales recibe el nombre de memoria hiperglucémica. Algunos investigadores proponen que el mecanismo causal es la síntesis de productos finales de glicación avanzada durante la fase de hiperglucemia, que tiene carácter irreversible, por lo que mantiene su efecto a largo plazo.

1.10 Resistencia a la insulina

La resistencia insulínica se define de manera arbitraria en los pacientes diabéticos como la necesidad de 200 o más unidades de insulina al día para controlar la hiperglucemia y evitar la cetosis. La resistencia insulínica relativa ocurre prácticamente en todas las personas con diabetes, cuando se analiza cuidadosamente por medio de la técnica del clamp de glucosa. La resistencia es

consecuencia del déficit casi completo de insulina en la DM tipo 1, mientras que en la DM tipo 2 el problema principal radica en la obesidad.

El metabolismo anabólico normal, mediado por la insulina, requiere la secreción de cantidades adecuadas de la hormona en respuesta a las comidas. La insulina se une a un receptor específico de los tejidos efectores. El receptor de insulina es una glucoproteína tetramérica formada por dos subunidades alfa y dos subunidades beta unidas por puentes disulfuro. La subunidad beta es una tirosín-cinasa, que se activa tras la unión de la insulina a la subunidad e inicia una serie de fosforilaciones intracelulares que median las diversas acciones de la insulina. La única acción que se comprende de forma razonable es el transporte de glucosa. La glucosa entra en la célula mediante un proceso de difusión facilitada, utilizando las moléculas «transportadoras de glucosa». Algunas de estas moléculas se encuentran en la membrana citoplásmica, aunque la unión de la insulina al receptor inicia una movilización rápida de los depósitos intracelulares del sistema de transporte hacia la membrana citoplásmica y activa al mismo tiempo las unidades que se encuentran en la membrana. Al parecer, el número de transportadores almacenados es deficiente en la diabetes mal controlada.

La resistencia insulínica se caracteriza como un defecto prerreceptor (insulinas anómalas o anticuerpos antiinsulina), receptor (disminución del número de receptores o de la unión de la insulina) o post-receptor (anomalía de la transmisión de las señales, sobre todo fracaso de activación del receptor tirosín-cinasa). A veces existe una combinación de los defectos señalados. Aunque el origen del defecto molecular se conoce en algunos síndromes de resistencia insulínica, todavía no se ha identificado en muchos de ellos.

El problema de los diabéticos con resistencia insulínica severa (> 200 unidades de insulina al día) suele ser una resistencia de tipo prerreceptor producida por anticuerpos antiinsulina. Los anticuerpos antiinsulina de tipo IgG aparecen prácticamente en todos los diabéticos a los 60 días de iniciar el tratamiento insulínico. El motivo por el que el título de anticuerpos fluctúa no se conoce bien. Por otra parte, no existe una correlación entre el título de anticuerpos y la resistencia funcional, pero la unión de la insulina por los niveles elevados de anticuerpos se considera el mecanismo primario de la mayoría de estos casos. Probablemente, menos del 0.1 % de los diabéticos tratados con insulina muestran una resistencia significativa. Este problema suele aparecer en las primeras semanas del tratamiento o muchos años después. En ocasiones, el comienzo es brusco con cetoacidosis, pero en general suele ser gradual, y se manifiesta por hiperglucemia incontrolable. Aproximadamente el 20 a 30 % de los pacientes presentan alergia concomitante a la insulina. El tratamiento de este síndrome requiere la administración de grandes cantidades de prednisona (80 a 100 mg/día). La resistencia insulínica aparece en otras enfermedades diferentes de la diabetes. La acantosis nigricans constituye un signo físico de resistencia a la insulina. La obesidad es la causa más frecuente de resistencia a la insulina y se asocia con una disminución del número de receptores, aunque el problema principal es un defecto postreceptor, por la aparente falta de activación de la tirosín cinasa. El síndrome de Werner es una enfermedad autosómica recesiva con una alta incidencia de hiperglucemia, a pesar de la elevación de la concentración plasmática de insulina. La lipodistrofia generalizada o parcial es un síndrome de reducción de grasa que se diferencia fundamentalmente por el grado

de atrofia del tejido adiposo, el término diabetes lipoatrófica es sinónimo de lipodistrofia total. Todos estos pacientes muestran una elevación de los niveles plasmáticos de insulina. La resistencia obedece a una disminución del número de receptores, a una reducción de la afinidad del receptor por la insulina, o a un defecto post-receptor.

La alergia a la insulina está mediada por anticuerpos IgE contra la insulina. Sus manifestaciones comprenden reacciones inmediatas con escozor o picor local, reacciones locales tardías con tumefacción indurada que dura hasta 30 horas y urticaria generalizada o anafilaxia franca. Las reacciones sistémicas suelen aparecer en pacientes que suspenden el tratamiento insulínico y que por un motivo u otro lo reinician más adelante. La reacción alérgica puede ocurrir incluso con la segunda inyección, después de reanudar el tratamiento. Las reacciones leves se tratan con antihistamínicos. Si el problema es grave, se procede a un tratamiento desensibilizante.

1.11 Tratamientos experimentales.

El trasplante del páncreas, en su totalidad o de forma segmentaria, ha curado la diabetes de algunos pacientes, aunque suele realizarse únicamente cuando se precisa el trasplante renal. Sin embargo, se realizan algunos trasplantes aislados. Sin duda alguna, un trasplante realizado con éxito es capaz de normalizar la glucemia [41]. Si se trasplanta simultáneamente el riñón, es necesario un tratamiento inmunosupresor y el páncreas resulta protegido. La duda está en si el mejor control obtenido merece correr el riesgo de inmunosupresión, cuando se trasplanta sólo el páncreas. Este tema no se ha tratado en ensayos

clínicos. También se ha intentado el trasplante aislado de células de los islotes (en contraste al del páncreas completo), pero los resultados han sido poco alentadores. Se está estudiando la posibilidad de usar células no pancreáticas elaboradas mediante ingeniería genética para sintetizar insulina humana bajo control de la glucemia [42].

La prevención de la diabetes autoinmunitaria mediante agentes inmunosupresores es una meta deseable. En los seres humanos con DM tipo 1 de inicio reciente se ha logrado corregir la hiperglucemia sin necesidad de insulina mediante fármacos potentes como la ciclosporina. Sin embargo, la resolución no es permanente. La mayoría de los médicos piensa que el tratamiento profiláctico con ciclosporina y agentes inmunosupresores potentes similares como el FK506 no ofrece garantías; es decir, los peligros potenciales son demasiado grandes. Se están realizando ensayos preventivos que usan la insulina como profilaxis en sujetos con probabilidad de padecer diabetes en un futuro inmediato, basándose en la presencia de anticuerpos frente a las células de los islotes y respuesta disminuida de insulina tras una sobrecarga de glucosa intravenosa. Se ha informado de resultados positivos aislados. Otros ensayos estudian el efecto de la nicotinamida como posible agente protector y reparador. La nicotinamida ha resultado eficaz en algunos tipos de diabetes experimental en animales [43, 44].

2 ANTECEDENTES

LA FUSIÓN CELULAR

La hibridación celular somática es una técnica, que ha sido introducida de manera relativamente reciente, pero que ha probado ser un procedimiento experimental extremadamente poderoso, con aplicaciones en biología celular, genética, biología del desarrollo, oncología, virología, etc.

Básicamente la técnica implica la fusión espontánea o inducida de diferentes células para obtener una célula híbrida.

La fusión celular requiere fundamentalmente de varios pasos:

- a) dielectroforesis: aunque algunos investigadores reportan la fusión celular en fragmentos de tejido, en cultivos en placa, en órganos y aún en embriones, esto no es lo común, ya que la mayoría de los trabajos se reportan en células en suspensión, con el fin de que el acercamiento (dielectroforesis) sea más controlado.
- b) Fusión: se requiere la perturbación del ambiente membranal, lo que se logra mediante diferentes métodos, con el fin de lograr que las membranas lipídicas interactúen permitiendo el contacto íntimo y la mezcla de los lípidos constituyentes de la membrana.
- c) Estabilización: una vez que las membranas se han fusionado, debe mantenerse al híbrido en reposo bajo condiciones lo más controladas posible para que la membrana recupere sus características fisicoquímicas y sus funciones.

2.1 La célula híbrida

Una gran variedad de células de animales, humanos y aún insectos y plantas de todos tipos, ha sido usada como células paternas en estas fusiones.

Cuando células de diferentes organismos son fusionadas (por ejemplo: ratón + humano, gallina + rata, mosquito + humano), se producen células híbridas interespecíficas. En estos casos, las células progenitoras difieren respecto al genotipo y al fenotipo.

Híbridos intraespecíficos pueden ser obtenidos fusionando 2 diferentes tipos celulares de la misma especie (ej. Fibroblastos de ratón + linfoblastos de ratón). En este caso las células progenitoras difieren en fenotipo, esto es, en propiedades morfológicas, bioquímicas, inmunológicas o funcionales.

La fusión celular espontánea ocurre de manera frecuente durante la embriogénesis, sin embargo, es poco común bajo condiciones de cultivo en el laboratorio y sólo ocasionalmente en organismos vivos que tienen tejidos diferenciados.

Los actuales procedimientos estándar de laboratorio para inducir híbridos celulares involucran la adición de virus Sendai inactivos a cultivos que contienen dos diferentes tipos de células o la electrofusión. Usando estos procedimientos, dos grupos de células multinucleadas (policariontes) son producidas. El primer grupo contiene núcleos de un solo progenitor (homocariontes), mientras que el segundo grupo contiene núcleos de ambos tipos progenitores (heterocariontes). Sólo los últimos son células híbridas.

Un heterocarionte una vez formado, tiene dos alternativas: a) después de un periodo de tiempo en cultivo como policarionte puede morir, b) puede sobrevivir y dar lugar a dos células híbridas mononucleadas, llamadas sincariontes. Este último término no es usado comúnmente en la literatura del campo. En cambio, la expresión "célula híbrida" se ha hecho más o menos sinónimo con la condición sincarionte. De hecho debe recordarse que los heterocariontes son de hecho también células híbridas.

Individualmente los heterocariontes pueden ser sujetos a análisis por métodos citoquímicos e inmunocitoquímicos aplicables a células aisladas. Para algunos análisis de bioquímica y otras propiedades, se hace necesario preparar grandes cantidades de células híbridas. En pocas ocasiones, poblaciones puras de células híbridas pueden ser obtenidas debido a que algunos híbridos proliferan más rápidamente que sus progenitores y por lo tanto las superan. En muchos casos la población de células híbridas crece lentamente y tiende en cambio a ser superada por los progenitores. Bajo estas circunstancias, poblaciones homogéneas de sincariontes pueden ser aisladas de una manera selectiva o no selectiva.

El aislamiento no selectivo involucra la separación mecánica de los híbridos dejando las otras células aparte. Estas células ya aisladas se dejan proliferar y cada una produce una clona; una dificultad es que en la mayoría de los experimentos las células representan tal minoría, que no siempre es fácil aislarlas y aún después de aisladas puede fallar su proliferación por varios motivos, por lo tanto, en estos casos se puede requerir el aislamiento de gran número de híbridos para obtener unas pocas clonas. Por otro lado, el aislamiento

selectivo involucra el cultivo de células mezcladas en un medio en el cual sólo las células híbridas se multipliquen y cuando sólo quedan estas últimas, entonces se clonan con el fin de asegurar la pureza del cultivo híbrido.

Armados con estas técnicas, los científicos han encontrado que la habilidad para hacer y aislar células híbridas abre nuevos caminos para el análisis de la regulación génica en células eucarióticas. Estos estudios, sin duda, permiten la comprensión de los mecanismos que gobiernan el crecimiento y la diferenciación celular durante el desarrollo embrionario, la curación de enfermedades y el desarrollo de tumores entre otros fenómenos.

2.2 Métodos de hibridación

Los primeros antecedentes de observación de las células híbridas se remontan a las primeras décadas del siglo XIX, con los hallazgos de Johannes Müller , los cuales fueron realizados en estudios histológicos de condiciones patológicas en los que la “policariocitosis” era el denominador común en enfermedades como la varicela, viruela, tuberculosis y rubéola. La existencia de estos policariontes dio origen a la pregunta de si la causa de ellos era la múltiple cariocinesis sin citocinesis o de la fusión de células mononucleadas preexistentes. W. H. Lewis uno de los pioneros en el cultivo de células reportó en 1927 que ambos mecanismos eran observables *in vitro* [45].

A pesar de estos hallazgos iniciales en el siglo XIX, las células híbridas somáticas en cultivo, fueron descubiertas hasta los 1960's con los estudios de Barski sobre la formación espontánea de híbridos celulares por fusión [46].

En 1962 Okada demostró que los virus Sendai inactivados con luz ultravioleta causaban fusión celular *in vitro* generando homocariontes [47]. Harris y Watkins, e independientemente Okada y Murayama 3 años después, produjeron los primeros heterocariontes interespecíficos usando virus Sendai inactivados [48, 49]. En 1970 Lucy presentó resultados de fusión celular realizada con lisolecitina [50]. Para 1971 los métodos de fusión diseñados por Graham [51] usando virus Sendai inactivados fueron progresivamente remplazados con tratamientos menos tóxicos utilizando polietilenglicol (PEG) (52, 53), un fusógeno químico, el cual, fue previamente probado exitosamente fusionando protoplastos vegetales por Kao y Michayluk en 1974 [54] y para la producción de híbridos somáticos por Pontecorvo en 1975 [55]. Más recientemente, la fusión celular ha sido usada progresivamente para transferir núcleos en ovocitos de mamífero en especial con su aplicación en la clonación de mamíferos [56, 57, 58, 59]. En estudios más recientes, los protocolos de fusión han sido remplazados con la más fácil y reproducible electrofusión.

La fusión eléctrica es un paso esencial en algunos de los más innovadores métodos en la biología moderna, tales como la producción de anticuerpos monoclonales, clonación de mamíferos y vacuna contra el cáncer. El proceso fue descubierto en 1978 por Zimmerman [60], quién lo ha desarrollado desde entonces.

2.3 La electrofusión

Inicialmente las células son aproximadas hasta alcanzar un contacto muy cercano, esto puede lograrse por diferentes medios: a) manipulación mecánica,

b) tratamientos químicos o biológicos y c) dielectroforesis. A diferencia de la electroforesis, en la cual la corriente directa es aplicada para generar un campo eléctrico, con el fin de mover moléculas, la dielectroforesis usa corriente alterna de alta frecuencia. En partículas tales como las células vivas, al ser expuestas al campo eléctrico, las cargas positivas y negativas de la superficie celular se mueven en direcciones opuestas, provocando que la célula adquiera un carácter dipolar. Estos dipolos inducidos pueden hacer que las células se atraigan unas a otras, alineándose de tal modo, que parecen un collar de perlas.

A diferencia de la electroforesis, en la cual la partícula cargada se mueve en una dirección determinada en el campo eléctrico, la dielectroforesis ocurre independientemente de la dirección del campo. Los campos eléctricos generados por corriente alterna tienen una ventaja adicional, a diferencia de los campos de corriente directa; la polarización de los electrodos es impedida. Más aún, el problema de la electrohidrólisis puede ser evitado fácilmente.

Se aplica entonces un pulso corto de corriente directa de muy alto voltaje, el cual provoca la permeación de la membrana celular y la subsiguiente combinación de las membranas. Las células entonces se fusionan. Con el fin de estabilizar el proceso, se aplica corriente alterna por un pequeño periodo de tiempo [61].

La conformación resultante es denominada heterocarionte debido, no obstante que las membranas externas se han fusionado, a que dos o más núcleos están presentes en el interior. Los núcleos también se fusionan en un momento dado dentro de la célula, que a la larga dará una reducción del número de cromosomas en el núcleo.



La electrofusión ha sido determinante en muchos procedimientos experimentales en la actualidad. Köhler y Milstein han revolucionado la producción de anticuerpos monoclonales con la aplicación de la electrofusión [62], con este procedimiento se fusionan linfocitos B, con células tumorales, los numerosos productos de la fusión son aislados y seleccionados, posteriormente se replican como clonas formando hibridomas que secretan un anticuerpo específico y se pueden replicar casi indefinidamente.

En 1997 Wilmut y Schnieke [63] dieron origen al famoso caso de Dolly, la oveja clonada, cuya realización no hubiera sido posible sin la fusión celular. La técnica consiste en remover el núcleo de un ovocito y fusionar este ovocito enucleado con una célula somática, por ejemplo, de tejido conectivo. Esto fue logrado por medio de la electrofusión debido a que es el único método eficiente para producir el resultado deseado. El producto de la fusión es implantado en una madre "subrogada" que lo portará durante el periodo de gestación.

La "vacuna contra el cáncer" es quizá la aplicación más reciente e innovadora de la electrofusión, en este proceso, propuesto por Kugler [64], las células tumorales de un paciente son fusionadas con células presentadoras de antígeno del sistema inmune, su función es activar a las células T, las cuales actúan entonces contra las células tumorales. Los productos de la fusión mencionada son irradiados, las células sobreviven pero no pueden dividirse, el paciente es inyectado con estas células híbridas presentadoras de antígeno y de este modo, las células T del paciente son activadas. Estas células T atacan a las metástasis y en muchos casos causan su desintegración, reducción o inactivación.

Este método ha sido probado recientemente en pacientes por primera vez y los resultados iniciales son extremadamente prometedores.

Los trabajos con células β pancreáticas se ha realizado escasamente y con fines de electroporación, sin embargo, se ha realizado la electrofusión de células β con líneas celulares tumorales para estudios de función desde la década pasada. Entre los estudios más destacables están los de Hamid y McClenaghan [65] sobre las propiedades secretorias de las líneas híbridas obtenidas. El mismo grupo ha estudiado el cultivo de dichas líneas en diferentes medios de cultivo, su comportamiento y sus características bioquímicas y fisiológicas [66]. Rasschaert y McClenaghan [67] han reportado las características metabólicas de la línea BRIN-BD 11 obtenida por electrofusión. En 2001 Davies y Abdel-Wahab presentaron los resultados del comportamiento secretor de dicha línea celular después de implantarla 28 días en ratones diabéticos y haciendo el seguimiento de las propiedades de almacenamiento y secreción de insulina en éstas células al resembrarlas; encontrando que la línea celular mejora sustancialmente el almacenamiento y la secreción después de haber permanecido en el animal 28 días [68].

Las células híbridas proliferan en cultivo con mayor velocidad que sus progenitoras y aparentemente el fenómeno de rechazo se encuentra atenuado o ausente [45, 61]. En trabajos preliminares hemos fusionado y transplantado células de páncreas en conejos obteniendo buenos resultados en el control del cuadro diabético aunque no la regresión total, sin embargo, en ninguno de los casos se presentó rechazo aparente al transplante [69, 70, 71].

3 JUSTIFICACIÓN

La diabetes mellitus es un problema de salud pública y uno de los más importantes en la medicina. El número de pacientes que la padece aumenta año tras año y a la fecha en nuestro país ha alcanzado al 7.5 de la población en general y a 3.6 millones de la población económicamente activa, o sea la población entre los 20 y los 60 años de edad. Las complicaciones características de la enfermedad, entre las que se encuentra a la neuropatía y a la angiopatía diabéticas, llevan a los pacientes a una muerte 10 años anticipada. Actualmente, la diabetes mellitus como causa de muerte se encuentra en tercer lugar después de las enfermedades cardiovasculares y oncológicas.

A la fecha la diabetes mellitus no se cura, sólo se “controla” tratando de normalizar la glucemia y a pesar de los grandes éxitos de la ciencia en el desarrollo de medicamentos hipoglucemiantes, como la insulina humana, las sulfonilureas, las biguanidas, los inhibidores de las α -glucosidasas y las tiazolidinedionas, no ha sido posible alcanzar el control óptimo del nivel de la glucosa sanguínea, que al sobrepasar el límite fisiológico, causa las complicaciones antes mencionadas.

La glucemia no sólo depende de los alimentos ingeridos, sino también del estado general de salud, ánimo, estrés, ejercicio físico, cambios ambientales, entre otros muchos factores, por lo tanto, es imposible lograr el control de la glucemia con una o dos administraciones de sustancias hipoglucemiantes, como se intenta actualmente, sin tomar en cuenta que en el organismo sano, la insulina y las hormonas contrarreguladoras (hiperglucemiantes), se secretan en cantidades

muy específicas y tantas veces como sean necesarias, de acuerdo a cada variación del nivel de la glucosa sanguínea, por pequeña que ésta sea.

El problema de la dosificación de insulina en los pacientes diabéticos, tomando en cuenta el control fisiológico, o sea de retroalimentación negativa, existente en las personas sanas, ha intentado ser resuelto mediante el desarrollo e implante del páncreas artificial y el trasplante total o segmentario de páncreas, de islotes pancreáticos y de células β libres. A la fecha, todavía no ha sido posible equipar al páncreas artificial con un sensor de la glucosa sanguínea confiable, que informe sobre el verdadero nivel de ésta, minuto a minuto, para que se secrete la cantidad requerida de insulina. En tanto que el trasplante de páncreas en sus diferentes variantes: total, segmentario, islotes y aún células β , no ha podido superar el problema de la histocompatibilidad que irremediablemente lleva al rechazo.

El problema de la histocompatibilidad podría ser resuelto con el trasplante de células híbridas, obtenidas mediante la electrofusión de células insulares del páncreas del donador, con células dérmicas del receptor. Las células resultantes al ser fenotípicas y genotípicamente diferentes a las del donador, pueden no ser reconocidas por el sistema inmune del receptor y por consiguiente, no ser rechazadas.

Tomando en cuenta todo lo anterior, es urgente iniciar en animales de laboratorio estudios en esta dirección.

4 HIPÓTESIS

El trasplante de células híbridas, en las cuales ocurre la recombinación genética y la conservación de los marcadores de histocompatibilidad, redundará en la disminución de la reacción de rechazo y les permitirá a dichas células conservar su capacidad productora de insulina y la secreción de ésta en forma natural, tomando en cuenta los controles de regulación y retroalimentación fisiológica.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto del trasplante de células insulares de un animal donador, electrofusionadas con células dérmicas de un animal diabético receptor, sobre el cuadro clínico y parámetros bioquímicos de este último.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar si las células híbridas, producto de la fusión de células insulares de un donador y células dérmicas del receptor son capaces de permanecer, después de ser trasplantadas en este último.

Determinar si las células híbridas trasplantadas conservan la función generadora de insulina.

Determinar si el cuadro clínico producido por la diabetes mellitus puede ser revertido por el trasplante de células híbridas.

Determinar si los principales parámetros bioquímicos alterados en animales con diabetes mellitus inducida, pueden ser normalizados por el trasplante.

Determinar si las células híbridas conservan la función generadora de insulina *in vitro*

6 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 ANIMALES

Se utilizaron ratas Wistar macho proporcionadas por el bioterio de la FES Iztacala UNAM, las cuales fueron separadas en cuatro grupos de cuatro ratas cada uno: Grupo 1. Animales sanos (control sano). Grupo 2. Animales diabetizados sin tratamiento (control diabético). Grupo 3. Ratas diabetizadas receptoras de transplante, con extracción de células dérmicas, las cuales fueron mezcladas con células insulares pancreáticas de un donador sano (transplante sin fusión). Grupo 4. Ratas diabetizadas receptoras de transplante, con extracción de células dérmicas, las cuales fueron electrofusionadas con células pancreáticas insulares de un donador sano (transplante con fusión). A todos los grupos se les estudió inicialmente (tiempo 0), para determinar su estado de salud, observando su cuadro clínico y pruebas de laboratorio. Una vez determinada la ausencia de enfermedad, se indujo diabetes a las ratas de los grupos 2, 3 y 4, aplicando aloxana diluida en solución salina fisiológica (aloxana 150 mg/Kg, i.p.) [72]. Las ratas fueron evaluadas en su cuadro clínico y los parámetros de laboratorio para determinar su estado patológico, corroborando el diagnóstico de diabetes mellitus. Con el fin de eliminar la posibilidad de remisión espontánea de la enfermedad en las ratas diabetizadas, sólo se utilizaron ratas que hubieran presentado un cuadro diabético estable durante una semana, con glucemias arriba de 240 mg/dL. A las ratas receptoras de transplante de cada grupo se les extrajeron células dérmicas, las cuales fueron mezcladas o fusionadas con células insulares pancreáticas obtenidas de ratas donadoras. Las células mezcladas o electrofusionadas fueron

trasplantadas por inyección subdérmica en los grupos 3 y 4 respectivamente (figura 1).

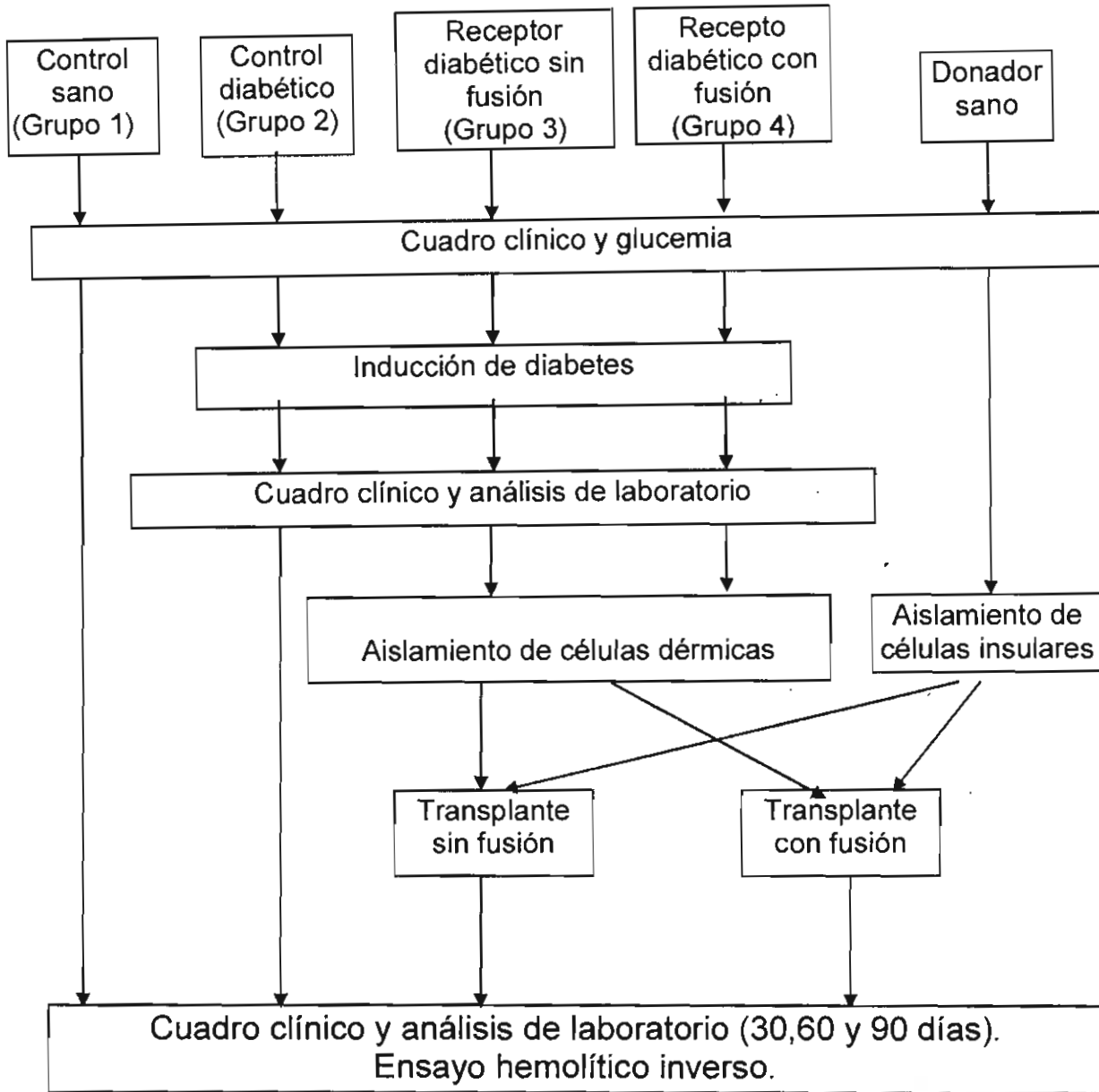


Figura 1. Procedimiento experimental para el transplante de células insulares pancreáticas y dérmicas electrofusionadas en ratas diabéticas (esquema metodológico).

Se analizó el cuadro clínico (estado general, curva ponderal, ingesta de alimento y de agua y diuresis) de los animales en estudio y se determinaron en sangre en ayunas: glucosa, ácido úrico, colesterol, triglicéridos, transaminasa glutámico-oxalacética (TGO), transaminasa glutámico-pirúvica (TGP), urea, creatinina, insulina, hemoglobina glicada (HbA1c). En orina se determinaron: cuerpos cetónicos y glucosa. Todas las determinaciones se realizaron al tiempo 0 (previo a la inducción de diabetes), a los 30, 60 y 90 días del estudio.

Se realizó un ensayo hemolítico inverso, previo marcaje con esferas de látex para diferenciar a ambas estirpes celulares y sus productos, con el fin de demostrar que las células híbridas, obtenidas por la electrofusión de células insulares del páncreas con células dérmicas, son capaces de producir insulina,

6.2 OBTENCIÓN DE CÉLULAS DÉRMICAS

Bajo anestesia con 0.5 mL/Kg vía i.p. de pentobarbital sódico (Anestesal Smith Kline-Becham) a cada rata se les practicó lavado con solución antiséptica y rasurado de la región interescapular; de cada una se extrajo un fragmento de piel en ojal de 3 X 2 cm, separando cuidadosamente el tejido celular subcutáneo. Cada fragmento fue depositado en tripsina al 0.25% a 4°C y mantenido a esa temperatura por 24 h en refrigeración con el fin de que el tejido fuera embebido por la solución enzimática. Se procedió a activar a la enzima a 37°C durante 30 min. Se raspó la cara interna del tejido y las células fueron recogidas en HBSS, lavándolas tres veces. El rendimiento fue determinado en cámara de Neubauer y la viabilidad por exclusión de azul tripano [73].

6.3 OBTENCIÓN DE CÉLULAS INSULARES

La obtención de islotes se realizó por medio de la técnica de Lacy y Kostianovski, modificada por Hiniart [74, 75]. Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico, se practicó incisión abdominal en V desde el hipogastrio hasta el reborde costal, se identificó el conducto hepato-pancreático y se pinzó el duodeno ocluyendo su desembocadura.

A través de este conducto se inyectaron 10 mL de HBSS frío, con el fin de romper el tejido acinar e identificar el páncreas, el cual se disecó cuidadosamente y fue cortado con tijera finamente en fragmentos de 1–2 mm² para ser incluido en una solución de colagenasa tipo IV (Worthington Chem.) en HBSS (3 mg/mL), posteriormente se incubó a 37° C durante 10 min.

Los islotes se purificaron mediante un gradiente discontinuo de albúmina de suero de bovino (Sigma Chem.) en HBSS (10, 23, 28, 40 %) [76] y fueron disgregados en una solución de tripsina (2.5 mg/mL en HBSS) incubándolos a 35 ° C durante 10 min. El rendimiento de la extracción de las células insulares se determinó en cámara de Neubauer y la viabilidad por exclusión de azul tripano.

6.4 ELECTROFUSIÓN

Ambos grupos celulares fueron ajustados a una concentración de 3×10^5 células/mL en amortiguador de PACE. Las células de una y otra estirpe se mezclaron en proporción 1:1 v/v y se depositaron 0.3 mL de esta mezcla en la cámara de electrofusión.

La electrofusión se realizó con equipo construido de acuerdo al diseño de Watt [77] modificado por nuestro grupo de investigación y construido en el Taller de Equipo y Laboratorio para la Enseñanza (TELE) de la UNAM Campus Iztacala.

La dielectroforesis se realizó generando un campo eléctrico con un pulso de corriente alterna (CA) de tipo sinusoidal en el rango de radiofrecuencia (RF) de 0.5 MHz. de 10 V. RMS (generador Farnell, mod. Sgi 0.1-100 MHz) de 20 seg. de duración. La electrofusión se realizó con un pulso de corriente directa (CD) de 300 V de decaimiento exponencial con una duración de 1 mseg. (Fuente de poder TELE 0.0- 50 Amperes; 0-500 V de CD). Permitiendo un periodo posterior de recuperación de 60 seg en las condiciones de dielectroforesis [78]. El rendimiento se determinó en cámara de Neubauer por la cuenta de células en mononucleadas y binucleadas. Las células conteniendo más de dos núcleos fueron consideradas polinucleadas y cada tipo de células fue separada de las otras por medio de un gradiente discontinuo de albúmina sérica de bovino en HBSS conservando solamente las células binucleadas. La viabilidad se determinó por exclusión de azul tripano.

6.5 TRASPLANTE DE CÉLULAS ELECTROFUSIONADAS

Se determinó el estado de salud de los animales, evaluando la glucemia y el cuadro clínico. A las ratas receptoras de cada grupo (grupos 3 y 4) se les indujo diabetes mellitus (aloxana 150 mg./Kg i.p.) [72] y se comprobó su estado diabético con las pruebas mencionadas. Se les extrajo un fragmento de piel para el aislamiento de células dérmicas por tripsinización en frío de acuerdo a la técnica descrita previamente. Estas células fueron mezcladas (grupo 3) o fusionadas

(grupo 4) con células insulares pancreáticas obtenidas de las ratas donadoras por la técnica mencionada anteriormente, cuyo estado de salud también fue diagnosticado por glucemia y cuadro clínico. Las células en ambos casos fueron contadas, se determinó su viabilidad y su concentración fue ajustada a 300,000 cel/mL combinándose las células dérmicas con las células pancreáticas en proporción 1:1 para el trasplante sin fusión (grupo 3). Para el trasplante con fusión (grupo 4), las células ya combinadas fueron electrofusionadas bajo las condiciones mencionadas arriba. Las células en ambos casos fueron depositadas bajo la piel por debajo de la zona interescapular por medio de inyección.

6.6 PARÁMETROS CLÍNICOS Y BIOQUÍMICOS

La sangre para la determinación de los parámetros bioquímicos se obtuvo al inicio, a los 30, 60 y 90 días, previa anestesia superficial con éter, por corte de una uña de la pata trasera. Las ratas de cada uno de los cuatro grupos fueron sometidas a observación durante 90 días para evaluar su evolución clínica.

Clínicos:

Estado general diario. Diuresis, ingesta de alimento e ingesta de agua en 24 h y curva ponderal cada 7 días.

Determinaciones bioquímicas:

En sangre en ayunas:

La glucemia se determinó por el método enzimático glucosa oxidasa - peroxidasa con tiras reactivas Haemo-glukotest en un glucómetro Accutrend sensor (Boehringer Mannheim).

El Acido úrico, colesterol, triglicéridos, TGO, TGP, urea y creatinina fueron determinados con un fotómetro de reflexión Reflotrón (Boehringer Mannheim). La concentración de insulina, fue determinada por el método de Test inmunoenzimático con un sistema fotométrico 5010 (Boehringer Mannheim). La hemoglobina glicada (HbA1c) fue determinada por el método de látex-anticuerpo monoclonal con un aparato Analyzer DCA 2000 (Bayer).

En orina:

Cuerpos cetónicos y glucosa por el método semicuantitativo con tiras reactivas Keto-Diastix (Bayer diagnósticos).

6.7 ENSAYO HEMOLÍTICO INVERSO

Con el fin de identificar a las células híbridas producto de la electrofusión, las células dérmicas y las células insulares obtenidas fueron marcadas por inclusión de microesferas de látex (Sigma Chem.) de 1.0 y 0.5 μm respectivamente, incubándolas en soluciones al 0.1% en medio McCoy (Sigma Chem.) y RPMI 1640 (Sigma Chem.) suplementado con 10% de suero fetal de bovino y antibióticos, a 37°C durante 24 h Posteriormente, para eliminar las microesferas del medio, las células fueron lavadas tres veces con HBSS y se determinó el rendimiento en cámara de Neubauer y la viabilidad por exclusión de azul tripano.

La electrofusión se llevó a cabo bajo las condiciones mencionadas arriba y se procedió con el ensayo hemolítico inverso, el cual, es un técnica desarrollada originalmente para detectar secreción de anticuerpos en linfocitos y posteriormente modificada para adenohipofisis y para insulina.

Mediante este procedimiento, se puede identificar una célula en una población celular mixta por sus secreciones, se basa en la hemólisis mediada por complemento en presencia de complejos antígeno-anticuerpo y se le denomina inverso porque la célula de interés aporta los antígenos.

El fundamento de esta técnica consiste en adherir proteína A (PrA) de *Staphylococcus aureus* a eritrocitos y ligar ésta a anticuerpos antiinsulina. Se incuban en monocapa junto con células productoras de Insulina estimuladas para su secreción y se agrega el complemento. Los complejos antígeno-anticuerpo en las membranas de los eritrocitos que rodean a las células secretoras reacciona con el complemento lisando a los eritrocitos. Alrededor de las células productoras de insulina se forma una inmunoplaaca (eritrocitos fantasmas), lo que permite diferenciarlos de otras estirpes celulares y el tamaño de la placa es proporcional a la cantidad de hormona secretada [79, 80].

Los eritrocitos se obtuvieron de sangre de carnero, centrifugando ésta a 1500 rpm durante 10 minutos. Se extrajo el sobrenadante y las células se lavaron tres veces en solución salina. Después se lavó un mililitro de eritrocitos sedimentándolos a 1250 rpm por diez minutos y resuspendiéndolos en 10 ml de solución salina. Se agregaron 2.5 ml de solución salina normal, 0.5 ml de solución de proteína A (0.5mg/ml de solución salina) y 25 ml de CrCl₂ (0.1 mg/ml en solución salina), ambos con agitación continua. La suspensión se incubó a 30° C durante 1 hora y los eritrocitos A se lavaron dos veces con solución salina y una vez con RPMI 1640.

El ensayo hemolítico inverso se realizó en cámaras de Cunninhgam, donde se adhieren en una monocapa los eritrocitos A y las células híbridas.

La cámara se preparó con dos tiras de cinta engomada por ambos lados, separadas 20 mm, sobre un portaobjetos de vidrio cubierto con poli-L-lisina para la adhesión de las células (0.5mg/ml de Tris al 0.15 molar, pH de 8.4). Sobre las tiras se colocó un cubreobjetos para dejar un volumen de 30 – 50 μ l.

La suspensión de células obtenidas de la electrofusión y la suspensión al 18% de eritrocitos A se mezclaron a volúmenes iguales. La solución obtenida se introdujo por un lado de la cámara y las células se incubaron 45 minutos a 37°C. Posteriormente se lavaron con RPMI 1640 para remover lo no adherido a la monocapa.

Se mezclaron el suero antiinsulina 1:40 en Hank's y el secretagogo (solución de glucosa 16.7 mM) en RPMI 1640. La mezcla se introdujo por un lado de la cámara y se incubó durante una hora. Se lavó nuevamente y se introdujo el complemento de cobayo 1: 40 en Hank's y se incubó por 30 minutos más.

Finalmente la preparación de células obtenida se fijó con glutaraldehído al 8% en solución fisiológica.

6.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron analizados por una prueba de varianza de dos factores (grupo y tiempo). A las variables con significancia estadística se les aplicó una comparación de medias de LSD (Fisher), con el propósito de determinar qué nivel de factor grupo tuvo la mayor significancia ($p < 0.05$) a los 90 días.

7 RESULTADOS.

7.1 PARÁMETROS CLÍNICOS

PESO CORPORAL

El incremento de peso de alrededor de 20% en los animales del grupo control sano y del grupo trasplante con fusión contrasta con la pérdida de peso del 10 % de los grupos control diabético y trasplante sin fusión (Figura 2a).

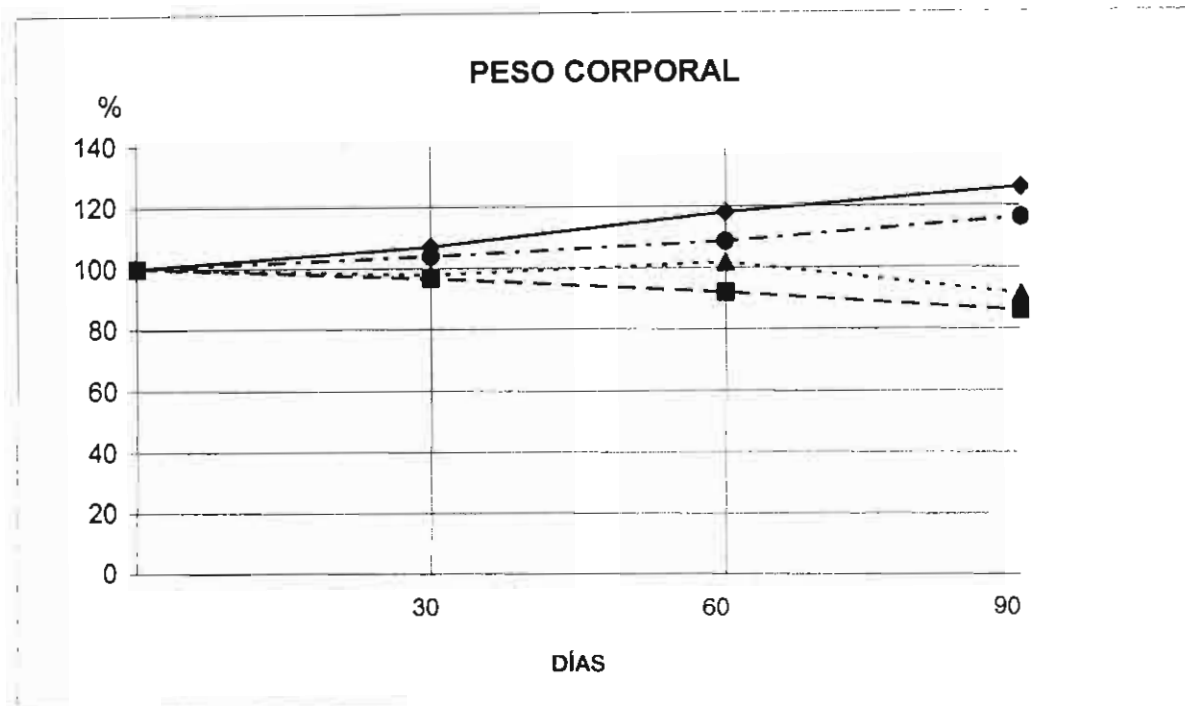


Figura 2a. Parámetros clínicos: Valores de peso corporal a los 0, 30, 60 y 90 días
◆ Control sano, ■ Control diabético, ▲ Trasplante sin fusión, ● Trasplante con fusión.
Cada valor es la media de cuatro determinaciones.

INGESTA DE ALIMENTO

Mientras que en el grupo control sano la ingesta de alimento en 24 h permanece en los 30 g, en los grupos con trasplante así como en el grupo control diabético se aprecia un incremento del 50 % (hasta 45 g) durante el desarrollo del experimento (Figura 2b).

Los grupos control diabético, trasplante sin fusión y trasplante con fusión fueron estadísticamente similares ($p > 0.05$), y diferentes al grupo control sano a los 90 días.

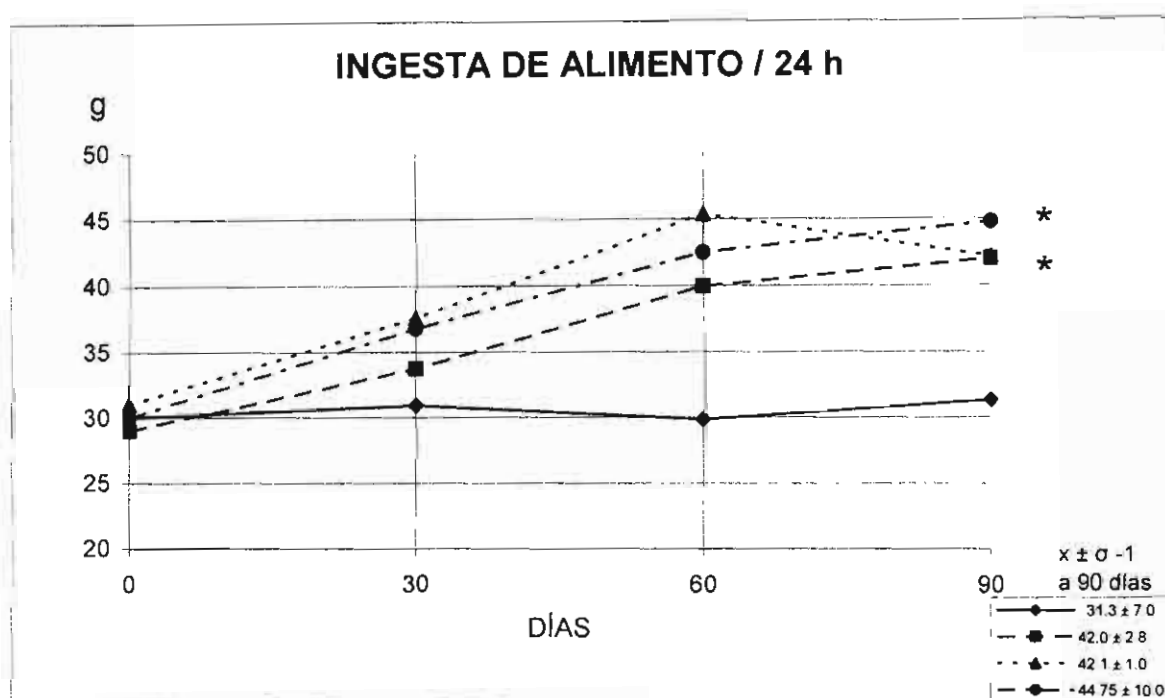


Figura 2b. Parámetros clínicos: Ingesta de alimento durante 24 h valores registrados a los 0, 30, 60 y 90 días.

◆ Control sano, ■ Control diabético, ▲ Trasplante sin fusión, ● Trasplante con fusión.

Cada valor es la media de cuatro determinaciones.

* Diferentes al control sano $p < 0.05$

INGESTA DE AGUA

Se observó una polidipsia muy marcada en los dos grupos trasplantados (Figura 2c), pero se aprecia claramente la tendencia de descenso en ambos, mientras que en el grupo control diabético aumenta a lo largo del ensayo.

El volumen mayor en promedio fue para el control diabético, siendo estadísticamente diferente ($P < 0.05$) en relación a los grupos trasplantados.

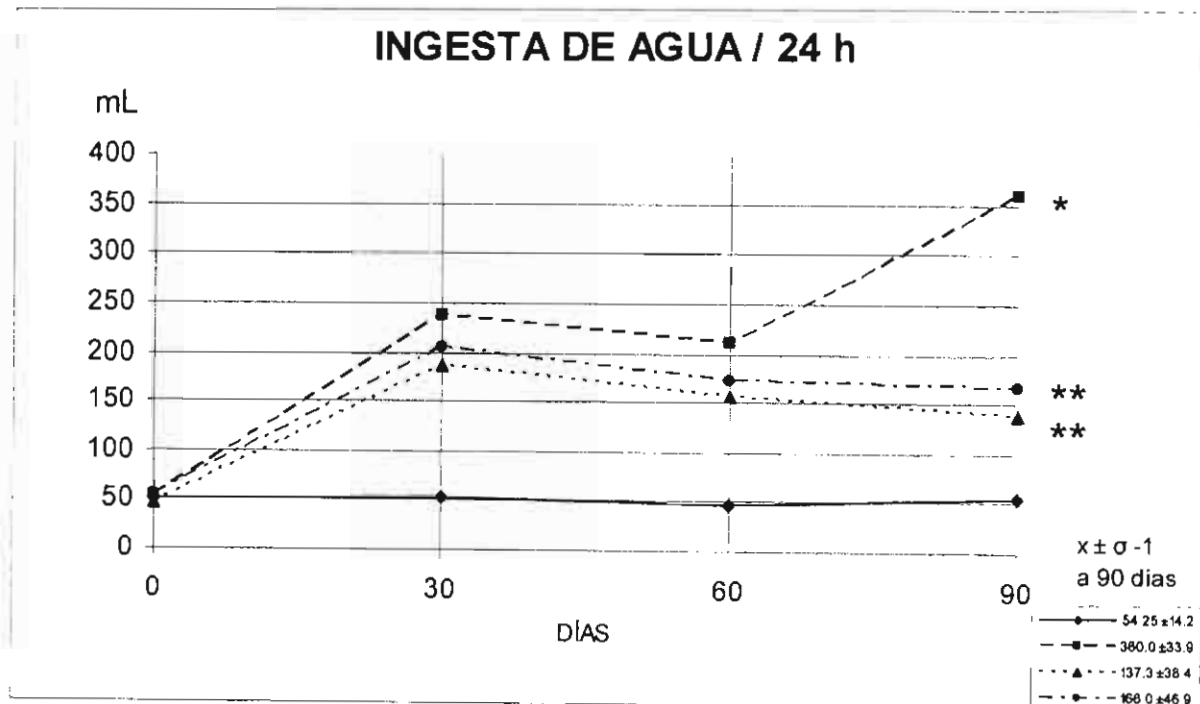


Figura 2c. Parámetros clínicos: Ingesta de agua durante 24 h valores registrados a los 0, 30, 60 y 90 días.

◆ Control sano, ■ Control diabético, ▲ Trasplante sin fusión, ● Trasplante con fusión.

Cada valor es la media de cuatro determinaciones.

*Diferente a los otros grupos $p < 0.05$.

**Diferentes a los controles sano y diabético $p < 0.05$

DIURESIS

La diuresis durante 24 horas muestra un incremento de alrededor de 6 veces en los grupos trasplantados y en el grupo control diabético (Figura 2 d).

Para esta variable, los grupos control diabético, trasplante sin fusión y trasplante con fusión fueron iguales, resultando sin diferencias estadísticas ($p > 0.05$), siendo diferentes del grupo control sano.

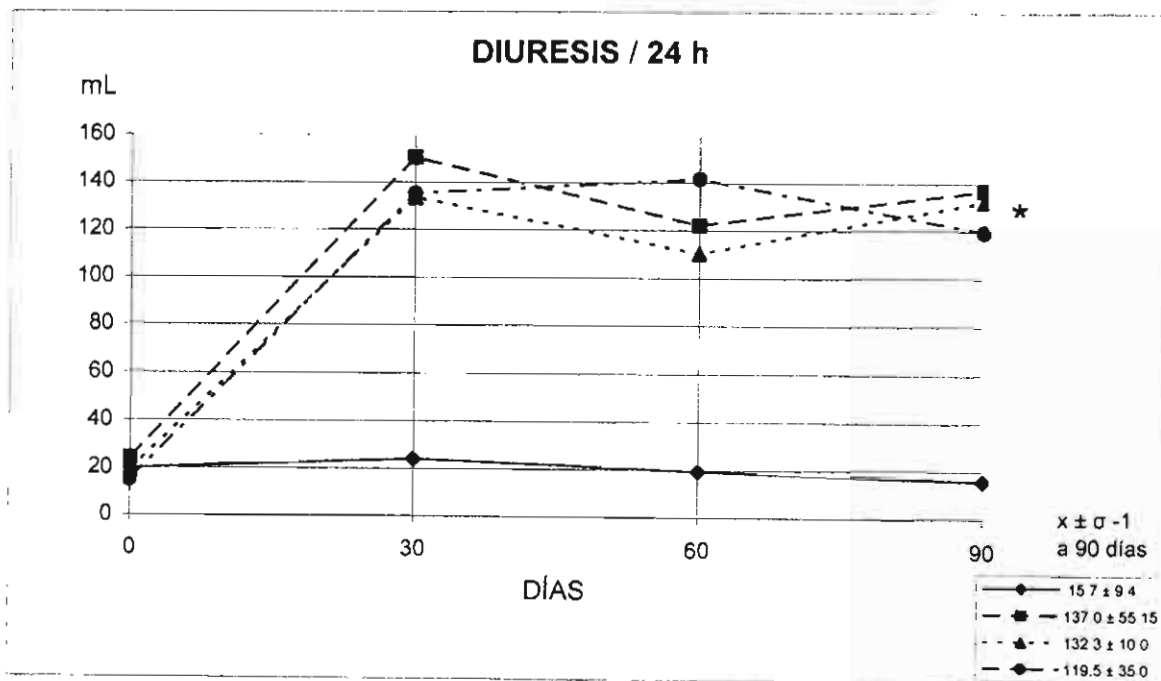


Figura 2d. Parámetros clínicos: Diuresis durante 24 h valores registrados a los 0, 30, 60 y 90 días.

◆ Control sano, ■ Control diabético, ▲ Trasplante sin fusión, ● Trasplante con fusión.

Cada valor es la media de cuatro determinaciones.

*Grupos sin diferencia entre ellos, diferentes al grupo control sano $p < 0.05$

7.2 PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN SANGRE.

GLUCOSA EN SANGRE

Se puede observar que el grupo trasplante con fusión presenta una disminución discreta de la hiperglucemia a los 90 días, con un promedio de 315.75 mg/mL, mientras que en los grupos: trasplante sin fusión y control diabético aumenta a 355.33 mg/dL y 360 mg/dL, respectivamente. (Figura 3a).

El grupo trasplante con fusión es diferente de los grupos trasplante sin fusión y control diabético ($p < 0.05$),

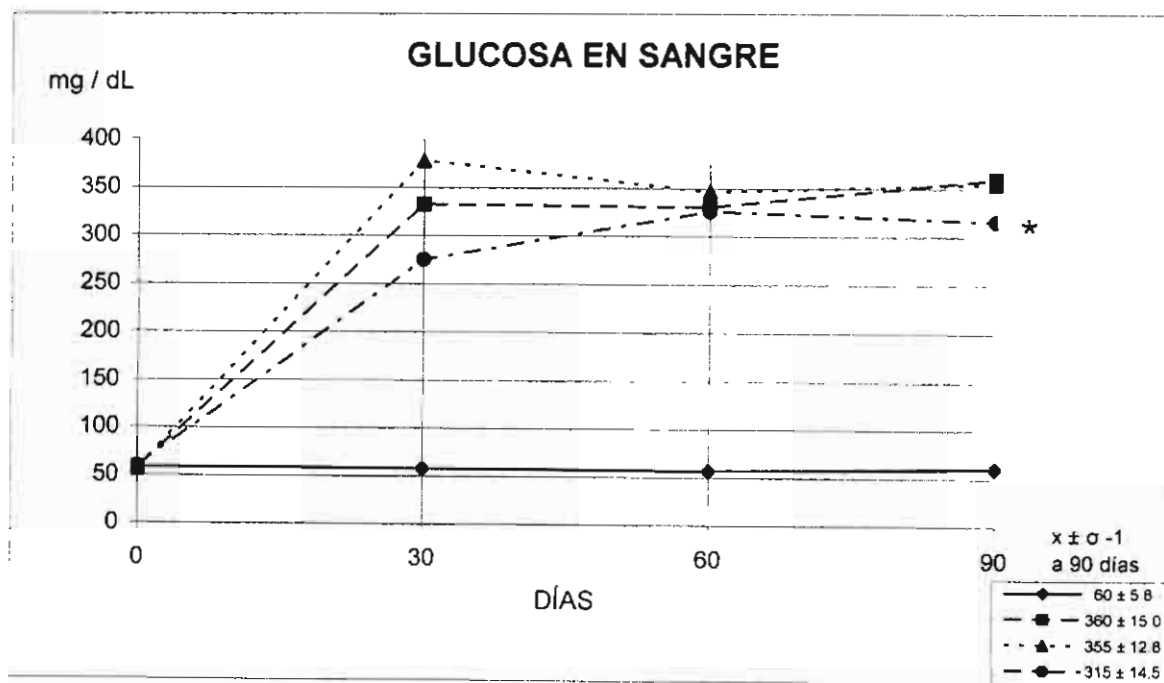


Figura 3a. Parámetros bioquímicos: Glucemia en ayunas, valores registrados los 0, 30, 60 y 90 días

◆ Control sano, ■ Control diabético, ▲ Trasplante sin fusión, ● Trasplante con fusión.

Cada valor es la media de cuatro determinaciones.

*Grupo trasplante con fusión, diferente a los otros grupos $p < 0.05$

INSULINA EN SANGRE

La concentración de insulina en sangre es notablemente diferente entre los grupos control diabético y trasplante sin fusión y los grupos control sano y trasplante con fusión. La producción de insulina por el grupo trasplante con fusión es cercana a la del grupo control sano (Fig 3b).

Fueron observadas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en el grupo de trasplante con fusión respecto a los grupos control diabético y trasplante sin fusión.

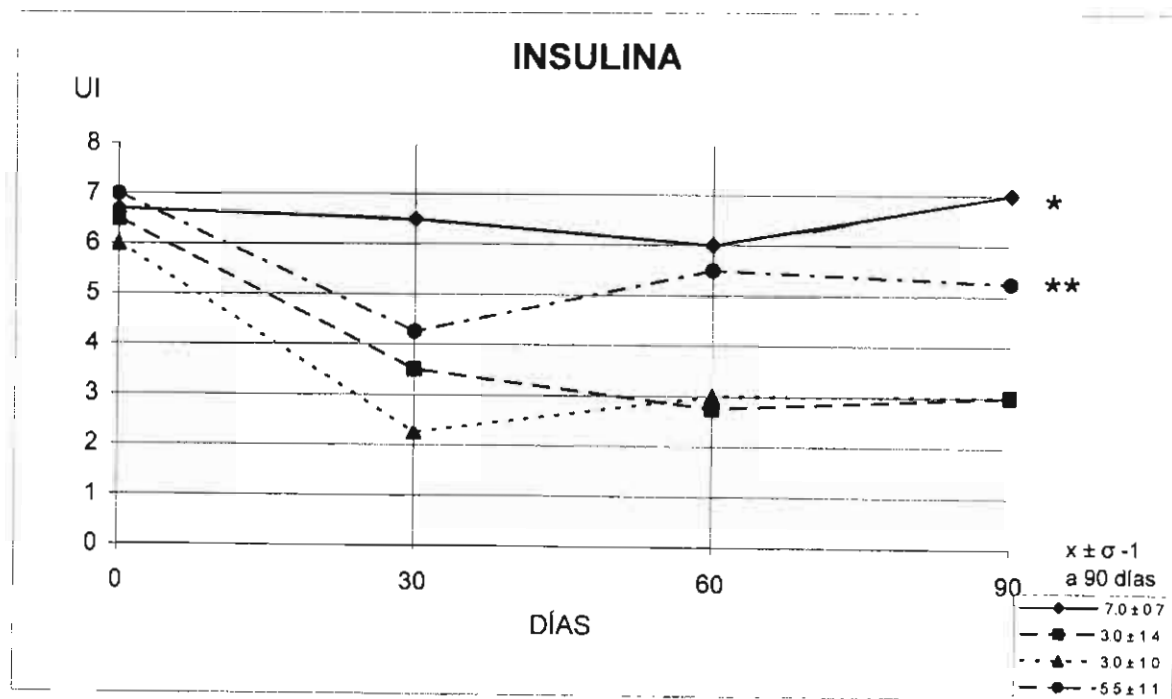


Figura 3b. Parámetros bioquímicos: Concentración de insulina en sangre, valores registrados los 0, 30, 60 y 90 días

◆ Control sano, ■ Control diabético, ▲ Trasplante sin fusión, ● Trasplante con fusión.

Cada valor es la media de cuatro determinaciones.

* Diferente a los otros grupos $p < 0.05$

** Diferente a los otros grupos $p < 0.05$

HEMOGLOBINA GLICADA

La hemoglobina glicada (Figura 3c) parece comportarse del mismo modo que la glucemia, sin embargo, el grupo trasplante con fusión permanece entre el grupo control sano y el grupo control diabético, en una situación mejor que el grupo trasplante sin fusión.

El grupo control sano presentó diferencias significativas ($p < 0.05$) con relación al grupo control diabético y los grupos con trasplante.

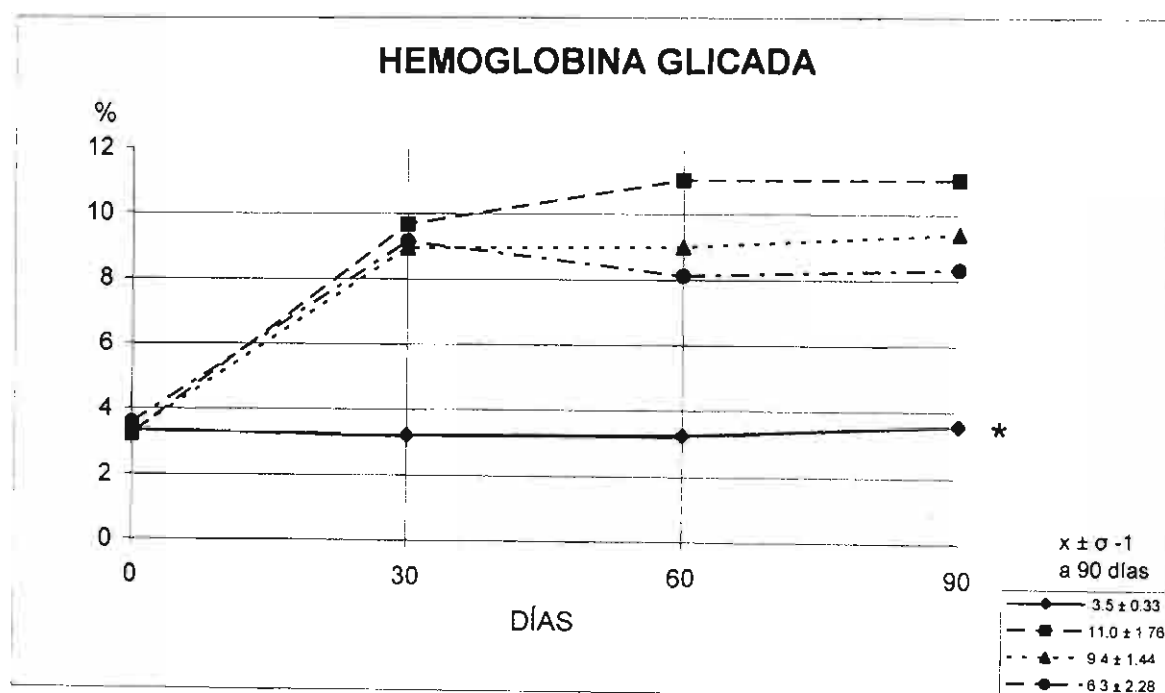


Figura 3c. Parámetros bioquímicos: Hemoglobina glicada, valores registrados los 0, 30, 60 y 90 días

◆ Control sano, ■ Control diabético, ▲ Trasplante sin fusión, ● Trasplante con fusión.

Cada valor es la media de cuatro determinaciones.

* Diferente a los otros grupos $p < 0.05$

TRANSAMINASAS

Los niveles de actividad de la transaminasa glutámico oxaloacética (TGO) y la transaminasa glutámico pirúvica (TGP) a los 90 días (Tablas 1 y 2) permanecieron altas en el grupo control diabético y dos ratas de este grupo murieron antes de los 90 días de experimentación, mientras que en el grupo de trasplante sin fusión una de ellas murió.

Tabla 1. Actividad de transaminasa glutámico oxaloacética a los 90 días.

Control sano	Control diabético	Trasplante sin fusión	Trasplante con fusión
48.2	62.4	124.0	154.0
65.9	† 66 días	† 30 días	72,6
43.2	>600	162.3	41.0
128.0	† 72 días	450.0	41.0

Cada valor corresponde a una rata. Actividad enzimática en U.I.
† muerte

Tabla 2. Actividad de transaminasa glutámico pirúvica a los 90 días.

Control sano	Control diabético	Trasplante sin fusión	Trasplante con fusión
34,5	34,5	87,9	61,5
44,1	† 66 días	† 30 días	60,1
32,2	287	39,5	148.0
52,4	† 72 días	118	38.0

Cada valor corresponde a una rata. Actividad enzimática en U.I.
† muerte

Debido a la naturaleza y comportamiento de los ensayos de transaminasas, la variabilidad es muy alta y la actividad de las enzimas no puede ser analizada por métodos estadísticos, por lo que los datos presentados son individuales.

Respecto a las determinaciones de colesterol, triglicéridos, creatinina, urea y ácido úrico, no se observó ningún cambio en los niveles séricos (datos no presentados).

7.3 PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN ORINA.

GLUCOSA EN ORINA

La glucosuria se incrementó a los 30 días en ambos grupos trasplantados y en el grupo diabético control, permaneciendo en niveles muy altos hasta los 90 días (Figura 4a);

Los grupos control diabético y trasplante sin fusión fueron estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) comparados con el grupo trasplante con fusión, con valores medios de 1500 mg/dL, 2500 mg/dL y 1000 mg/dL, respectivamente.

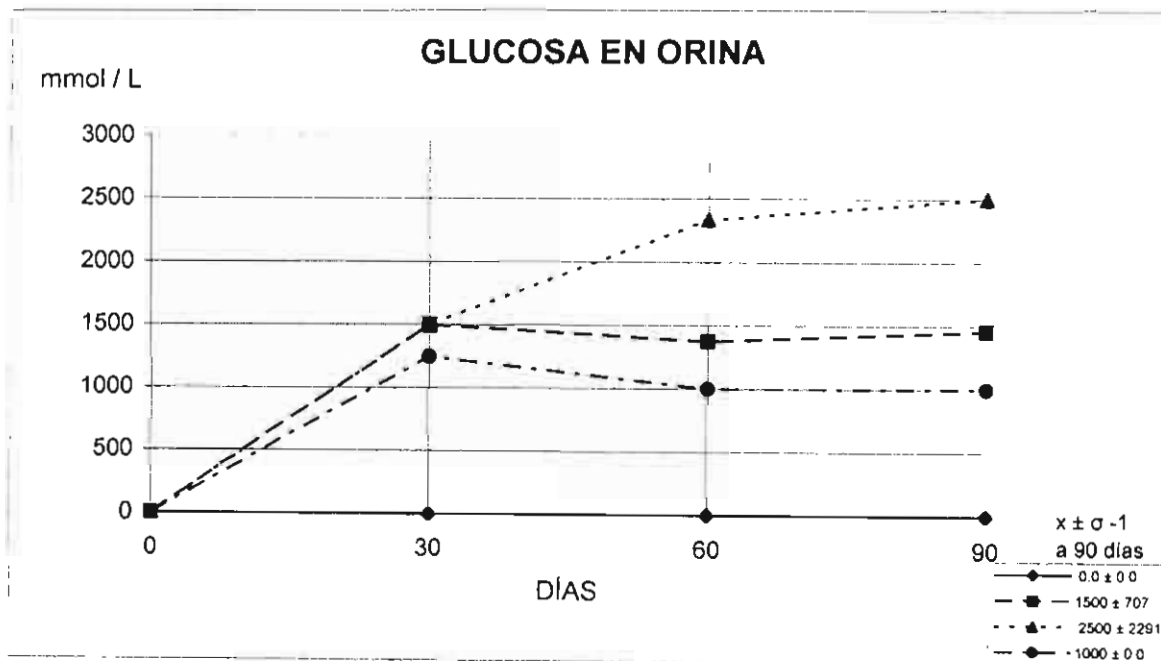


Figura 4a. Parámetros bioquímicos: Glucosuria, valores registrados los 0, 30, 60 y 90 días

◆ Control sano, ■ Control diabético, ▲ Trasplante sin fusión, ● Trasplante con fusión.

Cada valor es la media de cuatro determinaciones.

CUERPOS CETÓNICOS

La cetonuria en los grupos control diabético y trasplante sin fusión se encontró muy elevada desde los 30 días, sin embargo en el grupo de animales transplantados con células fusionadas permaneció cerca de los valores del grupo control sano y se incrementó a partir de los 60 días (Figura 4b).

Diferencias entre estos grupos fueron observadas, control diabético con un promedio de 2.5 mg/dL y trasplante con fusión con 1.25 mg/dL ($p < 0.05$).

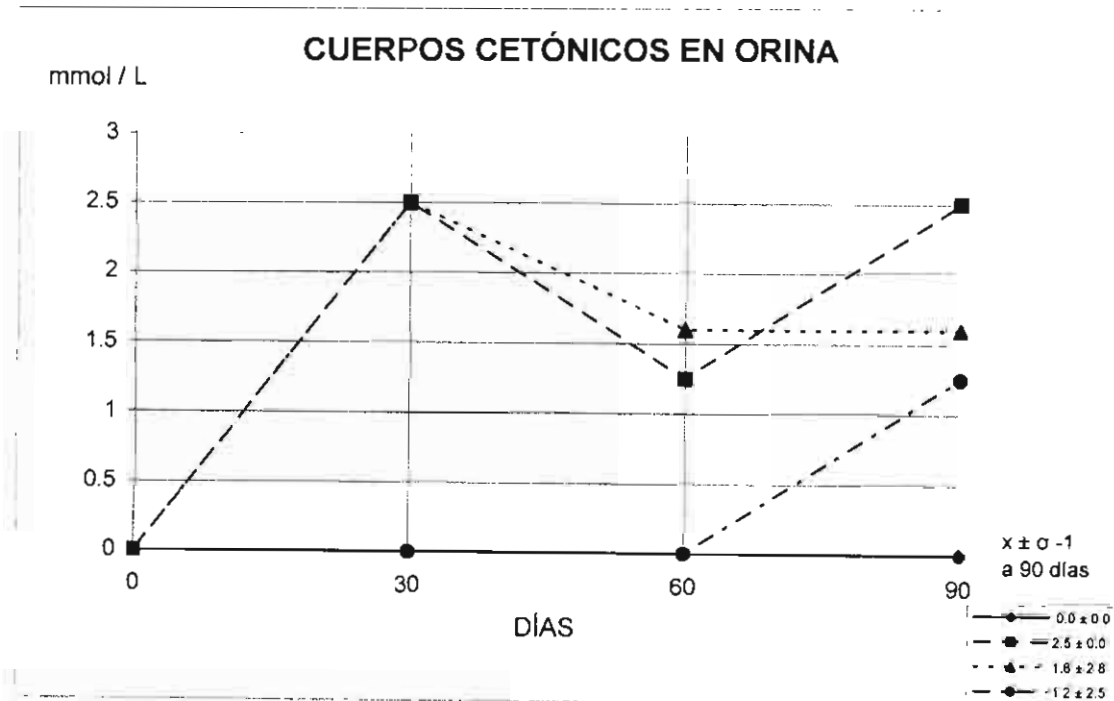


Figura 4b. Parámetros bioquímicos: Cuerpos cetónicos, valores registrados los 0, 30, 60 y 90 días

◆ Control sano, ■ Control diabético, ▲ Trasplante sin fusión, ● Trasplante con fusión.

Cada valor es la media de cuatro determinaciones.

7.4 ENSAYO HEMOLÍTICO INVERSO

El marcaje con microesferas de látex, no afectó a la viabilidad celular y permitió realizar la dielectroforesis sin que se afectara la migración celular o su función. La presencia de los dos tamaños de microesferas permitió identificar a las células fácilmente y distinguir los diferentes productos de la fusión, así, la presencia de dos núcleos en una célula con diferentes tamaños de esferas incluidas indicó la presencia de una célula heterodicarionte (Figura 5), si hubiese presentado un solo tamaño de esferas entonces sería una homocarionte. Las células con tres núcleos o más fueron consideradas policariontes. Al poder diferenciarlas se logró definir cuáles de los productos de la fusión secretaban insulina, encontrando que las células β libres, los homocariontes de β y los heterodicariontes y policariontes con marcaje de célula β pancreática lo hacían, no así las células dérmicas libres, los homocariontes dérmicos y los policariontes con marcaje de dérmicas exclusivamente.

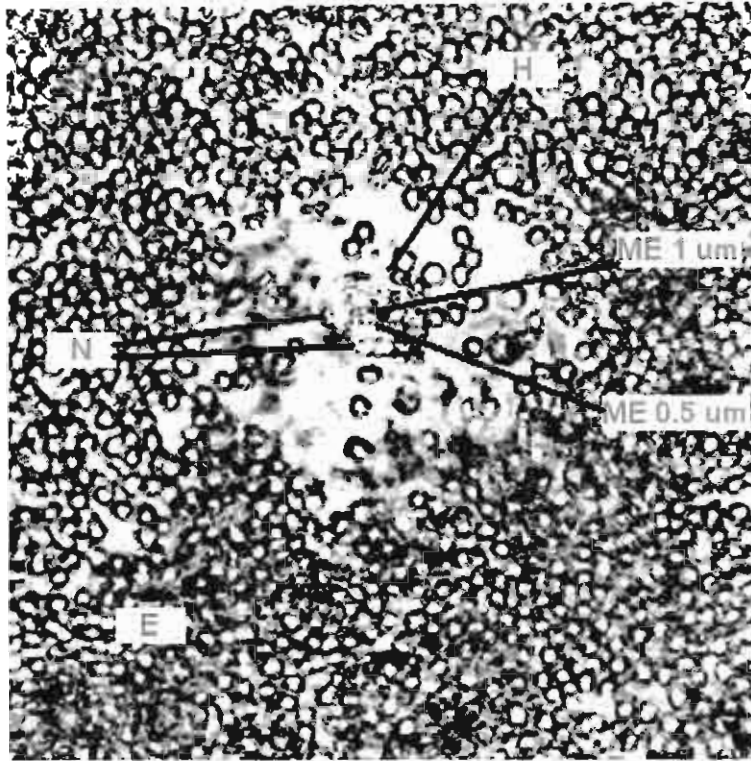


Figura 5. Célula híbrida (pancreática X dérmica) 100X.

Se puede observar el halo de hemólisis provocado por la insulina secretada.

N. Núcleos. **E.** Monocapa de eritrocitos. **H.** Placa de hemólisis (fantasmas de eritrocitos). **ME 1 μm** Microesferas de 1 μm. **ME 0.5 μm** Microesferas de 0.5 μm.

8 DISCUSIÓN

Los trasplantes de páncreas total y segmentario se realizan con éxito desde la década de los 70's [41]; en la actualidad, suelen realizarse únicamente cuando se precisa el trasplante renal. Aunque también se efectúan trasplantes aislados, que sin duda alguna, realizados con éxito son capaces de normalizar la glucemia [42]. Como todos los trasplantes, presentan los inconvenientes del rechazo y la necesidad del uso de inmunosupresores, que por sí solos agravan el cuadro diabético [81]. El trasplante de islotes tiene algunas ventajas sobre el trasplante total o segmentario entre las cuales están: Una cirugía menos amplia y agresiva y un riesgo menor de complicaciones trans- y postoperatorias. Sin embargo quedan por resolver problemas que impiden el amplio uso de este procedimiento terapéutico, como son: disponibilidad de órganos, la limitación técnica de obtener suficientes islotes funcionales, evitar el uso de inmunosupresores [82, 83].

Se está estudiando la posibilidad de usar células no pancreáticas elaboradas mediante ingeniería genética para sintetizar insulina humana bajo control de la glucosa [42].

De manera experimental todavía, se trabaja con métodos no necesariamente novedosos, que se deben estudiar más a fondo como el uso de islotes fetales o criopreservados, xenotransplantes, encapsulación de islotes [41, 42, 81, 82, 83].

Los estudios experimentales más recientes tienden al uso de células β aisladas, sin embargo, su aislamiento es complicado y en ocasiones no muy exitoso y su cultivo y preservación no han tenido el éxito deseado, además el

trasplante de ellas no resuelve los problemas antes mencionados. Por lo que ahora se ha enfocado el problema al empleo de células híbridas

El grupo de McClenaghan [65] ha trabajado con la electrofusión de células β pancreáticas con líneas celulares tumorales para estudios de las propiedades secretorias de las líneas híbridas obtenidas. El mismo grupo ha estudiado el cultivo de dichas líneas en diferentes medios de cultivo [66]. Rasschaert y McClenaghan [67] han reportado las propiedades metabólicas de la glucosa en la línea BRIN-BD 11 obtenida por electrofusión.

En 2001 Davies y Abdel-Wahab presentaron los resultados del implante de células de la línea celular tumoral obtenida por el equipo de McClenaghan ya mencionada, en ratones diabéticos [68]. Los resultados son interesantes, pero están enfocados principalmente al comportamiento de las células tanto en el almacenamiento, como en la liberación de insulina, quizá posteriormente veamos más estudios sobre éste tema aplicado a la diabetes mellitus específicamente.

En este estudio, como ya se mencionó antes, la hibridación no se lleva a cabo con células tumorales, sino con células de rápida duplicación, las dérmicas, con el fin de obtener una línea celular de rápido crecimiento productora de insulina, y que además, por ser células del mismo receptor del trasplante, puedan ser aceptadas más fácilmente.

Los resultados obtenidos indican que, las células híbridas obtenidas por electrofusión mostraron un rendimiento del 19% y una viabilidad del 85-90% de acuerdo a las pruebas con azul tripano (datos no presentados)

A diferencia de la evolución de los animales control y transplantados, los animales sanos mantuvieron sus parámetros en los rangos normales cuando se

hicieron las evaluaciones a 0, 30, 60 y 90 días y estos valores fueron usados como referencia en todas las figuras.

Las concentraciones de colesterol, triglicéridos, creatinina, urea y ácido úrico, no tuvieron cambios en ninguno de los grupos.

El grupo control diabético presentó desde el principio altos niveles de glucosa en sangre (arriba de 240 mg/dL), a los 30 días el cuadro clínico fue claro, observándose alteraciones correspondientes al estado diabético en casi todos los parámetros. Ninguno de los animales mostró tendencia a mejorar espontáneamente y el punto más destacable es la modificación de la actividad de la transaminasa glutámico oxalacética al menos en tres de los animales de este grupo, lo cual significa lesión tisular, que probablemente fue la causa de la muerte de dos ratas de este grupo a los 66 y los 72 días.

El grupo de trasplante sin fusión presentó un perfil clínico similar al del grupo control diabético, sin mejoría, en este grupo dos ratas mostraron un incremento de las transaminasas glutámico oxalacética y glutámico pirúvica, sólo una rata murió a los 33 días.

En el grupo de trasplante con fusión se apreció mejoría en algunos de los parámetros: peso corporal, ingesta de agua, glucemia; la hemoglobina glicada fue mayor en este grupo que en el grupo control, pero menor que en los grupos control diabético y trasplante sin fusión, los cuerpos cetónicos y la glucosuria estuvieron en rangos intermedios entre los grupos control sano y control diabético en ambos grupos con trasplante. La actividad de las transaminasas se encontró en niveles bajos y una ligera mejoría fue observada en algunos de los parámetros en tres ratas, ninguna rata murió. Es notoria la concentración de insulina sérica,

que no obstante a que está debajo de los parámetros normales, fue mayor que la del grupo de trasplante sin fusión y se encuentra muy cercana a la normalidad.

Parecería que el aumento de secreción de insulina no corresponde a los cambios en el cuadro clínico, la glucemia y la concentración de hemoglobina glicada, este efecto podría deberse al hecho de que las células trasplantadas no se encuentran en su nicho natural y no están sujetas a la regulación parácrina de su microambiente.

Las células β son reguladas por secreciones y acciones hormonales de las células vecinas componentes del islote de Langerhans, al no estar inmersas en esa topografía es probable que su acción sea regulada de manera diferente.

Por otro lado, es necesario recordar que si la célula híbrida trasplantada tiene síntesis de insulina, ésta se produce desde su forma de preprohormona, y después debe ser procesada y recortada para obtener su estructura definitiva y activa. Las condiciones de la célula dérmica progenitora son diferentes y quizá las proteasas no procesen a la pre y proinsulina de manera adecuada, esto provocaría que la estructura no fuera la correcta y su acción se viera disminuída, por lo que la concentración podría ser alta pero su eficiencia no adecuada.

Otra explicación sería que, ya que la diabetes provocada a los animales implica la destrucción de las células β , pero no de otras, entonces las células productora de glucagón podrían estar antagonizando el efecto de la insulina producida por el trasplante, perdiendo así su eficiencia.

No obstante que la reversión completa del cuadro diabético no se logró con el trasplante de células fusionadas, es importante enfatizar que se logró establecer los parámetros clínicos y de laboratorio en un rango entre lo normal y el cuadro

diabético franco, mejorando en comparación con los parámetros encontrados en los animales con transplante sin fusión.

En lo que respecta a la secreción de insulina *in vitro*, es importante recalcar que el ensayo hemolítico inverso para las células β pancreáticas permite observar la capacidad de éstas para mantener su función. La técnica se aplicó en este trabajo para determinar si las células híbridas conservan también su capacidad secretoria, lo remarcable en los resultados obtenidos es que todos los productos de la electrofusión que conservaron el marcaje de las células β fueron capaces de secretar insulina.

La conservación de esta propiedad, concuerda con los hallazgos clínicos y de laboratorio. Sin embargo, sabemos que la secreción de insulina no sólo depende de la presencia de las células secretorias, sino de un finísimo sistema de control en el que influye fuertemente el microambiente de la célula β y su interacción neurohumoral con el individuo como un todo a cada momento.

Las células trasplantadas conservan su capacidad secretoria de insulina, aunque no con el control adecuado, sin embargo, como se mencionó antes, se logró establecer los parámetros clínicos y de laboratorio en un rango entre lo normal y el cuadro diabético, mejorando en comparación con los parámetros encontrados en los animales con transplante sin fusión, especialmente en la glucemia, insulina y hemoglobina glicada.

9 CONCLUSIONES

1. Las células híbridas, resultantes de la electrofusión de células insulares del donador con células dérmicas del receptor, conservan la función generadora de insulina *in vitro* y después de trasplantadas.
2. El cuadro clínico de la diabetes mellitus y los parámetros bioquímicos de las ratas receptoras del trasplante de las células híbridas son mejorados parcialmente por éste.
3. El trasplante de células híbridas, como lo demuestran los resultados funcionales, no fue rechazado completamente durante el tiempo que duró la investigación.
4. El trasplante de células híbridas puede representar una alternativa viable para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 1.

10 PERSPECTIVAS

Es necesario hacer un seguimiento a largo plazo con una mayor cantidad de animales experimentales y tratar de mejorar los resultados con un trasplante de un mayor número de células, buscando un mejor nicho para él, quizás podría ser por vía hemática; también es necesario estudiar el comportamiento inmunológico de los organismos trasplantados.

La célula híbrida puede ser estudiada en su función secretora y su comportamiento respecto a la segregación cromosómica, así como su clonación y producción en cultivo.

11 REFERENCIAS

- [1] Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. ene 2003; 26, Health Module: S5-S20.
- [2] Secretaría de Salud. Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas. México: Secretaría de Salud; 2000.
- [3] Harrison's Principles of Internal Medicine. Braunwald E., Fauci A.S. Kasper D.L. Hauser S.L. Longo D.L. Jameson J.L. (Eds). The McGraw-Hill Companies, NY. Inc. 2001. 15th Edition.
- [4] Islas A, Lifshitz G. Diabetes mellitus. Interamericana. McGraw Hill. México. 1993. pp 366.
- [5] American Diabetes Association: *Diabetes Care*. 2000. 23(Suppl 1)
- [6] Carter JS, Pugh JA, Monterrosa A. Non-insulin-dependent diabetes mellitus in minorities in the United States. *Ann Intern Med*. 1996. 125:221-230.
- [7] Harris MI Flegal KM, Cowie CC, Eberhardt MS, Goldstein DE, Little RR, Wiedmeyer HM, Byrd-Holt DD. Prevalence of diabetes, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance in U.S. adults. The Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Diabetes Care*. 1998. 21:518-522.
- [8] Rosenbloom AL, Joe JR, Young RS, Winter WE. Emerging epidemic of type 2 diabetes in youth. *Diabetes Care*. 1999. 22:345-350.
- [9] Lowe WI: Genetics of diabetes, in Principles of Molecular Medicine, JL Jameson (ed). Totowa, NJ, Humana, NJ. 1998, pp 433-442.
- [10] Pugliese A: Unraveling the genetics of insulin-dependent type 1A diabetes: The search must go on. *Diabetes Rev*. 1999. 7:39-43.
- [11] Schranz DB, Lernmark A: Immunology in diabetes: An update. *Diabetes Metab Rev*. 1998. 14:3-13.
- [12] DeFronzo RA: Pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Rev*. 1997. 5:177-181.
- [13] Gerich JE: The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: Impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity. *Endocr Rev*. 1998. 19:491-499.
- [14] Cline GW, Petersen KF, Krssak M, Shen J, Hundal RS, Trajanoski Z, Inzucchi S, Dresner A, Rothman DL, Shulman GI. Impaired glucose transport as a cause of decreased insulin-stimulated muscle glycogen synthesis in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 1999. 341:240-245.

- [15] Shepherd PR, Kahn BB: Glucose transporters and insulin action implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1999. 341:248-255.
- [16] Tritos NA, Mantzoros CS: Syndromes of severe insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998. 83:3025-34.
- [17] Shulman GI: Cellular mechanisms of insulin resistance in humans. *Am J Cardiol*. 1999. 84:3J.
- [18] Virkamaki A, Ueki K, Kahn CR. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest*. 1999. 103:931-947.
- [19] American Diabetes Association: Therapy for Diabetes Mellitus and Related Disorders, 3d ed, HS Lebovitz (ed). Alexandria, VA, American Diabetes Association, 1998
- [20] American Diabetes Association: Clinical Practice Guidelines 2000. *Diabetes Care*. 2000. 23(Suppl):S1.
- [21] Skyler JS (ed): Medical Management of Type 1 Diabetes, 3d ed. Alexandria VA, American Diabetes Association, 1998
- [22] Buse JB: Overview of current therapeutic options in type 2 diabetes. Rationale for combining oral agents with insulin therapy. *Diabetes Care* . 1999. 22(Suppl 3):C65.
- [23] DeFronzo RA: Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med*. 1999. 131:281-292.
- [24] UK Prospective Diabetes Study Group: Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet*. 1998. 352:837.
- [25] Davidson MB, Peters AL: An overview of metformin in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Am J Med*. 1997. 102:99-112.
- [26] UK Prospective Diabetes Study Group: Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *Lancet*. 1998. 352:854-860.
- [27] Bailey CJ. Nuevos agentes farmacológicos para la diabetes. *Current Diabetes Reports Latin America*. 2001, 2:133-141.
- [28] Diabetes Control and Complications Trial Research Group: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1993. 329:977-983.

[29] Farkas-Hirsch R. (ed): Intensive Diabetes Management, 2d ed. Alexandria VA, American Diabetes Association, 1998

[30] Umpierrez GE, Khajavi M, Kitabchi AE. Review: Diabetic ketoacidosis and hyperglycemic hyperosmolar nonketotic syndrome. *Am J Med Sci.* 1996. 311:225-238.

[31]Chen YDI, Reaven GM: Insulin resistance and atherosclerosis. *Diabetes Rev.* 1997. 5:331-337.

[32]Grundy SM, Benjamin IJ, Burke GL, Chait A, Eckel RH, Howard BV, Mitch W, Smith SC Jr, Sowers JR. Diabetes and cardiovascular disease: A statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation.* 1999. 100:1134-39.

[33] Marshall SM: Blood pressure control, microalbuminuria and cardiovascular risk in Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med.* 1999. 16:358-363.

[34] Aiello LP, Gardner TW, King GL, Blankenship G, Cavallerano JD, Ferris FL 3rd, Klein R. Diabetic retinopathy. *Diabetes Care.* 1998. 21:143-146.

[35] Diabetes Control and Complications Trial Research Group: The relationship of glycemic exposure (HbA1C) to the risk of development and progression of retinopathy in the diabetes control and complications trial. *Diabetes.* 1995. 44:968-973.

[36] Mogensen CE: Preventing end-stage renal disease. *Diabet Med.* 1998. 15(Suppl 4):S51.

[37]Ritz E, Orth SR: Nephropathy in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 1999. 341:1127-33.

[38] Partanen J, Niskanen L, Lehtinen J, Mervaala E, Siitonen O, Uusitupa M. Natural history of peripheral neuropathy in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1995. 333:89-95.

[39] Consensus development conference on diabetic foot wound care. *Diabetes Care.* 1999. 22:1354-59.

[40] Brownlee M: Glycation products and the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care.* 1992. 15:1835-1840.

[41] Román RR, Alexieyev YP, Kulik VP. Prospects in the treatment of diabetes mellitus patients: artificial pancreas, graft of the Langerhans islets, and transplantation of the pancreas. *Problemi Endokrinology (Moskow)* 1979. 25: 81-92.

- [42] Burke GW, Ciancio G, Sollinger HW. Advances in pancreas transplantation. *Transplantation*. 2004. 77(9 Suppl): S62-67.
- [43] Rabinovitch A. Immunoregulatory and cytokine imbalances in the pathogenesis of IDDM. Therapeutic intervention by immunostimulation?. *Diabetes*. 1991. 43:3-10.
- [44] Marks J.B. Skyler J.S. Immunotherapy of Type I diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 1991. 72:3-9.
- [45] Ringertz N. Savage R. Cell Hibrids. Academic Press, USA. 1976. pp. 366.
- [46] Barski G. Sorieul S. Cornefert F. "Hybrid" type cells in combined cultures of two different mammalian cell strains. *J Natl Cancer Inst*. 1961. 26: 1269-75.
- [47] Okada Y. Analysis of giant polynuclear cell formation caused by HVJ virus from Ehrlich's ascites tumor cells. Microscopic observation of giant polynuclear cell formation. *Exp. Cell. Res*. 1962. 26:98-102.
- [48] Harris H. Watkins J.F. Hybrid cells derived from mouse and man: Artificial heterokaryons of mammalian cells from different species. *Nature (London)*. 1965. 205:640-651.
- [49] Okada Y. Murayama F. Multinucleated giant cell formation by fusion between cells of two different strains. *Exp Cell Res*. 1965. 40:154-159.
- [50] Lucy J.A. The fusion of biological membranes. *Nature (London)*. 1970. 227:815-819.
- [51] Graham C.F. Virus assisted fusion of embryonic cells. In Diczfalusy, E. (ed.), *In Vitro Methods in Reproductive Cell Biology*. *Acta Endocrinol*. 1971. 153: 154-167.
- [52] Eglitis M. Formation of tetraploid mouse blastocysts following blastomere fusion with polyethylene glycol. *J Exp Zool*. 1980. 213: 309-313.
- [53] Spindle A. Polyethylene glycol-induced fusion of two-cell mouse embryo blastomeres. *Exp. Cell. Res*. 1981. 131: 465-470.
- [54] Kao K.M. Michayluk M.R. A method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta*. 1974. 115: 335-368.
- [55] Pontecorvo G. Production of mammalian somatic cell hybrids by means of polyethylene glycol treatment. *Somat. Cell. Genet*. 1975. 1: 397-402.
- [56] Campbell K.H.S. McWhir J. Ritchie W.A. Wilmut. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*. 1996. 380: 64.

- [57] Wilmut I, Schnieke A.E, McWhir J. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 1997. 385: 810-813.
- [58] Wakayama T, Perry A.C.F, Zuccotti M. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*. 1998. 394: 369.
- [59] Wells D.N, Misica P, and Tervit H.R. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol. Reprod*. 1999. 60: 996-1005.
- [60] Zimmermann U, Vienken J, Scheurich P. Electric field induced fusion of biological cells. *Biophys Struct Mech*. 1980 6 (Suppl.). 86.
- [61] Chang DC, Chassy BM, Saunders JA, Sowers AE. Guide to electroporation and electrofusion. Academic Press. USA. 1992. 581 pp.
- [62] Köhler. G. Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975. 256: 495-497.
- [63] Wilmut I, Schnieke A.E, McWhir J, Kind A.J, Campbell K.H. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 1997. 385: 810-813.
- [64] Kugler A, Stuhler G, Walden P, Zöller G, Zobywalski A, Brossart P, Trefzer U, Ullrich S, Müller C.A, Becker V, Gross A.J, Hemmerlein B, Kanz L, Müller G.A, Ringert R.-H. Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. *Nature Medicine*. 2000. 6. 3: 332-336.
- [65] Hamid M, McCluskey JT, McClenaghan NH, Flatt PR. Comparison of the secretory properties of four insulin-secreting cell lines. *Endocr Res*. 2002 Feb-May;28: 35-47.
- [66] Hamid M, McCluskey JT, McClenaghan NH, Flatt PR. Comparative functional study of clonal insulin-secreting cells cultured in five commercially available tissue culture media. *Cell Transplant*. 2001. 10:153-159.
- [67] Rasschaert J, Flatt PR, Barnett CR, McClenaghan NH, Malaisse WJ. D-glucose metabolism in BRIN-BD11 islet cells. *Biochem Mol Med*. 1996. 57: 97-105.
- [68] Davies EL, Abdel-Wahab YH, Flatt PR, Bailev CJ. Functional enhancement of electrofusion-derived BRIN-BD11 insulin-secreting cells after implantation into diabetic mice. *Int J Exp Diabetes Res*. 2001. 2: 29-34.
- [69] Barrera EE, Vilches FA, Manzano LN, Mendoza MA, Sandoval MT, Fregoso PM, Castillo PI, Martínez AJ, Vargas VA. Transplante de células pancreáticas híbridas como posible tratamiento para la diabetes mellitus. Ponencia en la V reunión del grupo de estudio para la diabetes mellitus. 1994. Taxco, Gro.

- [70] Barrera EE, Vilches FA, Fregoso PM, Martínez AJ, Castillo PI, Manzano LN, Mendoza MA, Sandoval MT, Vargas VA, Aranda FA. Evolución clínica de la diabetes mellitus post-transplante de células pancreáticas electrofusionadas. XIV coloquio de investigación UNAM Campus Iztacala. 1994. Mex.
- [71] Barrera EE, Aranda FA, Vilches FA, Fregoso PM, Castillo PI, Martínez AJ, Vargas VA. Transplante de células pancreáticas electrofusionadas: Cuadro clínico y análisis histopatológico a los 18 meses. XVI coloquio de investigación UNAM Campus Iztacala. 1996. Mex.
- [72] Méndez JD. Ramos HG. Animal models in diabetes research. *Arch Med Res* 1994; 25: 367-375.
- [73] Freshney RI. Culture of animal cells. A manual of basic technique 1994; Wiley-Liss Inc.
- [74] Lacy PE. Kostianovsky M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 1976. 16: 35-39.
- [75] Hiriart M. Matteson DR. Na channels and two types of Ca Channels in rat pancreatic β cells identified with the reverse hemolytic plaque assay. *J. Gen Physiol* 1988. 91: 617-639.
- [76] Lake SP. Bovine serum albumin density gradient isolation of rat pancreatic islets. *Transplantation* 1987. 43: 805-809.
- [77] Watt JW. King JM. A simple method for large scale electrofusion and culture of plant protoplasts. *Bioscience*. 1984. 4: 335-342.
- [78] Barrera EE. Vilches FA. Fregoso PM. Vargas VA. Castillo PI. Martínez AJ. Velasco LR. Parámetros de electrofusión para células pancreáticas. *Bioquímica* 1997. 22: 722-726.
- [79] Salomón D. Meda P. Heterogeneity and contact-dependent regulation of hormone secretion by individual β cells. *Exp Cell Res*. 1986. 162: 507-510.
- [80] Lewis CE. Clark A. Ashcroft SJH. Cooper GJS. Morris JF. Calcitonin gene-related peptide and somatostatin inhibit insulin release from individual rat B cells. *Moll Cell Endocrinol*. 57: 41-45.
- [81] Scharp DW. Lacy PE. International handbook of pancreas transplantation. London, Kluwer Academic Publishers. 1989. pp 478
- [82] Gray DW. Morris PJ. Developments in isolated pancreatic islet transplantation. *Transpl*. 1987. 43:321-331.
- [83] Warnock GL. Rajotte RV. Critical mass of purified islets that induce normoglycemia after implantation into dogs. *Diabetes*. 1988. 37:467-470.

[84] Warnock GL, Kneteman NM, Ryan E, Seelis RE, Rabinovitch A, Rajotte RV. Normoglycemia after transplantation of freshly isolated and cryopreserved pancreatic islets in type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1991. 34:55-58.

BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY

Founding Editor : G Mathé (France)

Editors-in-chief : H Tapiero (France), KD Tew (USA), P O'Dwyer (USA)

Dr E Barrera-Escorcia
FES Iztacala UNAM Biologia
Av de los Barrios No 1. Los Reyes Iztacala
Tlalnepantla de Baz Estado de Mexico
Apartado Postal 314
CP 54090 Mexico
Mexico

25-nov-04

Ref: MS 24102 "Clinical evolution of diabetic rats after transplant of electrofused pancreatic islet cells and dermic cells"

Dear Doctor Barrera-Escorcia,

Thank you for your recent submission of the above manuscript. I am pleased to inform you that it has been accepted for publication in BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY. I anticipate the appearance of this paper in n° 6 issue 2005.

You should hear directly from the publisher in a not too distant future. Of course, should you have other manuscripts or have colleagues who wish to submit manuscripts, I would like to emphasize that the journal is in need of continued submission of quality manuscripts

Sincerely Yours,

H. Tapiero, Editor in Chief

Editorial Secretary : MC Feuillet - Hôpital Paul-Brousse, Bât André Lwoff
14 av Paul-Vaillant-Couturier, 94800 Villejuif, France
tel 33 01 49 58 11 53 - fax 33 01 47 26 80 97
e-mail : feuillet@vjf.inserm.fr or BiomedPharmacol@aol.com



ELSEVIER

Clinical evolution of diabetic rats after transplant of electrofused pancreatic islet cells and dermic cells

^{1,2}Eduardo Barrera-Escorcía, ¹Antonio Muñoz-Torres, ¹Alonso Vilches-Flores,
¹Martha Fregoso-Padilla, ¹José Martínez-Aguilar, ¹Irma Castillo-Padilla,
¹Agustín Vargas-Vera, ³José D. Méndez, ⁴Miguel Betancourt-Rule,
⁴Rubén Román-Ramos

Running title: Transplant with electrofused pancreatic islet cells and dermic cells in diabetes

¹Biorregulation Laboratory. FES Iztacala UNAM México.

²Biological Sciences Doctorate Program of the Universidad Autónoma Metropolitana. UAM México.

³Medical Research Unit in Metabolic Diseases, National Medical Center, Mexican Institute of Social Security. México.

⁴Division of Biological and Health Sciences, UAM Iztapalapa. México.

Correspondence: Eduardo Barrera Escorcía.

FES Iztacala UNAM. Biología.
Av. de los Barrios No 1. Los Reyes Iztacala.
Tlalnepantla de Baz Estado de México, México.
CP 54090
Apartado Postal 314
Phone: +52 55 56231105
E mail: escorcía@correo.unam.mx

ABSTRACT

This work was designed to study an alternative treatment of diabetes mellitus by using a transplant of hybrid cells obtained by the electrofusion of pancreatic islet cells from a healthy donor with dermic cells obtained from a recipient. The hybrid cells kept the capacity of insulin production, its regulation, and the natural control of glycemia, as well as the factors of histocompatibility to avoid the rejection.

Four groups of four rats each were established: Group 1. Healthy animals (healthy control), Group 2. Diabetized non-treated animals (diabetic control), Group 3. Transplant recipient rats with extraction of dermic cells which were mixed with pancreatic insular cells from a healthy donor (transplant without fusion), and Group 4. Transplant recipient rats, with extraction of dermic cells which were electrofused with pancreatic insular cells from a healthy donor (transplant with fusion). For the group 4, the cells were combined and they were submitted to dielectrophoresis conditions with an alternating current pulse of 15 seconds of 10 Volts RMS of 0.5 MHz. The fusion was made with a direct current pulse of 1 milliseconds of 300 Volts. Clinical signs were registered (weight, diuresis, food and water intake), and several biochemical parameters in blood which included basal glycemia, ureic acid, cholesterol, triglycerides, glutamate oxalacetate transaminase, glutamate pyruvate transaminase, urea, creatinine, insulin, glycated hemoglobin were registered. Additionally, ketone bodies and glucose were also measured in urine. All determinations were made at 30, 60, and 90 days.

Animals of group 1 maintained its parameters within the normal ranges. Rats of group 2 presented alterations corresponding to a diabetic state in almost all the parameters measured, none of the animals showed a tendency to improve spontaneously, two of the rats died at 66 and 72 days. The group 3 showed a clinical profile similar to the diabetic control group without improvement, only one rat died at day 33, while in the rats transplanted with fusion (Group 4) an improvement was observed on some parameters including body weight, water intake and glycemia. Although insulin concentration was under the normal range, it was higher than in the Group 3. None rat died.

These results indicate that it is possible to improve the diabetic profile by the transplant of dermic cells from a diabetic animal fused with insular cells from a healthy donor in the recipient animal.

Keywords: Diabetes mellitus, pancreatic islet cell transplantation, pancreas transplantation, electrofusion, hybrid cells.

INTRODUCTION

Diabetes mellitus is a group of metabolic illnesses genetically determined, that involves alterations of the biochemical processes of carbohydrates, fats and proteins, whose common factor is hyperglycemia that is caused by the partial or total loss of insulin secretion, or because of its lack of action, or both. The chronic hyperglycemia caused by diabetes mellitus produces long term damage, malfunction and failure of several organs, specially to the eyes, kidneys, nerves, heart and blood vessels [1].

The administration of the exogenous insulin and/or oral hypoglycemic agents and the low carbohydrate diets are insufficient to obtain a good metabolic control of the diabetic patient and to avoid the development of chronic complications. The failure on an adequate dosage of hypoglycemic substances causes the development of acute and chronic complications, being the cause of death of the diabetic patient.

In order to restore the metabolic balance in a more natural way, the implementation of an artificial pancreas as much as the pancreas transplants and that one of the pancreatic islets are under intensive study, nevertheless the first option still presents technical problems that maintain it in an experimental phase. The transplants of total and segmented pancreas present the disadvantages of the rejection and the need of the use of immunosuppressors, that by themselves aggravate the diabetic profile. The islets transplant has some advantages on the total or segmental transplant which are: a less extensive and aggressive surgery and a smaller risk of trans and postoperative complications. However, there are still problems to solve that prevent the extensive use of this therapeutic procedure such as availability of organs, the technical limitation to obtain enough functional islets, avoid the use of immunosuppressors, study about the use of fetal or cryopreserved islets more thoroughly, xenotransplants and islets encapsulation [2-6].

An alternative treatment could be the transplant of hybrid cells obtained by the electrofusion of pancreatic insular cells from a healthy donor, with cells of fast growth of the recipient, with the purpose of reverting the clinical profile of the diabetes mellitus.

A hybrid cell is the product of the fusion of two different somatic cells, that shows some morphological and physiological characteristics of both of them [7]. Their applications are diverse in the areas of genetics, cellular biology and immunology, mainly in expression, co-expression and/or suppression of genes, metabolic changes or adjustments, production of monoclonal antibodies, clonation, etc. [8].

Several biological, chemical and physical techniques exist that allow to obtain fused cells. Between these the most important are the use of the Sendai virus, polyethylenglycol and the electrofusion. Electrofusion presents greater advantages due to the absence of toxicity, its high performance of hybridizing, facility and minimal manipulation of the cells, which decreases in an important manner the risks of contamination [9].

The electrofusion consists in the exposition of the cells to alternate pulses of electrical current of different type and intensity. During a few seconds, the cell's dielectrophoresis phenomenon is promoted, where they are added in a pair or chain form under the influence of alternate electric current. Then, with a brief pulse of direct current, the adjacent membranes are fused, obtaining binucleated or polynucleated heterokaryon cells, that later will fuse their nuclei and will be divided in two hybrid cells [10, 11].

The hybrid cells grow in culture with greater speed than their progenitors and apparently the rejected phenomenon is attenuated or absent [7,11]. In preliminary works we have fused and transplanted total cells of the pancreas in rabbits obtaining good results in the control of the

diabetic profile although not the regression in total, nevertheless, in any of the cases the rejection of the transplant was presented. The transplant of electrofused cells allows the genetic recombination and the preservation of the histocompatibility markers, which could cause the decrease of the rejecting reaction and will allow these cells to maintain their capacity for insulin production and secretion in a natural form, taking into account the controls of physiological feedback of the recipient.

The objective of this work was to study the effect of the allogenic transplant of insular cells of a healthy donor animal, electrofused with dermic cells from a recipient diabetic animal on the clinical and biochemical profiles which included: body weight, food intake, water intake, diuresis, glycemia, uric acid, cholesterol, triglycerides, glutamate oxaloacetate transaminase, glutamate pyruvate transaminase, urea, creatinine, insulin, glycated hemoglobin in blood, and ketone bodies and glucose in urine.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Wistar male rats provided by the FES Iztacala UNAM bioterium were used. Four groups of four rats per group were formed: Group 1. Healthy animals (healthy control). Group 2 Diabetized animals with no treatment (diabetic control). Group 3. Transplant recipient rats with extraction of dermic cells which were mixed with pancreatic insular cells from a healthy donor (transplant without fusion), and Group 4. Transplant recipient rats with extraction of dermic cells which were electrofused with pancreatic insular cells from a healthy donor (transplant with fusion). All the groups were initially studied to determine their healthy state studying their profile and basal glycemia. Once determined the absence of disease, diabetes was induced by using alloxan solubilized in saline solution (150 mg/Kg i.p.) [12] in the rats of groups 2, 3 and 4

Only rats presenting a stable diabetic profile with glucose values up 240 mg/dL for a week were selected. To the recipient of transplant rats of each group, dermic cells were extracted, which were mixed or fused with pancreatic insular cells obtained from donating rats. The mixed or electrofused cells were implanted by a subdermic injection in the groups 3 and 4, respectively (Figure 1).

Clinical profiles were analyzed (weight, food and water intake, and diuresis) and laboratory tests were done: In blood: glycemia in fasting, uric acid, cholesterol, triglycerides, glutamate oxaloacetate transaminase, glutamate pyruvate transaminase, urea, creatinine, insulin, glycated hemoglobin. In urine: ketone bodies and glucose. These parameter were determined at 30, 60 and 90 days with the purpose of studying the evolution of the animals after transplant (Figure 1).

Isolation of dermic cells. Under anesthesia with 0.5 mL/Kg i.p. of pentobarbital (Anestesal Smith Kline-Beecham), rats were cleaned with antiseptic solution in the interscapular region, then a buttonhole fragment of skin of 3 X 2 cm was obtained and the subcutaneous cellular tissue carefully separated. Each fragment was deposited in trypsin at 0.25% at 4°C and maintained at this temperature for 24 hours under refrigeration to embed the tissue by the enzyme solution. After this, the enzyme was activated at 37°C for 30 min. The internal face of the tissue was scraped and the cells were gathered in Hank's bovine serum solution, and washed three times. The yield cells were determined by using the Neubauer Camera and the viability by exclusion of trypan blau [13].

Isolation of insular cells. The separation of islets was realized by the Lacy-Kostianovski technique, modified by Hiriart et al. [14, 15]. The rats were anesthetized with pentobarbital and an abdominal incision in V was practiced from the hypogastrium to the border of the ribs, the

hepatopancreatic duct was identified and the duodenum was clipped closing its opening.

Through this conduct 10 mL of cold Hank's bovine serum solution were injected, for breaking the acinar tissue and identify the pancreas, which was carefully dissected and finely cutted in fragments of 1-2 mm³ to be included in a solution of collagenase type IV (Worthington Chem) in Hank's bovine serum solution (3 mg/mL), and then incubated at 37°C during 10 min.

The islets were purified by a discontinuous gradient of bovine serum albumin (Sigma Chem. Co. St. Louis MO, USA) in Hank's bovine serum solution (10,23,28,40%) [16] and were disaggregated in a trypsin solution (2.5 mg/mL in Hank's bovine serum solution incubating at 35°C during 10 min. The production of the insular cells extraction was determined by Neubauer camera and the viability by exclusion of trypan blau.

Electrofusion. The electrofusion was made with the equipment constructed according to the Watt's design [17]. The dielectrophoresis was made generating an electric field with an alternating current pulse of sinusoidal type in the rank of radio frequency of 0.5 MHz of 10 Volts RMS (Farnell generator, model Sgi 0.1-100 MHz) of 20 seconds of duration. The electrofusion was made with a direct current pulse of 300 Volts of exponential decay with a duration of 1 millisecond (Power source 0.0-0.5 Amperes, 0-500 Volts of direct current. Allowing a post period of recovery of 60 seconds in the conditions of dielectrophoresis [18].

The performance was determined in the Neubauer camera by the count of mononucleated cells and binucleated cells. Cells containing more than two nuclei were considered polynucleated cells and each kind of cells were separated from the others by a discontinuous gradient of bovine serum albumin in Hank's bovine serum solution, using only the binucleated cells. The viability was determined by the exclusion of trypan blau.

Transplant of electrofused cells. The health state of the animals was determined by glycemia and clinical profile. To the recipient rats of each group (Groups 3 and 4), diabetes mellitus was induced [12] and their diabetic state were verified by the above described tests. Fragments of skin were dissected for the isolation of dermic cells by cold trypsinization according to the technique described previously. These cells were mixed (Group 3) or fused (Group 4) with pancreatic insular cells obtained from the donating rats by the technique established in point 2, whose state of health was also diagnosed by glycemia and clinic profile. The cells in both cases were counted, its viability was determined and its concentration was adjusted to 300,000 cells/mL, combining the dermic cells with the pancreatic cells in proportion 1:1 for the transplant without fusion via subdermic injection (Group 3). For the transplant with fusion (Group 4), the cells already combined were electrofused. The fusion products were quantified and cells viability was determined.

Blood for the biochemical parameters was obtained under anesthesia by cutting a nail of the back leg, these and the clinical determinations were made at 30, 60 and 90 days as follow:

Clinical.

BodyWeight (every 7 days). Diuresis, food intake and water intake (in 24 hours every 7 days).

Laboratory determinations.

In blood: Glycemia was measured by the enzymatic glucose oxidase-peroxidase method with reactive strips Haemo-glukotest and a glucometer Accutrend sensor (Boehringer Mannheim, Germany). Uric acid, cholesterol, triglycerides, glutamate oxaloacetate transaminase, glutamate pyruvate transaminase, urea and creatinine were determined by the quantitative method of reactive strips in a Reflotrón reflection photometer (Boehringer Mannheim, Germany). Insulin was determined by the immunoenzymatic method with a 5010 photometric system (Boehringer

Mannheim, Germany). Glycated hemoglobin was determined by the method of Latex-monoclonal antibody with an Analyzer DCA 200 (Bayer).

In Urine: Ketone bodies and glucose by the semiquantitative method with reactive Keto-Diastix strips (Bayer diagnoses).

Statistical analysis. Results were analyzed by two factors variance test (group and time). To the variables that were significant, the comparison of means of LSD (Fisher) was applied, with the purpose of determine what level of group factor had the greater significant difference ($p < 0.05$) at 90 days.

RESULTS

Figure 2a shows the increase of weight of the healthy control and transplant with fusion groups (Groups 1 and 4) against the lost of weight of diabetic control and transplant without fusion groups (Groups 2 and 3).

Figure 2b shows the increase of polyphagia in both groups with transplant and diabetic group (Groups 3,4 and 2, respectively) compared to the healthy group (Group 1).

Polydipsia was observed in the two transplanted groups (Groups 3 and 4) (Figure 2c) but its clearly going down meanwhile the diabetic control group (Group 2) is increasing.

Diuresis during 24 hours is presented in figure 2d with an increase about five times in the transplanted groups and the diabetic control group (Groups 3,4 and 2, respectively).

Figure 3a shows the hyperglucemia in the same three groups (Groups 3,4 and 2, respectively), but it can be seen that the transplant with fusion group (Group 4) present a discrete tendency to go down.

Figure 3b shows the concentration of insulin in blood and it is remarkable the difference between the diabetic control and transplant without fusion groups (Groups 2 and 3) with the healthy control and transplant with fusion groups (Groups 1 and 4). The production of insulin by the transplant with fusion group (Group 4) is near to the healthy control (Group 1)

The glycated hemoglobin (Figure 3c) appears to behave in the same way that the glycemia, however, the transplant with fusion group (Group 4) remains in the middle between the healthy control (Group 1) and the diabetic control groups (Group 2) better than the transplant without fusion group (Group 3).

Glycosuria was increased at days 60 and 90 in both transplanted groups and in the diabetic control group (Groups 3,4 and 2) (Figure 4a); and ketonuria (Figure 4b) is remarkable that the two transplant groups (Groups 3 and 4) remains close to the healthy control group (Group 1), specially the transplant with fusion group (Group 4).

The glutamate oxaloacetate transaminase and glutamate pyruvate transaminase activity levels at 90 days (Tables 1 and 2) remains higher in the diabetic control group (Group 1) and two rats have died before the 90 days of experiment, meanwhile in the transplant without fusion (Group 3) one of them died.

Respect to the cholesterol, triglyceride, cratinine, urea and uric acid profiles, any changes were not observed in serum levels (data not shown).

Significant differences ($p < 0.05$) were observed in the four groups studied for the following response variables: weight, diuresis, food, water, glycemia, insulin, glycated hemoglobin,

ketone bodies and glucose. For the rest of the variables cholesterol, triglycerides and creatinine no significant differences were presented ($p > 0.05$). Due to the nature and behavior of the transaminase assays, variability is very high and the activity of the enzymes cannot be analyzed by this method.

The comparison of means of LSD (Fisher) determined the level of group factor that had the greater significant difference ($p < 0.05$) at 90 days. The results by variables were as follow:

Body weight. It was observed a significant difference between the group of transplant with fusion (Group 4) and the diabetic control (Group 1) (Figure 2a).

Food intake. The groups diabetic control, transplant without fusion and transplant with fusion (Groups 2, 3 and 4) were statistically similar ($p > 0.05$), and different to the healthy control (Group 1) (Figure 2b).

Water intake. For the water consume the greater volume in average was for the diabetic control group (Group 2), being statistically different ($p < 0.05$) in relation to the transplanted groups (Group 3 and 4) (Figure 2c).

Diuresis. For this variable the groups diabetic control, transplant without fusion and transplant with fusion (Groups 2, 3 and 4) were equal, they resulted without statistical differences ($p > 0.05$) being different from the healthy control (Group 1) (Figure 2d).

Glycemia. In figure 3a the transplant with fusion group (Group 4) is different from the transplant without fusion and diabetic control groups (Groups 3 and 2) ($p < 0.05$) with an average of 315.75 mg/dL, 355.33 mg/dL and 360 mg/dL, respectively.

Insulin. Statistically significant differences ($p < 0.05$) in the transplant with fusion group (Group 4) were observed, in respect to the diabetic control and transplant without fusion groups (Groups 2 and 3) (Figure 3b).

Glycated hemoglobin. The healthy control group (Group 1) presented significant differences ($p < 0.05$) in respect to the diabetic control group and transplant with fusion group (Groups 2 and 4) with an average of 10.59 % and 8.53 % respectively, as it is observed in Figure 3c.

Glucose (in urine). The groups diabetic control and transplant without fusion (Groups 2 and 3) were statistically different ($p < 0.05$) compared to the transplant with fusion group (Group 4), with mean values of 1500 mg/dL, 2500 mg/dL and 1000 mg/dL, respectively (Figure 4a).

Ketone bodies (urine). Differences between these groups were observed, diabetic control (Group 2) with an average of 2.5 mg/dL and transplant with fusion (Group 4) with 1.25 mg/dL ($p < 0.05$) (Figure 4b).

DISCUSSION

Dermic and insular cells obtained, and its electrofusion showed a viability of 85-90 % according to trypan blau test.

In regards to the evolution of the control and transplanted animals, the healthy group (Group 1) maintained its parameters within the normal ranks when doing the evaluations at 30, 60 and 90 days and this values were used as reference in all the figures.

Blood concentrations of cholesterol, triglycerides, creatinine, urea and uric acid, did not have changes in any groups. The diabetic control group (Group 2) presented from the beginning high glucose levels in blood (240 mg/dL or higher), at 30 days, the clinical profile was clear, observing corresponding alterations to a diabetic state in almost all the parameters. None of the animals showed a tendency to improve spontaneously and the most remarkable point is the modification of the glutamate oxaloacetate transaminase activity at least in three of the animals. which means tissue injury, which probably was the cause of dead of two rats at 66 and 72 days.

The group of transplant without a fusion (Group 3) presented a clinical profile similar to the diabetic control group (Group 2), without improvement, in this group two rats show an increase in glutamate oxaloacetate transaminase and glutamate pyruvate transaminase, only one rat died at day 33.

In the group of transplant with fusion (Group 4) improvement was found in some of the parameters; body weight, water intake, glycemia, the insulin concentration, although it is underneath the normal, it was higher than in the group of transplant without fusion (Group 3), the glycated hemoglobin was higher in this group than in the healthy control group (Group 1), but lower than in diabetic control and the transplanted group without fusion (Groups 2 and 3). Ketone bodies and glucosuria were in the mid range between the healthy control and diabetic control (Groups 1 and 2, respectively) in both transplanted groups (Groups 3 and 4). Transaminase activities were found in low levels and a slight improvement was observed in some of the parameters in three rats (Group 4), none rat died.

Although the reversion of the diabetic profile was not obtained with the transplant of fused cells, it is important to emphasize that it was managed to locate the clinical and laboratory parameters in a rank between normal (Group 1) and those of the diabetic animals (Group 2). improving in comparison with the parameters found in the animals transplanted without fusion (Group 3), specially in the glycemia, insulin and glycated hemoglobin, it is also remarkable that none of the animals with transplant of fused cells (Group 4) died and their glutamate oxaloacetate transaminase and glutamate pyruvate transaminase levels were maintained in the limits near normality, in the urine parameters, even though the determinations have a rank of higher error because of the nature of the test, the same phenomenon happened.

In conclusion, this work indicates that it is possible to improve the diabetic profile by the transplantation of healthy donor insular cells fused with dermic cells from diabetic recipient.

It would be convenient to make a long term follow up with more experimental animals, so it would be possible to try to improve the results with a transplant of greater number of cells and the search of a better location of the transplant, perhaps by hematic via, like the one that is done with the transplant of free insular cells, however, at this moment by using reverse hemolytic assay we were able to demonstrate that hybrid cells obtained are producing insulin (data not shown). A relevant observation has been the absence of the apparent signs of rejection in the conditions of this study.

Acknowledgments

This research was supported by:

FES Iztacala UNAM Investigation Department

Division of Biological and Health Sciences UAM-Iztapalapa. México.

Medical Research Unit in Metabolic Diseases, National Medical Center, Mexican Institute of Social Security. México.

References

- [1] Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus Diabetes Care. Jan 2003; 26, Health Module: S5-S20.
- [2] Roman RR. Segmental transplantation of the pancreatic gland from the living donor (anatomical and experimental research). Problemi Endokrinology (Moskow) 1978; 24 (2): 70-77.
- [3] Román RR, Alexieyev YP, Kulik VP. Prospects in the treatment of diabetes mellitus patients: artificial pancreas, graft of the Langerhans islets, and transplantation of the pancreas. Problemi Endokrinology (Moskow) 1979; 25 (1): 81-92.
- [4] Burke GW, Ciancio G, Sollinger HW. Advances in pancreas transplantation. Transplantation 2004; 77(9 Suppl): S62-67.
- [5] Saudek CD. Bomba implantable de insulina frente a múltiples dosis de insulina para la diabetes mellitus no insulino dependiente. JAMA 1997; 5(4) 152-58.
- [6] Lakey JR, Rajotte RV, Fedorow CA, Taylor MJ. Islet cryopreservation using intracellular preservation solutions. Cell Transplant 2001;10(7):583-9.
- [7] Ringertz N, Savage R. Cell Hybrids. 1976; Academic Press, USA. pp 366.
- [8] Pells S, McWhir J. Studying nuclear reprogramming with cell hybrids. Methods Mol Biol 2004; 254: 301-12.
- [9] Wen H, Stenger D. Electrofusion of cells: Hybridoma production by electrofusion and polyethylenglycol. Induction of cell-cell fusion. In Methods in Enzimology 1993; 220: 212-27.
- [10] Zimmerman U, Veinken J. Electric field-induced cell-to-cell fusion. J. membrane Biol 1982; 67: 165-82.
- [11] Chang CD. Guide to electroporation and electrofusion. 1992. Academic Press. USA. pp 581.
- [12] Méndez JD, Ramos HG. Animal models in diabetes research. Arch Med Res 1994; 25(4): 367-75.
- [13] Freshney RI. Culture of animal cells. A manual of basic technique 1994; Wiley-Liss Inc.
- [14] Lacy PE, Kostianovsky M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. Diabetes 1976; 16: 35-9.
- [15] Hiriart M, Matteson DR. Na channels and two types of Ca Channels in rat pancreatic B cells identified with the reverse hemolytic plaque assay. J. Gen Physiol 1988; 91: 617-39.
- [16] Lake SP. Bovine serum albumin density gradient isolation of rat pancreatic islets. Transplantation 1987; 43(6): 805-8.
- [17] Watt JW, King JM. A simple method for large scale electrofusion and culture of plant protoplasts. Bioscience 1984; 4: 335-42.

[18] Barrera EE, Vilches FA, Fregoso PM, Vargas VA, Castillo PI, Martínez AJ, Velasco LR. Parámetros de electrofusión para células pancreáticas. *Bioquímica* 1997; 22 (3):722-6.

Figure legends

Figure 1. Experimental procedure for transplanting electrofused pancreatic islet cells and dermic cells in diabetic rats.

Figure 2a. Clinical parameters: Values of body weight at 30, 60 and 90 days

○ Healthy control (Group 1), ■ Diabetic control (Group 2), ▲ Transplant without fusion (Group 3), • Transplant with fusion (Group 4).

Each value is the mean of four determinations.

Figure 2b. Clinical parameters: Food intake during 24 h values registered at 30, 60 and 90 days.

○ Healthy control (Group 1), ■ Diabetic control (Group 2), ▲ Transplant without fusion (Group 3), • Transplant with fusion (Group 4).

Each value is the mean of four determinations.

Figure 2c. Clinical parameters: Water intake during 24 h values taken at 30, 60 and 90 days.

○ Healthy control (Group 1), ■ Diabetic control (Group 2), ▲ Transplant without fusion (Group 3), • Transplant with fusion (Group 4).

Each value is the mean of four determinations.

Figure 2d. Clinical parameters: Diuresis during 24 h values taken at 30, 60 and 90 days.

○ Healthy control (Group 1), ■ Diabetic control (Group 2), ▲ Transplant without fusion (Group 3), • Transplant with fusion (Group 4).

Each value is the mean of four determinations.

Figure 3a. Biochemical parameters: Fasting glycemia, values taken at 30, 60 and 90 days

○ Healthy control (Group 1), ■ Diabetic control (Group 2), ▲ Transplant without fusion (Group 3), • Transplant with fusion (Group 4).

Each value is the mean of four determinations.

Figure 3b. Biochemical parameters: Blood insulin concentration, values taken at 30, 60 and 90 days

○ Healthy control (Group 1), ■ Diabetic control (Group 2), ▲ Transplant without fusion (Group 3), • Transplant with fusion (Group 4).

Each value is the mean of four determinations.

Figure 3c. Biochemical parameters: Glycated hemoglobin, values taken at 30, 60 and 90 days

○ Healthy control (Group 1), ■ Diabetic control (Group 2), ▲ Transplant without fusion (Group 3), • Transplant with fusion (Group 4)

Each value is the mean of four determinations.

Figure 4a. Biochemical parameters: Urine glucose, values taken at 30, 60 and 90 days

○ Healthy control (Group 1), ■ Diabetic control (Group 2), ▲ Transplant without fusion (Group 3), • Transplant with fusion (Group 4).

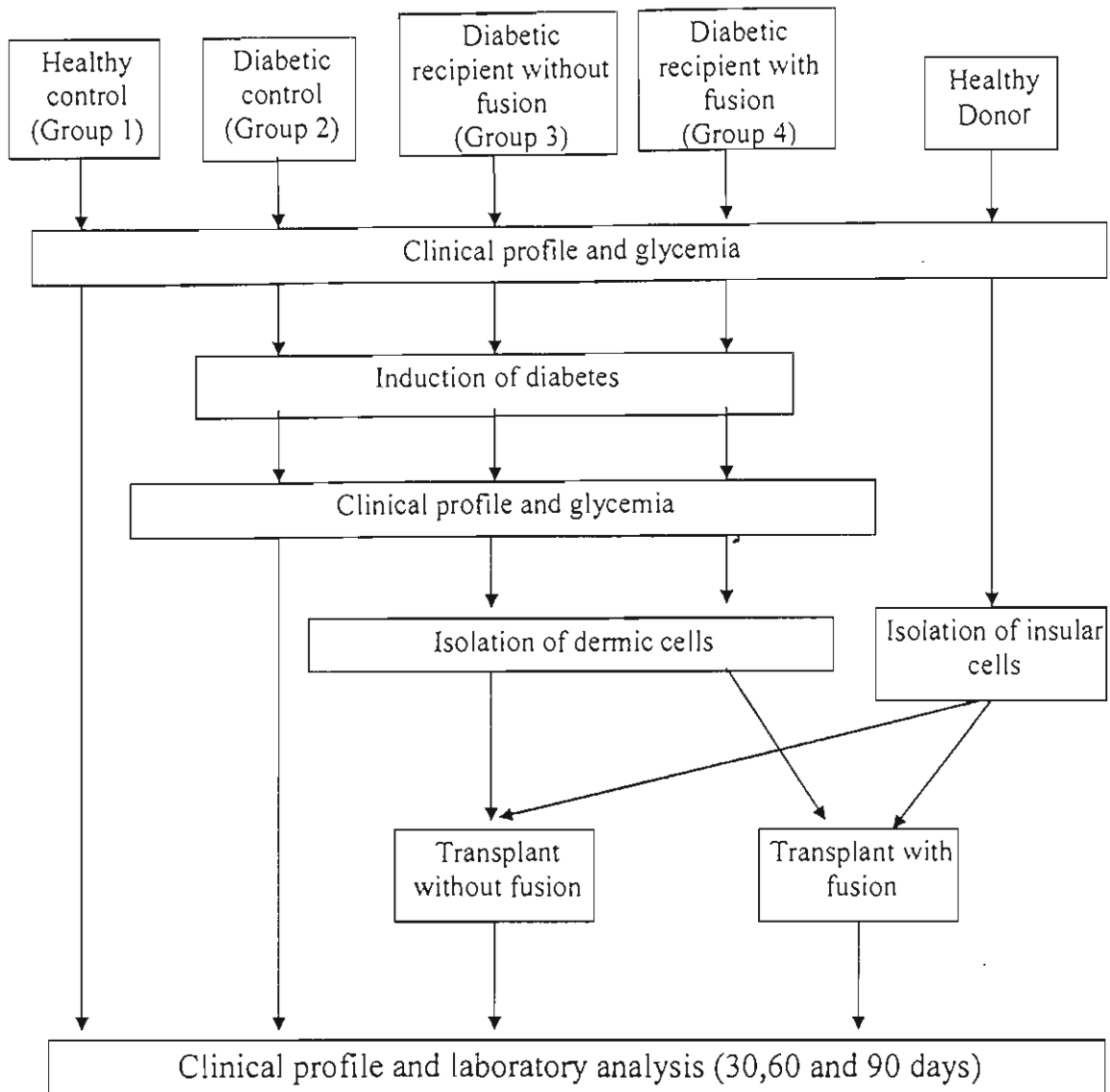
Each value is the mean of four determinations.

† dead

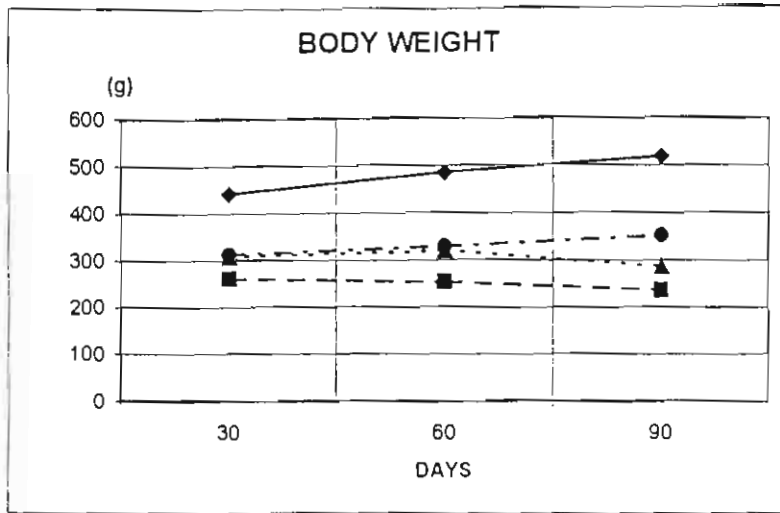
Figure 4b. Biochemical parameters: Ketone bodies, values taken at 30, 60 and 90 days
□ Healthy control (Group 1), ■ Diabetic control (Group 2), ▲ Transplant without fusion (Group 3), • Transplant with fusion (Group 4).
Each value is the mean of four determinations.
† dead

Table 1. Glutamate oxaloacetate transaminase activity at 90 days
Each value correspond to one rat. The enzyme activity is expressed as I.U.

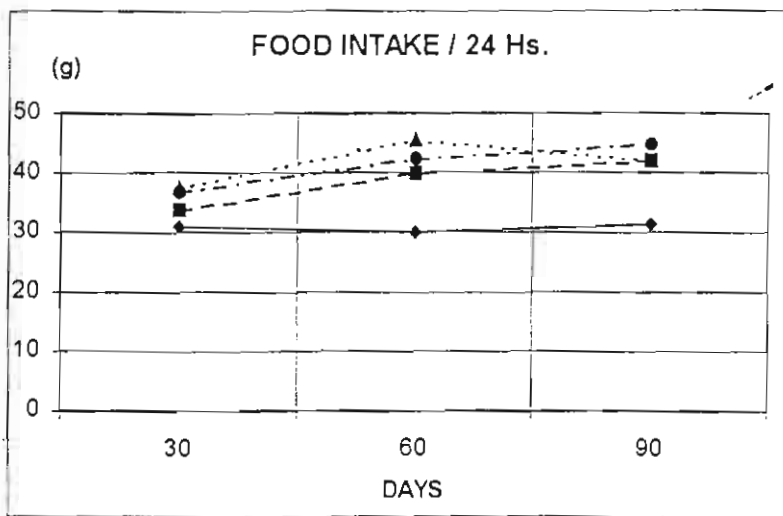
Table 2. Pyruvate oxaloacetate transaminase activity at 90 days
Each value correspond to one rat. The enzyme activity is expressed as I.U.



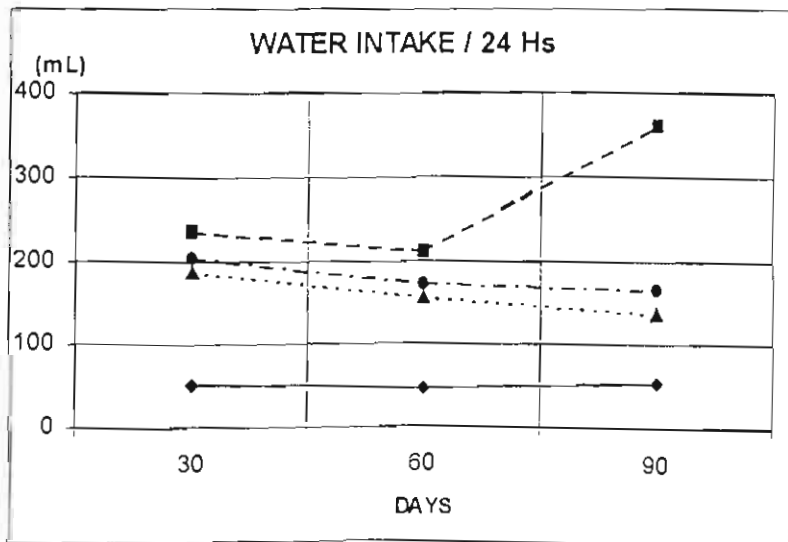
1



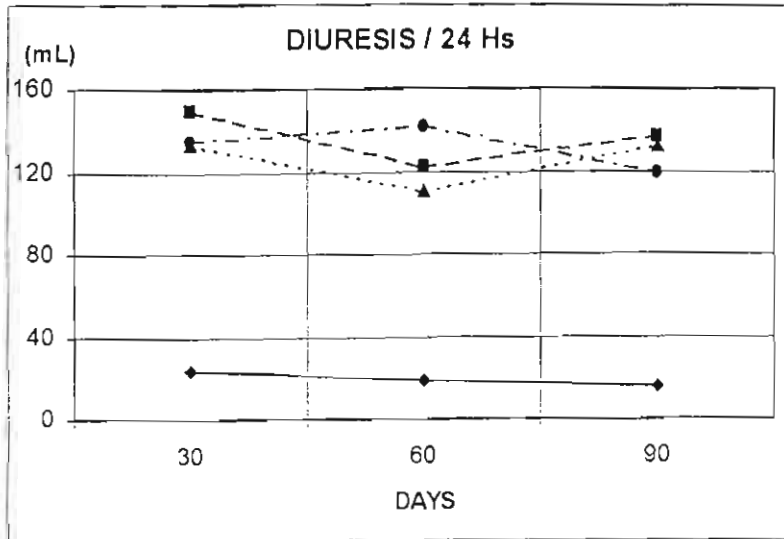
2a



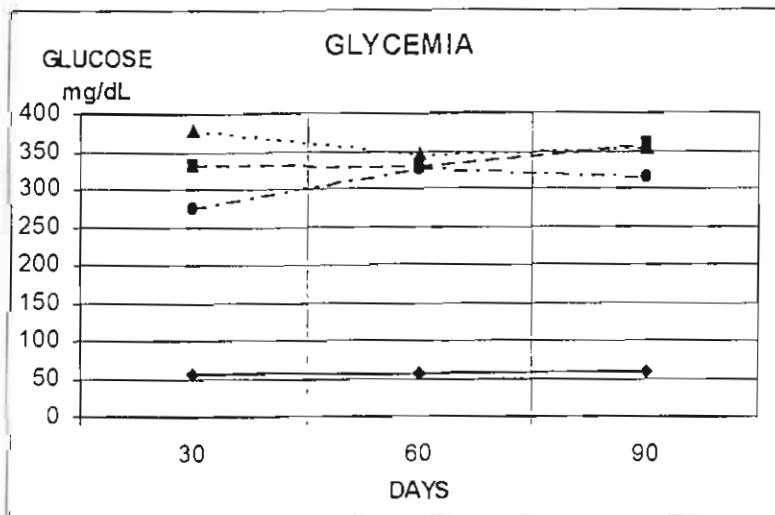
2b



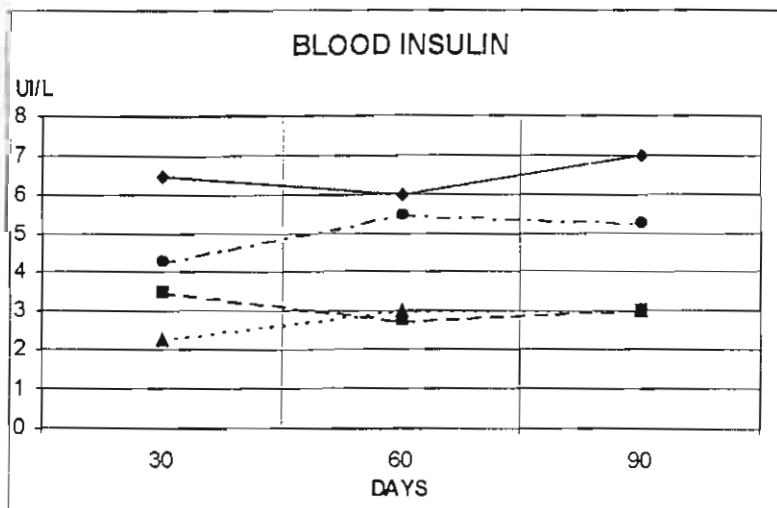
2c



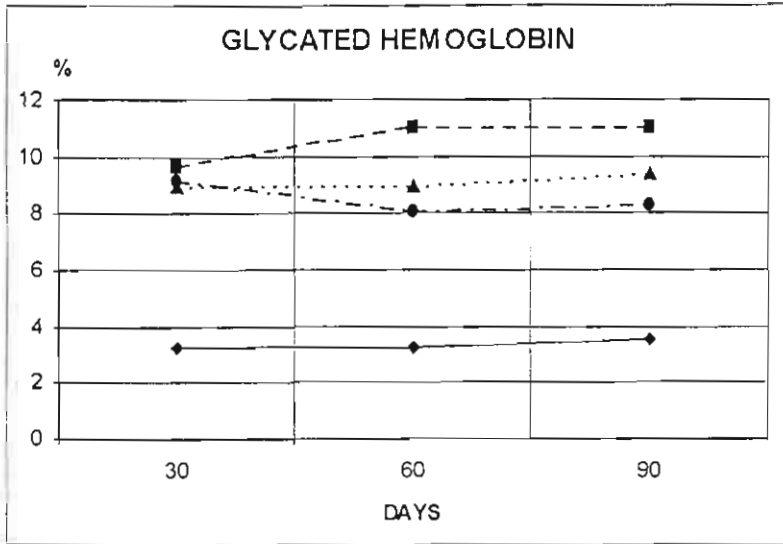
2d



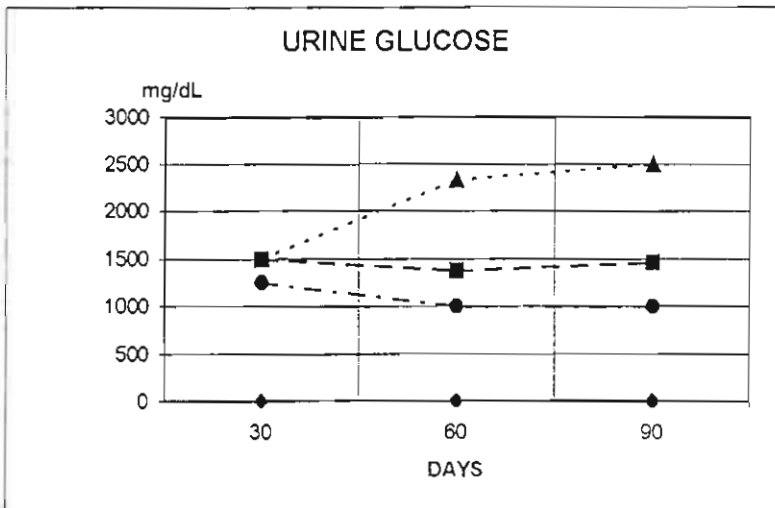
3a



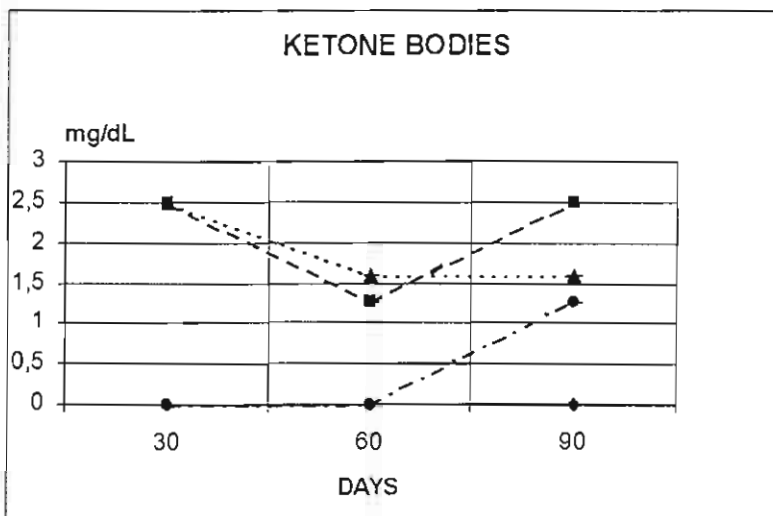
3b



3c



4a



4b

Table 1. Glutamate oxaloacetate transaminase activity at 90 days.

Healthy control	Diabetic control	Transplant without fusion	Transplant with fusion
48.2	62.4	124.0	154.0
65.9	† 66 Days	† 30 Days	72.6
43.2	> 600.0	62.3	41.0
128.0	† 72 Days	450.0	41.0

Each value correspond to one rat. The enzyme activity is expressed as I.U.

Table 2. Pyruvate oxaloacetate transaminase activity at 90 days.

Healthy control	Diabetic control	Transplant without fusion	Transplant with fusion
34.5	34.5	87.9	61.5
44.1	† 66 Days	† 30 Days	60.1
32.2	287.0	39.5	148.0
52.4	† 72 Days	118.0	38.0

Each value correspond to one rat. The enzyme activity is expressed as I.U.