

**Tesi Doctoral**

**TRASPLANTAMENT SINGÈNIC D'ILLOTS PANCREÀTICS A  
VESÍCULES SEMINALS DE RATES DIABÈTIQUES: ANÀLISI  
EXPERIMENTAL**

**Alexis Luna Aufroy**

**2003**

**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**

**Facultat de Medicina**

**U.D. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol**

**DEPARTAMENT DE CIRURGIA**

Memòria presentada pel llicenciat **ALEXIS LUNA AUFROY** per optar al grau de Doctor en Cirurgia.

Directors de tesi:

- Doctor **Joan-Francesc JULIÁN IBAÑEZ**, cirurgià de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol i professor associat de la Facultat de Medicina de l'HUGTiP de la UAB.
- Doctora **Marta VIVES PI**, investigadora biomèdica de l'Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol i professora associada mèdica de la UAB.

Tutors:

- Professor **Jaume FERNÁNDEZ-LLAMAZARES RODRÍGUEZ**. Catedràtic de Cirurgia. Departament de Cirurgia de la UAB.
- Professor **Ricardo PUJOL BORRELL**. Catedràtic d'Immunologia. Departament de Biologia cel.lular, Fisiologia i Immunologia de la UAB.

Per al **Manel Noci**,  
a qui ara no sento, però  
no he deixat d' escoltar.

## AGRAÏMENTS

Per al **Prof. Jaume Fdez-Llamazares**, tutor, professor i amic des dels meus inicis a la cirurgia, que m'ha estimulat en el treball diari com a cirurgià i científic. Agraeixo l'entusiasme, perseverància, experiència i aportacions quirúrgica i científica, sense les quals aquest treball no hagués estat possible.

Per al **Prof. Ricardo Pujol**, cap visible de l'investigació al nostre àmbit hospitalari i universitari, qui ha aconseguit mantenir durant anys l'il·lusió i afany investigador dels diferents grups d'altres especialitats, com la cirurgia.

Per al **Dr. Joan Francesc Julián**, pare de la idea original d'aquest treball, amic i company inseparable de laboratori, qui m'ha introduït al món de l'experimentació animal i amb qui he dissecat tots els racons de les rates.

Per a la **Dra. Marta Vives Pi**, entusiasta, il·lustrada i emprenedora científica, pels seus infinits coneixements sobre els illots de pàncreas que per òsmosi he pogut aprofitar, i per la seva intensa dedicació en desenvolupar aquest treball.

Per al **Dr. Francesc Garcia-Cuyás**, company i amic de Residència, de qui he rebut el testimoni i motivació per a l'investigació, per la seva sempre sàbia aportació quirúrgica i logística.

Per al **Dr. Marc-Antoni Broggi**, pel seu apreciat suport en el desenvolupament d'aquest treball i de qui aprecio especialment els seus consells.

Per a **Aurora Alba**, amant i estudiosa dels animals que ha aportat els coneixements i consells necessaris per a garantir la bona praxi en la manipulació animal.

Per a la **Dra. Maite Fernández-Figueras**, experta patòloga en l'estudi histològic del trasplantament d'illots, per l'anàlisi anatomopatològic d'aquest treball.

Per a la **Marga**, responsable i cuidadora del Centre d'Experimentació Animal, que per l'entusiasme i professionalitat que mostra continuament, m'ha fet apreciar i cuidar aquests rosegadors.

Per al **Dr. Josep Roca**, expert estadístic del nostre centre per l'ajut inestimable en el càlcul estadístic.

Per a **Roger Colobran**, amb qui sempre és un plaer treballar, per la seva col·laboració a la purificació dels illots.

Per a tot el Servei de Cirurgia: **Dr. Alastrué, Dr. Alberó, Dr. Camps, Dr. Oller, Dra. Piñol, Dr. Rodríguez, Dr. Rull, Dr. Salas, Dr. Sastre**, de qui sempre he rebut col·laboració, tracte humà i amb qui m'he format com a cirurgià.

Per a tots els companys de residència: **Dra. Torres, Dr. de la Cruz, Dr. Troya, Dra. Jané, Dra. Fernández, Dra. Escolà, Dra. Falgueras, Dra. Guerrero, Dra. Pascual, Dr. Pacha, Dr. Herrero, Dra. Cuadrado, Dra. Pérez**, amb qui tant hem compartit, de qui tant he après i per tot el que hem passat junts.

Per als meus pares, **Fede i Evelyne**, autèntics responsables que avui sigui aquí, per la seva estima, pels valors que m'han ensenyat i per l'impagable esforç que han fet per que la meva formació fos possible.

Per a la **Dra. Conchita Santiago (Chicha)** i el **Dr. Manel Noci**, que m'han ensenyat molt de la vida i m'han fet estimar i escollir la meva vocació, la Medicina.

Per als amics i familiars que no menciono, que saben lo importants que han estat i que han hagut d'escoltar (o suportar) dissertacions sobre les rates i els illots.

I finalment, per a la meva esposa, la **Maria**, que ha viscut els inicis d'aquest treball, n'ha suportat el desenvolupament i ara pot veure'n els fruits que l'han portat a apreciar, fins i tot, uns animals que abans la feien pujar a les cadires. Agraieixo sincerament el seu recolzament diari.

## ÍNDEX

---

<b>I.</b>	<b>MOTIU I JUSTIFICACIÓ</b>	<b>1-2</b>
<b>II.</b>	<b>INTRODUCCIÓ</b>	<b>3-59</b>
	II.1. Anatomia dels illots de Langerhans	4
	II.1.1. Cèl.lula $\beta$	5
	II.1.2. Cèl.lula $\alpha$	5
	II.1.3. Cèl.lula $\delta$	6
	II.1.4. Cèl.lula PP	6
	II.1.5. Cèl.lula EC	6
	II.1.6. Variabilitat dels illots	6
	II.1.7. Vascularització i microcirculació dels illots	7
	II.1.8. Inervació dels illots	8
	II.1.9. Modulació intra-illot	8
	II.2. Cèl.lula $\beta$ : fisiologia	9
	II.2.1. Biosíntesi d'insulina	9
	II.2.2. Secreció d'insulina	10
	II.3. Autoimmunitat i diabetis tipus 1	12
	II.3.1. Autoimmunitat: definició	12
	II.3.2. Malalties autoimmunitàries	12
	II.3.2.1. Malalties organ-específiques	13
	II.3.2.2. Malalties no organ-específiques	13
	II.3.3. Diabetis tipus 1: definició i epidemiologia	13
	II.3.4. Complicacions de la diabetis	14
	II.3.5. Costos econòmics associats a la diabetis	15
	II.3.6. Diabetis tipus 1: etiopatogènia	15
	II.3.7. Alteracions immunològiques	16
	II.3.8. Autoanticossos	18
	II.3.9. Destrucció de la cèl.lula $\beta$	20
	II.4. Models animals de DM tipus 1: espontanis, induïts i transgènics	22
	II.4.1. Models animals espontanis de DM tipus 1	22
	II.4.1.1. Ratolí NOD	22



---

II.4.1.2. Rata BB	23
II.4.2. Inducció experimental de DM tipus 1	25
II.4.2.1. Inducció quirúrgica	25
II.4.2.2. Inducció per virus	25
II.4.2.3. Inducció química	26
II.4.2.3.a. Aloxa	26
II.4.2.3.b. Estreptozotocina	26
II.4.3. Models animals transgènics de DM tipus 1	28
II.5. Tractament mèdic de la DM1D: Insulinoteràpia	30
II.6. Tractament quirúrgic de la diabetis: Trasplantament	32
II.6.1. Trasplantament de pàncreas	32
II.6.2. Trasplantament d'illots de Langerhans	35
II.6.2.1. Antecedents històrics	36
II.6.2.2. Trasplantament d'illots experimental	38
II.6.2.3. Diferents localitzacions de l'ingert	41
II.6.2.4. Problemàtica del trasplantament d'illots	44
II.6.2.5. Trasplantament d'illots en humans: situació actual	45
II.7. Les vesícules seminals com a òrgan hoste	49
II.7.1. Anatomia i fisiologia de les vesícules seminals	49
II.7.1.1 Humans	49
II.7.1.2 Rates	50
II.8. Perspectives futures en el tractament de la diabetis	52
II.8.1. Immunomodulació d'illots pancreàtics	52
II.8.2. Immunoaïllament d'illots pancreàtics	54
II.8.3. Xenotrasplantament	54
II.8.4. Trasplantament fetal	56
II.8.5. Teràpia gènica	57
II.8.6. Línies cel.lulars	57
II.8.7. "Stem cells"	58

<b>III. HIPÒTESI</b>	<b>60-61</b>
<b>IV. OBJECTIUS</b>	<b>62-63</b>
<b>V. MATERIAL I MÈTODES</b>	<b>64-79</b>
V.1. Animal d'experimentació	65
V.1.1. Rata Lewis	65
V.1.2. Nombre de rates	66
V.1.3. Condicions d'establució	66
V.2. Inducció de la diabetis a les rates receptores	67
V.3. Extracció dels pàncreas donants	68
V.4. Aïllament dels illots de Langerhans	69
V.5. Recompte, puresa, viabilitat i avaluació dels illots obtinguts	71
V.5.1. Recompte d'illots	71
V.5.2. Puresa	71
V.5.3. Viabilitat	71
V.5.4. Avaluació funcional	72
V.6. Estudi <i>in vitro</i>	72
V.6.1. Determinació del contingut i secreció d'insulina	72
V.6.2. Estudi de toxicitat amb Cr51	73
V.7. Estudi <i>in vivo</i> de viabilitat dels illots: trasplantament a càpsula renal	74
V.8. Trasplantament d'illots pancreàtics a les vesícules seminals	75
V.9. Monitorització del trasplantament	77
V.10. Reversibilitat de la diabetis	77
V.11. Extracció de les vesícules seminals	78
V.12. Estudi immunohistològic	78
V.13. Estudi estadístic	79

---

<b>VI . RESULTATS</b>	<b>80-108</b>
VI.1. Estudi <i>in vitro</i>	81
VI.1.1. Secreció d'insulina	81
VI.1.2. Contingut d'insulina	81
VI.1.3. Cocient secreció/contingut d'insulina	82
VI.1.4. Toxicitat	83
VI.2. Extracció vesícula implantada: retorn a la diabetis	84
VI.2.1. Taula de seguiment de glicèmies	85
VI.2.2. Gràfica de seguiment de glicèmies	86
VI.3. Evolució del pes en funció de l'èxit del trasplantament	87
VI.4.1. Taules de seguiment del pes	88
VI.4.1.1. Grup control	88
VI.4.1.2. Grup empelt funcionant	88
VI.4.1.3. Grup empelt parcialment funcionant	89
VI.4.1.4. Grup empelt no funcionant	90
VI.4.1.5. Grup STZ tòxica	90
VI.4.2. Gràfica de seguiment del pes	91
VI.4. Evolució de la glicèmia en funció de l'èxit del trasplantament	92
VI.4.1. Taules de seguiment de glicèmies	93
VI.4.1.1. Grup control	93
VI.4.1.2. Grup empelt funcionant	93
VI.4.1.3. Grup empelt parcialment funcionant	94
VI.4.1.4. Grup empelt no funcionant	95
VI.4.1.5. Grup STZ tòxica	96
VI.4.2. Gràfiques de seguiment de glicèmies	97
VI.4.2.1. Grup control	97
VI.4.2.2. Grup empelt funcionant	98
VI.4.2.3. Grup empelt parcialment funcionant	99
VI.4.2.4. Grup empelt no funcionant	100

VI.4.2.5. Grup STZ tòxica	101
VI.4.2.6. Mitges dels 5 grups	102
VI.4.3. Resposta al trasplantament	103
VI.4.4. Efecte tòxic de l'estreptozotocina	104
VI.5. Anàlisi histològic de les vesícules trasplantades	105
VI.6. Estudi comparatiu: càpsula renal vs vesícula seminal	107
<b>VII. DISCUSSIÓ</b>	<b>109-117</b>
VII.1. Plantejament	110
VII.2. Resultats	112
VII.3. Factors que alteren la funcionalitat	113
VII.4. Limitacions de l'estudi	115
VII.5. Estreptozotocina	115
VII.6. Futur	116
<b>VIII. CONCLUSIONS</b>	<b>118-119</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>120-134</b>
<b>X. ARTICLES I COMUNICACIONS</b>	<b>135-136</b>
<b>Abreviacions</b>	<b>137</b>

## **I.MOTIU I JUSTIFICACIÓ**

Seguint la línia d'investigació del nostre centre en trasplantament experimental d'illots de pàncreas, iniciada pel grup del Dr Ricardo Pujol i Borrell, catedràtic d'Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona, amb la col.laboració dels Drs Jaume Fernández-Llamazares Rodríguez, catedràtic de Patologia i Clíniques Quirúrgiques de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) i Joan-Francesc Julián Ibañez, professor associat de la Facultat de Medicina de l'HUGTiP de la UAB, que s'ha plasmat amb les tesis doctorals de Francesca Vargas Nieto: "Islotes pancreáticos para el trasplante. Mejora de la purificación e identificación de la actividad endotóxica de la colagenasa como posible factor del fallo del injerto" (Octubre 1997) i la de Francesc García-Cuyàs: "Estudio comparativo de la colagenasa y la liberasa en la obtención y trasplante de islotes pancreáticos. Análisis experimental" (Octubre 2000), hem volgut aprofitar l'experiència adquirida per iniciar aquest nou repte d'investigació.

Donat que en l'experimentació amb rates, les vesícules seminals són òrgans de fàcil abordatge quirúrgic, que el trasplantament en aquests òrgans suposa una baixa morbimortalitat, i donades l'estructura anatòmica, histològica i la fisiologia de les vesícules seminals, creiem que poden ser òrgans immunològicament privilegiats que, com en el cas del testicle, poden permetre el trasplantament sense immunosupressió sistèmica (Baeker et al, 1977), però l'experiència fins a l'actualitat és nul.la.

Els esperançadors estudis preliminars, publicats pel nostre grup a la revista *Trasplantation Proceedings* (Luna et al, 2002), justifiquen el gran esforç personal i econòmic d'aquest repte científic.

## II. INTRODUCCIÓ

## II.1. ANATOMIA DELS ILLOTS DE LANGERHANS

El pàncreas és un òrgan format per elements exocrins i endocrins. L'exocrí consta de nombrosos conductes i acins lobulars, connectats per teixit connectiu i recoberts per una fina càpsula. La seva funció és la de sintetitzar, emmagatzemar i secretar enzims digestius.

Els illots de Langerhans van ser descrits per Paul Langerhans al 1869. Es troben inclosos en el sí del teixit exocrí i constitueixen l'element endocrí del pàncreas. Representen aproximadament l'1% de la massa pancreàtica. Un pàncreas normal d'home adult té entre  $10^5$ - $2 \times 10^6$  illots. Cada un d'ells conté des d'uns pocs cents fins a milers de cèl.lules endocrines (Johnston et al, 1988). Es localitzen propers als vasos capil.lars per poder secretar les hormones produïdes. Es diferencien del teixit parenquimatós per la seva baixa afinitat a les tincions d'hematoxilina-eosina.

Quatre tipus de cèl.lula formen l'illot pancreàtic: les cèl.lules  $\beta$  (beta), productores d'insulina, que es tenyeixen amb aldehyd de fucsia de Gomori; les cèl.lules  $\alpha$  (alfa), productores de glucagó, que es tenyeixen amb la tècnica argèntica de Grimelius; les cèl.lules  $\delta$  (delta), secretores de somatostatina, que tenyeixen amb la tècnica argèntica de Helleström-Hellman; i les cèl.lules PP, que produeixen el polipèptid pancreàtic. També s'han identificat altres tipus cel.lulars d'una rellevància difícil de valorar (Bonner-Weir et al, 1993).

L'estructura de l'illot pancreàtic, en els mamífers no humans, està ben definida: les cèl.lules  $\beta$  formant un nucli, estan rodejades de cèl.lules no  $\beta$  formant d'una a tres capes. Aquesta distribució cel.lular és molt semblant a la de l'èsser humà a les primeres etapes de la vida, essent aquesta distribució menys evident a l'adult (Weir et al, 1990). Mitjançant reconstruccions tridimensionals s'ha pogut veure que l'estructura de l'illot humà està formada per una massa de cèl.lules  $\beta$ , de les quals, part d'elles estan en contacte amb cèl.lules no  $\beta$ , degut a aquest tipus d'estructuració espacial. S'accepta la hipòtesi que l'illot es divideix segons una sèrie d'interaccions paracrines,



endocrines o d'interacció cel.lulars per unions intercel.lulars (Weir et al, 1990a).

L'illot pancreàtic està format per una xarxa de capil.lars fenestrats, distribuïnt-se, les cèl.lules endocrines, al voltant d'ells. La majoria de vegades l'illot està rodejat per una xarxa de fibroblasts i fibres de col.lagen que fa de separació amb el teixit exocrí, tot i que no sempre és així. En algunes ocasions, la única separació que existeix són les mateixes membranes cel.lulars (Bonner-Weir et al, 1993).

### **II.1.1. Cèl.lula $\beta$ (beta)**

Representen el 80% de totes les cèl.lules endocrines i se situen al centre de l'illot rodejant els capil.lars venosos. Són polièdrics i d'un diàmetre d'entre 10 i 15  $\mu\text{m}$ . Cadascuna d'aquestes cèl.lules conté uns 10.000 grànuls de secreció (Dean et al, 1973) que són alliberats per entrar als capil.lars des de la superfície latero-apical. Es poden diferenciar dos tipus de grànuls  $\beta$  depenent del seu estat maduratiu: els madurs, d'aspecte cristal·lí amb nucli electrodens, degut al seu contingut d'insulina i zenc; i els immadurs, que es diferencien per la presència d'un halus perifèric electrolúcid (Orci et al, 1985). La seva principal funció és la secreció d'insulina.

### **II.1.2. Cèl.lula $\alpha$ (alfa)**

Són les cèl.lules encarregades de la producció del glucagó. Representen el 8 a 12% de la massa total de l'illot. Es localitzen a la perifèria de l'illot. A més del glucagó produeixen altres pèptids com el glucagó-like i el pèptid inhibidor gàstric.

### **II.1.3. Cèl.lula $\delta$ (delta)**

Són les productores de somatostatina. Tenen una configuració dendrítica. Representen el 3-4% de la massa cel.lular endocrina. Es distribueixen de forma molt variable.

### **II.1.4. Cèl.lula PP**

Són les més variables. Habitualment es localitzen a la part posterior del cap del pàncreas. La seva principal funció és la secreció del polipèptid pancreàtic. Constitueixen el 2% de la massa cel.lular.

### **II.1.5. Cèl.lula EC (enterocromafi)**

Es troben ocasionalment als illots. Tenen la mateixa morfologia que les que es troben a nivell del sistema endocrí del budell.

### **II.1.6. Variabilitat dels illots**

Les diferències existents a la composició cel.lular dels illots pancreàtics s'explica pel seu origen embriològic. Aquests deriven de cèl.lules epitelials dels ductes, d'origen endodèrmic. . El component endocrí deriva dels elements ductals que, a la vegada, deriven de l'intestí anterior de l'embrió en desenvolupament. A part de la seva composició cel.lular, també és variable el tamany de l'illot. Pot tenir des d'un escàs número de cèl.lules amb un tamany petit fins a tenir un tamany de 450  $\mu\text{m}$  de diàmetre amb més de 5.500 cèl.lules. El tamany és espècie dependent. El diàmetre mig de l'illot de rata és de 150  $\mu\text{m}$  amb un contingut d'uns 50 ng d'insulina. El 75% dels illots a la rata, són menors de 160  $\mu\text{m}$  representant un volum del 15%, mentre que els majors de 250  $\mu\text{m}$  representen el 15% del total d'illots, però un 60% del volum total.

### **II.1.7. Vascularització i microcirculació dels illots**

S'havia descrit que els illots estaven formats per un entramat vascular capil·lar en forma de glomèrul amb un aport directe de sang arterial que irrigava primer l'illot i posteriorment el teixit exocrí. Però l'aparició dels treballs d'Orci (Orci et al, 1982) va demostrar que existeixen arterioles aferents fenestrades, a diferència de les arterioles que irriguen el teixit exocrí, que penetren a l'illot per una zona pobre en cèl·lules  $\beta$  i que connecten amb una zona de capil·lars venosos que atravessen la zona poblada per cèl·lules  $\beta$ .

El fluxe sanguini dels capil·lars que irriguen els illots és molt elevat (10-20% del fluxe pancreàtic) per el volum que representen (1-2% del pàncreas) (Jansson L et al, 1981).

Mitjançant aquest tipus d'estructuració vascular es crea una zona d'autoregulació intra-illot. La zona irrigada per les arterioles aferents (provinents directament de la circulació arterial sistèmica) estarien enriquides amb glucagó i somatostatina. Aquestes hormones serien transportades fins a la zona rica en cèl·lules  $\beta$  on tindria lloc la regulació hormonal.

Existeixen una sèrie de factors que regulen el fluxe sanguini i que, per tant, afecten la secreció hormonal. Altes concentracions de glucosa produeixen un augment significatiu de l'aport vascular pancreàtic, preferentment cap als illots (Jansson et al, 1983). També el pèptid relacionat amb el gen de la calcitonina, que es troba a nivell dels nervis dels illots i a les cèl·lules endocrines, és vasoactiu a aquest nivell (Brain SD et al, 1985).

#### **II.1.8. Inervació dels illots**

L'inervació pancreàtica és a través de fibres simpàtiques i parasimpàtiques. A nivell simpàtic, pel gangli celiac a la porció dorsal i del gangli mesentèric a la porció ventral. A nivell parasimpàtic, per fibres del nervi vagus que sinapsen en petits ganglis dispersos pel pàncreas (Sundler et al, 1991).

La secreció endocrina pot estar modulada pels neurotransmisors alliberats pel sistema nerviós vegetatiu, ja que a nivell de l'illot s'han pogut trobar receptors per a les catecolamines, acetilcolina i d'altres neuropèptids (Samols E, 1979).

#### **II.1.9. Modulació intra-illot**

La modulació intra-illot es basa en el fet que la secreció hormonal d'un tipus de cèl.lules insulars pot afectar altres cèl.lules de l'illot. D'aquesta manera és sabut que la insulina inhibeix la secreció de les cèl.lules  $\alpha$  i  $\delta$ , el glucagó estimula la secreció de les cèl.lules  $\beta$  i  $\delta$ , i la somatostatina inhibeix la secreció de les cèl.lules  $\alpha$  i  $\beta$ . D'aquesta manera es crea el concepte de la regulació intra-illot (Weir GC et al, 1990a).

## **II.2. CÈL.LULA $\beta$ : FISIOLOGIA**

### **II.2.1. Biosíntesi d'insulina**

Les cèl.lules  $\beta$  secreten pèptids producte de la síntesi d'insulina, com la insulina, proinsulina o el pèptid C, o independents de la síntesi d'insulina, com la amilina. Aquesta és coprocessada i cosecretada per les cèl.lules  $\beta$  junt amb la insulina.

La insulina, principal hormona reguladora del metabolisme de la glucosa, va ser aïllada del teixit pancreàtic al 1921 per Banting i Best (Banting FG et al, 1922). El gen de la insulina humana es localitza a la regió p13 del braç curt del cromosoma 11 (Bell GI et al, 1980), estant constituït per una regió reguladora, 3 exons (regions codificables) i 2 introns (regions no codificables).

La síntesi d'insulina s'inicia amb la traducció de l' RNAm al reticle endoplasmàtic rugós (RER) de la cèl.lula  $\beta$ , que origina un precursor o preprohormona, la pre-proinsulina (Steiner DF et al, 1967). La preproinsulina és una cadena polipeptídica llarga formada per un pèptid senyal, comú a totes les preprohormones i a la proinsulina (Guest et al, 1992). El pèptid senyal dirigeix la prehormona cap a la llum del RER on s'escindeix per un enzim endoproteolític específic associat amb el RER (Patzelt et al, 1978). Es forma la proinsulina al plegar-se els residus aminoàcids restants, de forma que s'estableixen ponts disulfurs entre dos cadenes, la A i la B. Entre aquestes dos cadenes es troba el pèptid C o de connexió. La proinsulina és emmagatzemada en microvesícules i es transportada al pol cis de l'aparell de Golgi.

Posteriorment, al compartiment trans de l'aparell de Golgi es formen els grànuls de secreció, encara immadurs, però dins dels quals comença la conversió de la proinsulina en insulina.

La conversió de la proinsulina en insulina es produeix quan actuen sobre la mol.lècula de proinsulina dos endopeptidasses: la PC2 (o mPC1) i la PC3, i la exopeptidasa: la carboxipeptidasa H. Les endopeptidases actuen escindint els dos aminoàcids que per cada extrem uneixen el pèptid C (o pèptid de connexió) a les cadenes A i B, i la carboxipeptidasa H elimina els aminoàcids exposats a cadascuna d'aquestes escisions. Després de generar-se uns pèptids intermedis (desproinsulines), la conversió acaba alliberant-se pèptid C i insulina (Bennet et al, 1992).

La insulina que es va produint forma hexàmers amb zenc ocupant el centre del grànul. El pèptid C, més soluble, es manté a la perifèria del grànul, que està separat i protegit de la resta del citosol per una membrana durant el seu procés de maduració i transport intracel.lular. El grànul ja madur conté insulina i pèptid C en quantitats equimolars, així com petites quantitats de proinsulina i desproinsulina.

Una de les característiques més importants de la cèl.lula  $\beta$  és el fet de ser una cèl.lula molt diferenciada, que acumula els seus productes en grànuls de secreció i que els allibera de forma regulada en resposta a estímuls específics, amb nul.la o poca secreció espontània o no regulada (Rhodes et al, 1987).

### **II.2.2. Secreció d'insulina**

Entre els diversos factors que regulen la secreció d'insulina, la glucosa és el més important fisiològicament, tot i que també depèn d'altres hidrats de carboni i nutrients, com aminoàcids, àcids grassos, cossos cetònics, substàncies no metabòliques com els ionòfors de calci, sulfonilurees hipoglicèmiques, estimuladors de l'adenilciclasa i inhibidors de la fosfodiesterasa. La secreció d'insulina de la cèl.lula  $\beta$  també està sotmesa a influències hormonals i a control neural (Gerich et al, 1976).

La secreció d'insulina de la cèl.lula  $\beta$  ocorre a través d'un procés d'exocitosi dels grànuls que la contenen. El primer pas a l'estímul de la secreció d'insulina és el reconeixement del secretagog (o substància estimuladora de la secreció d'insulina). En el cas de la glucosa aquest reconeixement suposa l'existència d'un transportador específic, el GLUT-2. Una vegada transportada la glucosa a l'interior cel.lular es fosforila per l'acció d'un enzim, la glucoquinasa, i es metabolitza mitjançant la glucolisi (Matchinsky FM et al, 1990). De la glucolisi s'obté energia en forma d'ATP. L'augment intracel.lular de la relació ATP/ADP provoca el tancament de potasi depenents d'ATP de la membrana, amb el que es desporalitza la cèl.lula, s'obren els canals de calci depenents de voltatge, entra calci a l'interior cel.lular i s'allibera el contingut dels grànuls de secreció per exocitosi (Boyd et al, 1989). L'alliberació d'insulina i pèptid C és equimolar, pel que la concentració en sang del pèptid C pot usar-se com a índex de secreció d'insulina endògena en els pacients diabètics que reben insulina (Faber et al, 1977).

### **II.3. AUTOIMMUNITAT I DIABETIS TIPUS 1**

#### **II.3.1. Autoimmunitat: definició**

L'autoimmunitat es defineix com una reacció del sistema immune contra components de l'organisme causada per un trencament de la tolerància cap a les mol·lècules pròpies. Aquesta reacció és la causa de les malalties autoimmunes.

La resposta autoimmunitària fisiològicament normal no reconeix autoantígens, és a dir, no va dirigida contra cèl·lules normals pròpies. El cas d'atac immunitari contra cèl·lules tumorals o infectades pròpies és degut a una alteració en el contingut antigènic de la cèl·lula i, per tant, aquesta és reconeguda com a estranya. La resposta és contra cèl·lules pròpies però anormals.

#### **II.3.2. Malalties autoimmunitàries**

El terme malaltia autoimmunitària s'aplica als casos en que un procés autoimmunitari contribueix a la patogènesi de la malaltia. Sovint, el paper de l'autoimmunitat en molts desordres no està clarament definit, per tant, es parla de malalties autoimmunitàries quan s'associen de manera sòlida amb la formació d'autoanticossos.

Les malalties autoimmunitàries afecten almenys a un 5% de la població (Kronenberg M, 1991) i sovint donen lloc a conseqüències patològiques severes i, en molts casos, cròniques.

Es classifiquen segons una ordenació gradual en que en un extrem es situen les malalties amb resposta immunològica contra un òrgan concret: *malalties organ-específiques*, i a l'altre les que presenten una resposta disseminada a diversos òrgans: *malalties no organ-específiques*. Les malalties de cada grup



solen associar-se. No és infreqüent que que vàries malalties organ-específiques es desenvolupin en un mateix pacient o que hi hagi una agregació familiar.

#### **II.3.2.1. Malalties organ-específiques**

Es caracteritzen per la producció d'autoanticossos organ-específics, infiltració de cèl.lules mononuclears i destrucció selectiva de les cèl.lules diana de la resposta autoimmunitària. Aquest patró de resposta seria el típicament observat en malalties autoimmunitàries de la glàndula tiroides, com la tiroiditis de Hashimoto, considerada com a prototipus d'aquest grup de malalties.

#### **II.3.2.2. Malalties no organ-específiques**

Es caracteritzen per la presència d'una varietat d'autoanticossos específics per antígens nuclears i mol.lècules citoplasmàtiques involucrades en la replicació de l'ADN, la transcripció de l'ADN i la traducció en proteïna de l'ARN missatger (ARNm). Un exemple representatiu n'és el lupus eritematós sistèmic, en el qual tant les lesions com la producció d'autoanticossos no està restringida a un òrgan en particular sinó que pot afectar-ne a diversos (Vaifler NJ et al, 1981).

#### **II.3.3. Diabetis tipus 1: definició i epidemiologia**

La diabetis mellitus tipus 1 és una malaltia autoimmunitària en que es destrueixen les cèl.lules beta dels illots pancreàtics.

La diabetis mellitus es caracteritza per la hiperglicèmia deguda a una insuficient o nul.la secreció d'insulina i per la reduïda sensibilitat als seus efectes. Es defineix per la presència dels símptomes típics (poliúria,

polidipsia i polifàgia) i una glicèmia superior a 7 mmol/L en dues determinacions consecutives.

S'inicia, a la majoria dels casos, a la infància o adolescència. És necessari el tractament substitutiu amb insulina o bé el trasplantament de pàncreas o illots de Langerhans, ja que encara no existeix el tractament preventiu ni curatiu.

La seva incidència varia d'una forma important en funció del país. Estudis epidemiològics de finals dels 80 indiquen una màxima incidència als països nòrdics i a Sardenya (21 casos nous a l'any per cada 100.000 habitants), intermitja a Europa i als EEUU (4-14 casos nous/any/100.000 habitants) i mínima al Japó (0,8 casos nous/any/100.000 habitants).

#### **II.3.4. Complicacions de la diabetis**

La diabetis mellitus s'associa a una elevada morbiditat i a un escurçament important de l'esperança de vida com a conseqüència de les pròpies complicacions de la malaltia. Les complicacions micro i macrovasculars de la diabetis es relacionen directament amb les glicèmies. El control adequat de les glicèmies redueix significativament les complicacions microvasculars, però les macrovasculars no se'n beneficien tan clarament. (Diabetes Control, 1993) Les **complicacions microvasculars** més freqüents són la retinopatia, la neuropatia i la nefropatia.

- Retinopatia diabètica: Afecta virtualment al 100% dels adults diabètics tipus 1. És la principal causa de ceguesa als països industrialitzats.
- Neuropatia diabètica: S'associa a pèrdua de la funció motora i sensitiva dels nervis perifèrics, dolors crònics i úlceres als peus.
- Nefropatia diabètica: S'associa a proteinúria, hipertensió arterial i insuficiència renal. Als països industrialitzats suposa la principal causa d'insuficiència renal crònica terminal.

Els pacients diabètics amb trasplantament renal s'associen a un major risc de perdre l'ingert i a una major mortalitat (factor més important després de l'edat).

Les **complicacions macrovasculars** més freqüents són la cardiopatia isquèmica, la vasculopatia cerebral i la vasculopatia perifèrica.

- Cardiopatia isquèmica: És la primera causa de mort als diabètics (Laing et al, 1999). Als EEUU, el 44% de les morts relacionades amb la diabetis s'atribueixen a una malaltia cardio-vascular, de les que el 59% són degudes a cardiopatia isquèmica i el 15% a accidents vasculars cerebrals.

- Vasculopatia perifèrica: Contribueix de forma important a la morbiditat de la diabetis. La taxa d'amputacions és 15 vegades major en diabètics respecte la resta de la població. (Bild et al, 1989)

L'edat, ètnia, hipertensió arterial i la nefropatia són factors de risc per la malaltia cardio-vascular als diabètics.

#### **II.3.5. Costos econòmics associats a la diabetis**

S'estima que pel tractament de la diabetis i les seves complicacions s'ocupen l'11% dels llits hospitalaris i el 9% del pressupost d'aquests, a Anglaterra i Gales (Currie et al, 1997).

L'*American Diabetes Association* estima que el cost total anual del maneig directe de la diabetis és d'uns 44 bilions de dòlars americans i un cost adicional de 54 bilions de dòlars com a conseqüència de la discapacitat, pèrdua de productivitat i mort prematura que ocasiona la diabetis. (Viberti G, 2001)

#### **II.3.6. Diabetis tipus 1: etiopatogènia**

La destrucció de les cèl.lules  $\beta$ , productores d'insulina als illots de Langerhans, és la causa de la manca de secreció d'insulina i dels símptomes

clínic de la malaltia. És un fet demostrat que aquesta malaltia és la conseqüència d'una resposta autoimmunitària específica contra les cèl·lules  $\beta$ , però malgrat els importants avenços en el coneixement dels fenòmens que acompanyen aquesta pèrdua d'equilibri de la tolerància cap als autoantígens insulars (Bach JF et al, 2001), l'etiopatogènia de la malaltia manté molts elements per definir, entre ells l'element o elements iniciadors del procés.

Hi ha factors que contribueixen a que un individu sigui susceptible a desenvolupar la malaltia, però que per si sols no la desencadenen. És el cas de la predisposició genètica en la que alguns haplotips dels antígens d'histocompatibilitat de classe II (HLA-DR3/4, -DQ) així com altres loci de susceptibilitat (IDDM) (Vyse TJ et al, 1996) contribuirien a una presentació més eficaç d'un pèptid determinant a la malaltia. Els factors ambientals (incidència estacional, factors geogràfics, dieta) també influeixen a la aparició de la malaltia (Vives-Pi M et al, 1995). No obstant, aquests factors no són determinants, ja que els bessons idèntics d'un pacient diabètic, desenvolupen la malaltia tan sols en un 50% dels casos. La contribució de factors ambientals en un individu genèticament susceptible facilitaria el procés autoimmunitària de destrucció selectiva (Tisch R et al, 1996) iniciat per un element desconegut fins al moment.

### **II.3.7. Alteracions immunològiques**

L'inici clínic de la diabetis coincideix amb la fase final dels processos de destrucció de les cèl·lules  $\beta$ , iniciats durant el període assíptomàtic o prediabetis. Aquesta interessant etapa, de difícil estudi degut a la manca de manifestacions i lo inaccessible del teixit diana, inclou el desencadenament i progressió de l'agressió que cursa amb insulitis, hiperexpressió de MHC de classe I, autoanticossos anti-illot i disminució de la funció de la cèl·lula  $\beta$ .

L'avanç de la destrucció s'interpreta gràcies a la descripció dels processos de migració leucocitària (Springer TA, 1994). Les cèl·lules endotelials dels

capil·lars insulars regularien l'arribada leucocitària als teixits i els seus poros ajudarien a una ràpida difusió dels missatgers químics entre la sang i l'espai insular: l'insulitis (infiltració dels illots) va acompanyada per un increment dels elements vasculars dels teixits, aspecte que sugereix la participació activa de l'endoteli en el procés patogènic de la diabetis tipus I.

Aquesta lesió inflamatòria dels illots o insulitis, és una característica comú en els escassos pàncreas analitzats histològicament procedents de pacients diabètics (Foulis AK et al, 1985). L'estudi de pàncreas d'individus diabètics que van morir just a l'inici de la malaltia ha permès definir importants alteracions immunològiques (Somoza N et al, 1994) (Vives-Pi et al, 1997) (Hanninen A et al, 1992). Després d'identificar l'esperada disminució del número de cèl·lules beta, es va descriure una infiltració leucocitària relativament escassa amb predomini de limfocits T CD4+ i CD8+ i alguns macròfags. Es va detectar una clara hiperexpressió d' HLA de classe I i de mol·lècules associades al processament antigènic endogen (transportador d'antígens TAP-1) a les cèl·lules insulars, el que sugereix un increment de la presentació antigènica, otorgant-se així un paper actiu a la cèl·lula  $\beta$ . El perfil de citokines d'aquest microambient és el característic dels limfocits T citotòxics: IL-2- IL-4, IL-10, perforina i IL-6. Junt a la incidència estacional de la malaltia, la presència d'interferons és la dada que recolza l'hipòtesi vírica a l'etiologia de la diabetis encara que el mecanisme d'una infecció aguda de les cèl·lules  $\beta$  sembla incompatible amb el llarg període asimptomàtic que precedeix la malaltia. El mimetisme mol·lecular entre agents infecciosos i autoantígens podria induir una reacció creuada autoimmune dirigida contra epitops de proteïnes pròpies en individus susceptibles. Aquest mecanisme, que pot estar implicat a la patogènesi d'algunes malalties com la miocarditis post-viral o la malaltia de Chagas, tampoc s'ha demostrat a la diabetis en la que es requeriria una presentació antigènica apropiada de l'antigen mimetitzat per part de la cèl·lula diana i la capacitat d'induir una resposta proliferativa i no anergitzant a la cèl·lula T efectora.

La caracterització dels limfocits autorreactius ha resultat d'especial interès els darrers anys: a més de definir-se les subpoblacions predominants, s'ha precisat que possiblement la regulació de la resposta cap a un component Th1 determina el desenvolupament d'aquesta malaltia (Rabinovitch A et al, 1998). El recrutament d'aquestes cèl.lules cap als illots és un pas crític a la patogènesi de la malaltia. Les quimioquines són citoquines que promouen la migració de cèl.lules mononuclears, per el que el tràfic cap a la cèl.lula diana, podria associar-se a l'expressió temporal de quimioquines, i que la polarització de l'expressió de les mateixes per cèl.lules Th1 vs Th2 determinaria la composició de la insulitis i la posterior destrucció o protecció de les cèl.lules beta. Una dada interessant: el ratolí transgènic per el gen de MCP-1 sota la regulació del gen de la insulina (Grewall IS, 1997) mostra una important insulitis monocítica sense progressió cap a la malaltia, indicant, per una part, la influència d'aquesta quimioquina en el tràfic de l'insulitis i, per una altra, que per ella sola no és capaç de provocar l'atac selectiu cap a les cèl.lules  $\beta$ . Resultats d'estudis in vitro indiquen que les cèl.lules beta de rata són capaces, sota l'estímul d' IL-1, d'expressar certes quimioquines que podrien afectar al reconeixement de la cèl.lula beta per part del sistema immunològic (Chen MC et al, 2001).

### **II.3.8. Autoanticossos**

Durant el període asimptomàtic d'inici i progressió de la destrucció de la cèl.lula  $\beta$  apareixen anticossos circulants anti-illot, marcadors d'autoimmunitat humoral que poden ajudar a identificar individus en fase pre-diabètica i posteriorment a distingir aquesta malaltia d'altres formes de diabetis mellitus. Fins al moment, aquests marcadors serveixen, junt amb les dades metabòliques, per portar a terme un millor seguiment del pacient.

Els marcadors ICA (Islet Cell Antibodies), descrits al 1975 (Bottazzo GF et al, 1974), es detecten mitjançant immunofluorescència indirecta incubant una

mostra de sèrum sobre seccions de pàncreas normal, i expressant la concentració d'anticossos en unitats JDF (Juvenile Diabetes Foundation). Engloven tot un conjunt d'anticossos contra diferents determinants antigènics, entre ells GAD (Decarboxilasa de l'àcid glutàmic), insulina i IA-2 (proteïna tirosin-fosfatasa-like). S'han desenvolupat assatjos mol·leculars específics per a la detecció de cada anticòs, que han estat estandaritzats a nivell mundial.

La majoria dels pacients pre-diabètics i el 90% dels diabètics presenten autoanticossos anti-GAD i/o IA-2. Els anticossos anti-insulina són molt determinants en nens. La positivitat de varis d'aquests anticossos incrementa el risc de desenvolupar la malaltia i permet seleccionar als individus en estudis de prevenció.

Els pacients diabètics tenen cèl·lules T autorreactives contra varis autoantígens insulars que sugereix que, si bé a la fase inductiva de la diabetis la resposta aniria dirigida contra un o uns pocs autoantígens, la progressió de la destrucció requeriria l'acció d'una sèrie de mol·lècules (GAD65, GAD67, ICA512, IA-2b, GM2-1 gangliòsid, CPH, ICA69, Imogen, hsp65, periferrina, sinapsina...) que amplificarien la resposta i donarien pas als autoanticossos contra mol·lècules de les cèl·lules  $\beta$  com a fenomen secundari a l'alliberació del contingut citoplasmàtic. Cap d'aquests autoanticossos reconeix components de la membrana de les cèl·lules endocrines insulars (ICSA) (Vives-Pi M et al, 1992) pel que es pensa que no desenvolupen un paper citotòxic ni són necessaris en experiments de transferència de la malaltia.

Un altre paràmetre immunològic, a més dels autoanticossos, és la determinació de limfocits T autorreactius contra antígens insulars. Aquesta tècnica està actualment en fase d'estandarització (Peackman M et al, 2001).

### **11.3.9. Destrucció de la cèl.lula $\beta$**

Malgrat l'expressió en el timus d'autoantígens insulars (insulina, glucagó i GAD67) (Sospedra M et al, 1998) algunes cèl.lules T autorreactives escapen a la circulació perifèrica. Per a la seva activació es requereixen certes condicions microambientals que capacitin les cèl.lules T a l'entorn de la cèl.lula diana: freqüència de precursors específics autorreactius, estat òptim d'activació i expressió de mol.lècules accessòries, accessibilitat de l'autoantigen i possibilitat de trobar-se amb elements ambientals que afavoreixin el mimetisme i les reaccions inflamatòries.

L'òrgan diana podria jugar un paper actiu al presentar antígens, o potser seria un dany inicial de la cèl.lula  $\beta$  el que dispersaria els seus autoantígens a l'entorn on serien presentats per cèl.lules presentadores professionals (APC). Existeixen evidències a favor d'aquest últim punt ja que en pacients amb inici clínic de la malaltia s'ha observat hiperexpressió de mol.lècules de la via endògena (HLA de classe I, TAP1) i exògena (HLA de classe II) de processament i presentació antigènica, així com de mol.lècules d'adhesió (ICAM-1) encara que els nivells normals d' MHC classe I serien suficients per el reconeixement per limfocits T CD8+ autorreactius. Altres mol.lècules implicades serien les coestimuladores (B7.1 i B7.2) sense les quals no hi ha activació de la cèl.lula T.

La selectivitat de l'atac és un misteri per resoldre: alguns autoantígens són comuns als tres tipus cel.lulars endocrins (Vives-Pi M et al, 1993), no així l'insulina, de la qual l'expressió és exclusiva de la cèl.lula  $\beta$ , la qual tindria una major sensibilitat en front a condicions d'estrés (citoquines, oxidació etc.) que les altres cèl.lules insulars. Els candidats a efectors de mort cel.lular són la perforina (que s'ha detectat als illots infiltrats), granzimes, òxid nítric, Fas i FasL, TNF, etc. L'atac autoimmune i la persistència d'hiperglicèmia causen un augment de la producció de radicals lliures pel que una disminució de les defenses antioxidants, producte dels anomenats gens de resposta



protectora (glutathion, HO-1, hsp...) pot augmentar la susceptibilitat al dany cel.lular al no bloquejar l'apoptosi mediada per NFK- $\beta$ . L'expressió apropiada d'aquests gens en resposta a les citoquines podria generar una protecció a la cèl.lula víctima augmentant la seva resistència.

## **II.4. MODELS ANIMALS DE DIABETIS: ESPONTANIS, INDUITS I TRANSGÈNICS**

Els problemes amb els que s'ha trobat l'investigació en el camp de la diabetis mellitus tipus 1 (inaccessibilitat al teixit diana en el moment de l'inici de la destrucció autoimmune) s'han intentat solventar mitjançant l'utilització de diferents models animals. Aquests són, en general, de fàcil accés i manipulació, i alguns, les anomenades soques, són genèticament idèntics. Permeten la recerca sobre la malaltia a nivell de cinètica, inducció, immunoregulació, transferència, genètica, mecanismes efectors i teràpia. Cal tenir en compte, però, l'interpretació de les dades procedents dels models animals donada la complexitat del sistema i el fet que es tracta d'espècies diferents a la humana. L'extrapolació de les conclusions a l'home no és possible.

### **II.4.1. Models animals espontanis de diabetis mellitus tipus 1**

Són aquells en que hi ha una aparició espontània de la malaltia, sense que calgui induir-la amb cap tractament. La malaltia es produeix regularment en una soca d'animal, que està "programada" per desenvolupar-la i que, acostuma a ser singènica.

En el cas de la diabetis, els models més ben estudiats són el ratolí NOD (Non Obese Diabetic) i la rata BB (Biobreeding).

#### **II.4.1.1. Ratolí NOD**

El ratolí NOD fou descobert al Japó a finals dels anys 70. Desenvolupa un procés autoimmune que resulta en una diabetis tipus 1 com a conseqüència de la destrucció selectiva de les cèl.lules  $\beta$  a una edat temprana (Makino S et al, 1978) i després

d'un procés apoptòtic (O'Brien BA et al, 1997). Al igual que en humans, s'associen a la malaltia als alels específics de MHC de classe II (I-A) i altres loci ja mapejats (idd) (Wicker LS et al, 1995). Aquest model presenta insulinitis, autoanticossos i resposta autoimmunitària contra altres òrgans endocrins (tiroiditis, sialitis, prostatitis). L'atac s'inicia a les 3-4 setmanes (insulinitis) i la malaltia es manifesta als 3-7 mesos. La incidència de la malaltia és més alta en femelles (60-90%) que en mascles (15-40%) (Tochino et al, 1986), el que suggereix una influència hormonal en el procés. A més, la castració dels mascles eleva la incidència de diabetis fins a igualar els valors de les femelles. La diabetis en el NOD és poligènica, és a dir, amb influència de varis gens, un dels quals és de susceptibilitat (Idd-1) i es troba a la regió MHC i té una alta homologia amb el DQw8 humà (Todd JA et al, 1991). Altres gens (Idd-2 fins Idd-18) es troben fora d'aquesta regió (Podolin PL et al, 1998). La malaltia pot transferir-se a individus sans a través de limfocits, depenent tant de T CD4 com de CD8. Al pàncreas del ratolí NOD s'han detectat les quimioquines MIP-1alfa, MIP-1beta i MCP-1 mitjançant la tècnica d'ELISA. L'expressió d'aquestes quimioquines estaria associada a l'evolució de la malaltia (Cameron MJ et al, 2000). El ratolí NOD és la base genètica de nombrosos models transgènics i "knock-outs", en els que es determina el paper d'una mol·lècula (induint o bloquejant la seva expressió) en el desenvolupament de la malaltia.

Aquest model compta amb un "homòleg" resistent a la malaltia, el ratolí "Non Obese Diabetic Resistant" (NOR) (Prochazka M et al, 1992). El ratolí NOR no desenvolupa insulinitis ni diabetis tot i que el seu genoma és idèntic al NOD en un 88%, incluent l'haplotip H-2g7, altament diabetogènica. Això és degut a que en el 12% del genoma diferent al NOD conté al menys 5 loci de resistència a la malaltia, entre ells l'alel Idd13. (Wong et al, 1999)

#### **11.4.1.2. Rata Biobreeding o BB**

És un model animal de diabetis descobert l'any 1974 en una colònia de rates Wistar portada per Biobreeding Laboratories (Ottawa, Canadà). La incidència de diabetis a

les colònies inicials era aproximadament d'un 10% però mitjançant creuaments selectius es va assolir un increment de fins al 60%. Les rates desenvolupen diabetis entre els 60 i 120 dies d'edat (correspon a la pubertat de la rata) i no hi ha diferència a la incidència de la malaltia entre mascles i femelles. La manifestació clínica és molt semblant a la diabetis tipus 1 a l'home. A diferència del ratolí NOD, les rates BB no presenten ICA.

Estudis en estadis previs a la manifestació de la malaltia demostren una clara evidència de la participació de la immunitat cel·lular a la patogènesi de la diabetis a la rata BB. (Dean BM et al, 1985)

Mitjançant estudis histològics s'ha pogut detectar una intensa infiltració dels illots pancreàtics per part de cèl·lules mononuclears (insulitis) formada sobretot per limfocits T activats i macròfags, després de la qual esdevé la destrucció de cèl·lules  $\beta$ . Aquests estudis venen recolzats per experiments en els quals cèl·lules limfoides de la melsa de rates BB diabètiques, activades amb Concanavalina A (Con A), podien transferir la malaltia a rates de la mateixa soca susceptibles (Koevary S et al, 1983) i també a una sublínia de BB resistent (Like AA et al, 1985). El fet que Con A és un estimulador potent de la producció de limfoquines per part dels limfòcits T, suggereix la participació de cèl·lules limfoquina-depenents en el procés de destrucció de les cèl·lules  $\beta$ . En efecte, es va comprovar que cèl·lules de la melsa de rates BB/W estimulades amb IFN- $\gamma$ , IL-1 i IL-2 eren capaces de produir citotoxicitat sobre cèl·lules insulars *in vitro* i a més, aquestes cèl·lules tenien les característiques de cèl·lules NK (Pukel C et al, 1987). També els macròfags han estat postulats com a cèl·lules efectores del procés destructiu. Això ve recolzat per experiments *in vivo* en que es va poder prevenir la diabetis mitjançant l'administració de sílica (que interfereix en la funció dels macròfags) en rates BB prediabètiques (Oschilewski U et al, 1985).

#### **II.4.2. Inducció experimental de diabetis mellitus tipus 1**

Els models induïts de diabetis tipus 1 s'aconsegueixen experimentalment, mitjançant els següents mètodes:

##### **II.4.2.1. Inducció quirúrgica**

El model més clàssic induït de diabetis en animals és la pancreatectomia, que consisteix en l'extirpació total del pàncreas. En el cas de gossos, on l'intervenció és més senzilla que en rosegadors, s'ha demostrat una aparició immediata de la diabetis amb supervivència de l'animal de 1 a 12 dies. Aquest mètode és vàlid per testar la validesa d'un posterior implantament d'illots en aquests animals, però evidentment no presenta cap fenomen relacionat amb l'autoimmunitat.

##### **II.4.2.2. Inducció per virus**

La diabetis mellitus és una patologia multifactorial influenciada per factors genètics i ambientals. D'entre aquests darrers es troben els virus, capaços de comportar-se com a inductors i/o activadors de la malaltia. El desenvolupament de la malaltia depèn del suport genètic de l'hosta i del genoma propi del virus. Generalment, aquest tipus de diabetis és transitòria i d'una severitat mitja al ratolí. (Rayfield et al, 1986)

S'ha vist que certes infeccions víriques són relativament específiques per les cèl·lules  $\beta$ , com per exemple el cas del virus Coxsackie B4, que va ser aïllat d'un pacient mort amb diabetis en fase inicial, i al inocular-lo en ratolins va produir la diabetis. (Yoon JW et al, 1979)

El Reovirus tipus I i el virus de la Rubeola poden, també, induir una síndrome semblant a la diabetis en ratolins i en hámsters. (Rayfield EJ et al, 1986)

### II.4.2.3. Inducció química

La destrucció de la cèl.lula beta es pot aconseguir mitjançant l'administració d'agents tòxics específics, com són l'aloxà i l'estreptozotocina.

#### II.4.2.3.a. Aloxà

L'efecte diabetogen de l'aloxà fou descrit al 1943 per Dunn al observar que la seva administració endovenosa en conills, produïa hiperglicèmia i necrosi de cèl.lules beta selectiva. L'aloxà és una pirimidina amb una estructura similar a l'àcid úric i la glucosa. S'administra generalment per via endovenosa a una dosi de 40-45 mg/Kg. Inicialment inhibeix la síntesi i secreció d'insulina, i posteriorment una necrosi selectiva de les cèl.lules beta amb la subseqüent alliberació dels grànuls d'insulina emmagatzemats. Aquests fenòmens provoquen una hiperglicèmia inicial, posteriorment hipoglicèmia i finalment una hiperglicèmia permanent.

La citotoxicitat de l'aloxà és deguda a la seva ràpida acumulació a l'interior de les cèl.lules dels illots i la formació de radicals superòxids als que la cèl.lula beta n'és molt sensible. (Okamoto et al, 1987)

#### II.4.2.3.b. Estreptozotocina

L'estreptozotocina (STZ) és un antibiòtic aïllat del *Streptomyces achromogenes* i químicament es tracta d'un derivat N-nitrós de la glucosamina. Posseeix propietats antibacterianes, diabetògenes i antitumorals, i alhora és carcinogènic.

La seva activitat diabetògena fou demostrada per Rakieta al 1963 al administrar-la per via endovenosa a rates i gossos.

L'administració endovenosa superior a 50 mg/Kg produeix en 48 hores un síndrom diabètic al 100% de les rates, per destrucció selectiva de cèl.lules beta pancreàtiques. Amb dosis inferiors a 100 mg/Kg es desenvolupa una hiperglicèmia

sostinguda i perllongada, associada a glucosuria, sense cetonuria. Una dosi superior a 100 mg/Kg produeix un sever estat cetònic i mort als 2-3 dies de l'administració.

Dosis intermitges de STZ, de 55 a 65mg/Kg, produeixen, a les rates, glicèmies 3 a 4 vegades superiors a les normals, associades a hipoinsulinèmia sense cetonuria.

Aquests animals sobreviuen sense necessitat de teràpia insulínica.

L'administració d'STZ, histològicament, indueix canvis morfològics a la cèl.lula beta, ja apreciables a les 2-4 hores de l'administració. Es produeix disminució dels tamanyes dels nucleols, picnosi del nucli i disrupció de les membranes dels grànuls de secreció de les cèl.lules beta pancreàtiques. Posteriorment es produeix una necrosi massiva de les cèl.lules beta i una diabetis irreversible a les 24 hores. (Bell et al, 1983)

Les perturbacions fisiològiques generades per l'STZ originen un quadre clínic molt similar al dels humans amb diabetis tipus 1 no controlada. Es produeix hiperglicèmia, polidipsia, poliúria i polifàgia, i a llarg termini, cataractes bilaterals. Les proves de tolerància a la glucosa mostren elevacions glicèmiques augmentades i retorn a valors basals retardats.

En l'estat diabètic crònic induït per STZ, la capacitat secretora d'insulina en resposta a estímuls glucosats és inexistent o està severament disminuïda i les concentracions de somatostatina i glucagó estan augmentades.

A llarg termini es produeixen alteracions renals, oculars, sistema nerviós i cardiovascular, similars a les dels humans.

### **11.4.3. Models animals transgènics de diabetis mellitus tipus 1**

La capacitat d'introduir gens funcionals a la línia germinal de mamífers ha estat aplicat al desenvolupament de models animals encarats a l'estudi de la diabetis tipus 1 humana.

El clonatge del gen de la insulina i la identificació del seu promotor van fer possible preparar construccions de diversos gens lligats al promotor de la insulina. D'aquesta manera, els gens només s'expressarien a les cèl.lules  $\beta$  on s'activaria el promotor de la insulina permetent així la transcripció del gen introduït artificialment.

En el cas de la diabetis tipus 1 s'ha pogut testar l'efecte de l'hiperexpressió de la mol.lècula de classe I H-<sup>2kb</sup> i de l'expressió *de novo* de les mol.lècules de classe II, I-E<sup>b</sup> i I-A<sup>d</sup>. En els tres casos els ratolins van esdevenir diabètics, però sense cap evidència de procés autoimmunitari. Això s'ha interpretat com a un trencament de la secreció insulínica degut a l'hiperexpressió de mol.lècules de MHC. (Parham P, 1988)

La insulina formaria complexos amb el MHC en compartiments pre-secretors i això alteraria la formació dels grànuls i per tant de la secreció. Un quart model de transgènic que expressava MHC de classe II però en quantitats molt més baixes, comparable a les expressades als limfocits B, no va donar evidència de procés autoimmunitari ni va desenvolupar diabetis. (Bohme et al 1989)

Un darrer model de transgènic va ser el que incorporava el promotor de la insulina juntament amb el gen de IFN- $\gamma$  (Sarvetnik et al, 1988). Aquest model presenta una inflamació pancreàtica (insulitis) amb expressió de classe II, presumible hiperexpressió de classe I als illots i desenvolupament de diabetis insulino-dependent. L'IFN- $\gamma$  és un producte dels limfocits activats i de les cèl.lules NK. Sol ser produït per l'hoste en front d'infeccions virals i bacterianes. Una de les seves funcions és reclutar i activar els macròfags, que a la vegada produiran radicals lliures, IL-1 i TNF. Aquest procés destructiu és la conseqüència d'una resposta



autoimmunitària ja que la destrucció d'illots trasplantats en aquest model indica que l'IFN- $\gamma$  és un mediador de l'activació de la resposta contra els illots normals. (Sarvetnik N et al, 1990)

Tot i que hi ha diferències importants, sembla que el transgènic amb IFN- $\gamma$  és el menys diferent a la malaltia humana. Això pot ser degut a que l'IFN no només modularia el MHC sinó d'altres mol.lècules importants en els processos immunològics, com ara algunes mol.lècules d'adhesió. Hi ha molts més models d'animals transgènics d'expressió de citoquines a la cèl.lula beta, el que dóna informació sobre el possible paper d'aquestes mol.lècules en el desenvolupament de la diabetis autoimmune (Rabinovitch A, 1998).

En definitiva, els ratolins transgènics han estat útils tot i que cap a reproduït de manera fidel el procés observat en humans o en el ratolí NOD.

## **II.5. TRACTAMENT DE LA DIABETIS INSULINODEPENENT: INSULINOTERÀPIA**

Actualment disposem de tres alternatives terapèutiques per al tractament de la DMID: la teràpia intensiva amb insulina, el trasplantament pancreàtic i el trasplantament d'illots pancreàtics.

Totes aquestes actuacions terapèutiques van encaminades a extremar el control metabòlic del pacient diabètic ja que s'ha pogut demostrar que quan més estricte sigui el control metabòlic menor número de complicacions apareixen. D'aquesta manera, els objectius que s'intenten assolir per al control de la diabetis són el mantenir el pacient asimptomàtic, corregir els trastorns metabòlics dels hidrats de carboni, greixos i proteïnes, normalitzar la glicèmia de forma permanent, evitar o retardar les complicacions tardanes de la malaltia, i aconseguir el benestar físic, psíquic i social del pacient.

A partir del 1921, en que Banting i Best descobreixen l'insulina, aquesta es comercialitza ràpidament. Les primeres insulines que es van obtenir eren de pàncreas de bou o porc. Aquestes contenien substàncies tòxiques a les que inicialment s'inculpava de la formació d'anticossos antiinsulina. Els darrers anys, l'aparició de la insulina humana ha obert noves expectatives de tractament. Hi ha dues formes d'obtenir-la, la insulina biosintètica i la semisintètica.

La insulina biosintètica (recombinant) s'obté per inserció del gen clonat de la insulina dins del DNA de bacteries com *E. coli*.

La insulina semisintètica s'obté al substituir l'aminoàcid alanina de la insulina porcina per treonina. D'aquesta manera s'aconsegueix una menor antigenicitat i la seva possibilitat il·limitada d'obtenció.

Des del 1977 es disposa de sistemes electromecànics portàtils que fan possible la infusió subcutània d'insulina. El control metabòlic que s'obté amb aquest sistema és notable. S'indica en diabètics inestables, en gestants diabètiques i en pacients

amb neuropaties doloroses, entre d'altres. S'ha demostrat que aquesta teràpia intensiva redueix les complicacions microvasculars en un 50-70%. (Felt et al, 1986)

El risc més important d'aquest tipus de tractament és la hipoglicèmia, que és 3 vegades major. S'ha de seleccionar el pacient amb cert nivell cultural per que compregui les complicacions d'aquest sistema d'administració (Balibrea et al, 1996).

## **II.6. TRACTAMENT QUIRÚRGIC DE LA DIABETIS: TRASPLANTAMENT**

Els inconvenients i dificultats que té el malalt diabètic per poder assolir la normoglicèmia permanent mitjançant la insulinoteràpia ha requerit el desenvolupament d'altres mitjans alternatius: el trasplantament de pàncreas i el d'illots de pàncreas.

### **II.6.1. Trasplantament de pàncreas**

El trasplantament de pàncreas pot permetre una adequada regulació del metabolisme dels hidrats de carboni degut a que un ingert funcionant produeix insulina en relació a les demandes metabòliques del pacient. Això podria evitar la necessitat d'injeccions periòdiques d'insulina i les restriccions dietètiques severes, revertint en una millora de la qualitat de vida, a més de prevenir, estabilitzar i retardar o reduir les complicacions de la malatia. (Dubernard et al, 1989)

El trasplantament té l'objectiu de la normalització de la glicèmia mitjançant la restauració de la funció endocrina.

Amb el trasplantament de pàncreas s'intenta aportar teixit pancreàtic normal que produeixi insulina segons els requeriments de l'organisme. El trasplantament és l'únic mètode per intentar assolir la insulino independència i la normoglicèmia en un període de temps relativament curt, i a la vegada pot normalitzar les xifres d'hemoglobina glicosilada, paràmetre que ens serveix per valorar la normalització del metabolisme dels hidrats de carboni. (Katz H et al, 1991)

La primera experiència en el trasplantament de pàncreas és el realitzat per William Kelly i Richard Lillehei al 1966. Es va practicar un doble trasplantament de ronyó i pàncreas. Donat que no es coneixia la immunosupressió, els primers trasplantaments, malgrat que van funcionar de forma immediata, van ser rebutjats. Actualment s'han pogut definir tres tipus de pacients diabètics insulíndependents acandidats al trasplantament de pàncreas: pacients en diàlisi; pacients trasplantats

renals amb bon funcionament des de fa 3 mesos; pacients diabètics en situació preurèmica.

El primer grup és el més freqüent, de forma que el 90% dels diabètics trasplantats es fa simultàniament ronyó i pàncreas. En el segon grup es corre el risc de la recurrència de la malaltia renal al ronyó trasplantat, pel que el nou pàncreas podria ajudar a controlar aquesta complicació. El tercer grup de pacients són aquells que encara no tenen complicacions de la seva malaltia, i que per tant fa que s'hagi de seleccionar molt bé el tipus de pacient i el moment del trasplantament donats els riscos que aquest comporta.

El tipus d'ingert que s'està utilitzant a l'actualitat és el de donant menor de 50 anys, donat que en pacients majors s'ha demostrat la pèrdua de teixit insular. Es practica un trasplantament complet de pàncreas amb segona i tercera porcions duodenals, preservat en sol.lució de Wisconsin.

Pel que fa a la tècnica aplicada, els primers trasplantaments eren segmentaris i amb obliteració del conducte pancreàtic. Amb el temps s'ha vist que la oblitació del conducte excretor pancreàtic produeix un estat de pancreatitis crònica que indueix a una substitució del teixit pancreàtic per teixit fibrós, reduint-se els illots pancreàtics (Dubernard et al, 1978)

Als anys 70 es decideix realitzar el trasplantament amb la glàndula complerta i practicant una derivació de les secrecions pancreàtiques a l'intestí (Groth G et al, 1985). Cap als anys 80 la derivació es practicà a la via urinària (Gil-Vernet et al, 1986), lo que permetia de determinació de l'amilassa en orina per a la detecció del rebuig pancreàtic. (Nankivell et al, 1990)

Una de les problemàtiques del trasplantament és l'inevitable ús d'immunosupressors, donat que els illots de pàncreas en són altament sensibles. La major part d'aquests, com els corticoids i la ciclosporina són diabetògens i tenen altres efectes secundaris a considerar. Una de les pautes més utilitzades a l'actualitat és la quadruple teràpia amb globulina antilimfocítica, ciclosporina, azatioprina i prednisona. (Gruessner et al, 1996)

Un altre important aspecte a considerar en el trasplantament de pàncreas és l'identificació temprana del rebuig. Existeixen molts mètodes per al diagnòstic del rebuig, però, únicament la biòpsia de la glàndula ens confirmarà el diagnòstic, tot i que no és un mètode estandaritzat. En el model de la derivació vessical, mitjançant una cistoscòpia es pot practicar la biòpsia, però a les altres tècniques la via d'accés és més complexe. D'aquesta manera, a l'actualitat no existeix cap marcador eficaç de rebuig, fet que és el responsable del 30-40% de les pèrdues de l'ingert. (Konigsrainer et al, 1992)

La mortalitat al trasplantament de pàncreas es troba al voltant del 10%. Depèn molt directament de l'edat i l'estat de salut del receptor, objectivant-se un increment a partir dels 45 anys. Les infeccions són responsables de la mortalitat a curt termini, mentre que les malalties cardiaques i cerebro-vasculars són les que causen la mortalitat a llarg termini.

La complicació immediata més freqüent és la trombosi venosa profunda, destacant també les fístules duodenals o duodeno-vessicals, l'hematuria i les infeccions intraabdominals així com les sistèmiques. L'acidosi metabòlica és una complicació característica a mig termini dels trasplantaments de pàncreas amb derivació vessical degut a la pèrdua excessiva de bicarbonats per l'orina.

Segons el Registre Internacional de Trasplantaments de Pàncreas, el 91% dels pacients sobreviuen al trasplantament de pàncreas, mentre que únicament el 74% dels ingerts permaneixen funcionants. Aquesta supervivència de la funcionalitat de l'ingert depèn del tipus de receptor, així doncs, als pacients amb trasplantament simultani de pàncreas i ronyó, la supervivència de l'ingert es troba sobre el 76%, mentre els pacients amb trasplantament previ de ronyó, funcionant o en situació preurèmica, la supervivència d'aquest trasplantament es troba al voltant del 47%. Això és degut a que en el trasplantament combinat, el ronyó és fonamental per a l'ajuda del diagnòstic precoç del rebuig. (Garvin et al, 1991)

Un cop trasplantat el pàncreas s'assoleix la normalització del metabolisme dels hidrats de carbó, millorant de forma ostensible la qualitat de vida del pacient. Però la finalitat del trasplantament de pàncreas serà també la de corregir o evitar la

progressió de les lesions secundàries que indueix la malaltia. De manera objectiva s'ha demostrat l'augment de la velocitat de conducció que ve a expressar la neuropatia perifèrica (Van der Vliet et al, 1988). També s'ha pogut veure que en els pacients amb un trasplantament renal previ i que aquest començava a presentar les lesions típiques de la diabetis, amb el trasplantament de pàncreas aquestes lesions han remès. Sobre la retinopatia diabètica, el trasplantament té un efecte neutre si no es practica en la fase prèvia a l'estabilització de les lesions.

És previsible que en un futur immediat es pugui preveure quins pacients presentaran rebuig i en quin moment. Amb l'aparició periòdica dels nous immunosupressors i del millor control de les infeccions és d'esperar la major supervivència de l'íngert pancreàtic, així com el millor control de les infeccions intercurrents.

#### **11.6.2. Trasplantament d'illots de Langerhans**

A l'actualitat, el trasplantament d'illots de pàncreas, és una alternativa terapèutica a la diabetis mellitus insulíndependent. El principal objectiu d'aquest tipus de tractament és el d'implantar la suficient quantitat de teixit insular funcionant en pacients insulíndependents, i el més precoç possible, per evitar les complicacions pròpies de la malaltia.

El trasplantament d'illots de pàncreas es tracta d'un tractament més fisiològic, donat que no es trasplanta teixit exocrí, causant de gran part de la morbimortalitat. A més té l'avantatge que els illots poden ser tractats prèviament al trasplantament, per d'aquesta manera poder reduir l'immunogenicitat, el que previsiblement fa pensar que el requeriment d'immunosupressors sigui menor. Es tracta d'una tècnica amb molta menor agressivitat que la pròpia del trasplantament d'òrgan complet, pel que s'esperaria també tenir un menor número de complicacions. La creació de bancs per a l'emmagatzament i preservació d'illots pancreàtics obre una porta per a l'aplicació a gran escala d'aquest tipus de

trasplantament. Aquest tipus d'ingert també té una sèrie de problemes que fan que la generalització d'aquesta tècnica no sigui absoluta, com són el rebuig immunològic, el risc de contaminació i el gran requeriment de teixit insular necessari per al trasplantament.

#### **II.6.2.1. Antecedents històrics**

Els primers trasplantaments d'illots pancreàtics es van realitzar en rates isogèniques, al fetge, a través de la vena porta (Ballinger et al, 1972). S'observà que les rates pancreatimitzades normalitzaven el nivell de glucosa en sang. Es demostrà que a les rates diabètiques es podien prevenir les lesions degudes a la hiperglicèmia, i que les lesions primàries revertien gràcies al trasplantament d'illots (Mauer et al, 1974).

També es van fer trasplantaments d'illots de pàncreas a la melsa de gossos pancreatimitzats, que normalitzaven les glicèmies (Mauer et al, 1976). Estudis posteriors indicaven que l'autotrasplantament d'illots al fetge, a través de la vena porta, en gossos pancreatimitzats, tot i que inicialment aconseguien normalitzar les glicèmies, perdien la seva funció al cap d'uns mesos (Alejandro et al, 1986). Estudis més recents, en gossos, semblen indicar que passats uns anys post-trasplantament, els illots implantats directament a la melsa funcionen millor que els implantats a través de la vena porta (Warnock et al, 1988).

Els primers intents històrics de trasplantament d'illots en humans es produeixen al 1977 (Hegre et al, 1977), però no va ser fins al 1980 quan es va assolir per primera vegada la independència insulínica (Largiader et al, 1980). El trasplantament es realitzà en una pacient de 32 anys, diabètica des dels 12 i amb insuficiència renal. Se li van allotrasplantar uns 200.000 illots mitjançant injecció intraesplènica conjuntament amb un ronyó procedent del mateix donant. Nou mesos post-trasplantament era independent de la insulina, però 20 mesos després morí de forma súbita.

L'any 1987 es van realitzar 5 trasplantaments d'illots pancreàtics amb una puresa del 20-40% a la vena porta de pacients diabètics d'edats entre 25 i 41 anys, i amb



una duració de la malaltia d'entre 17 i 34 anys. Posteriorment al trasplantament presentaven nivells de Pèptid-C en sèrum, però amb quantitat insuficient, requerint insulina exògena (Alejandro et al, 1987).

El grup de St. Louis (Lacy et al, 1987), va realitzar 6 trasplantaments d'illots pancreàtics en pacients diabètics que ja havien estat trasplantats amb un ronyó. Es van injectar de 100 a 200.000 illots amb un 20% de puresa al parènquima de la melsa. Tan sols es van detectar increments del Pèptid-C en el sèrum de 3 pacients que van fer disminuir les necessitats d'insulina exògena durant els 3 mesos posteriors al trasplantament.

Els fracassos repetits van provocar el plantejament de les possibles raons per les quals l'ingert no funcionava. Una d'elles era la falta de mètodes per obtenir illots en quantitat i puresa suficient. Fou a partir de l'aplicació de la tècnica desenvolupada per Ricordi (Ricordi et al, 1988) que es van començar a observar les diferències. Aquestes es veuen reflexades al Registre Internacional de Trasplant. Si s'estudien els resultats dels 178 trasplantaments d'illots realitzats entre els anys 1983 i 92, s'observa que només un 20% presentaven nivells de Pèptid-C positius (nivell en plasma > 1 ng/ml durant més d'un mes) i un 11% van assolir la independència insulínica transitòria. Si s'estudien les dades a partir de 1990, moment en el que es comença a aplicar la tècnica d'aïllament de Ricordi, s'observa que el 65% dels pacients presentaven nivells de Pèptid-C positius i que un 22% assoliren la independència insulínica transitòria. Aquestes dades van demostrar que era necessària una millora de les tècniques per a l'obtenció d'illots, per aconseguir un bon rendiment dels illots trasplantats.

### II.6.2.2. Trasplantament d'illots experimental

Al 1972, es desenvoluparen els mètodes d'aïllament d'illots de pàncreas de rossegadors. S'aprofità aquesta metodologia per fer els primers trasplantaments d'illots en rossegadors diabètics, demostrant-se que l'estat de diabetis es podia revertir a la normalitat i que les complicacions derivades de la diabetis eren previngudes o revertides (Ballinger et al, 1972).

No obstant, una dificultat adicional a l'èxit del trasplantament d'illots de pàncreas en humans diabètics tipus 1 i en animals que pateixen una diabetis espontània similar a la diabetis humana, és la condició autoimmune de la malaltia. Aquest fet implica la possibilitat que els illots trasplantats poden, igual que els propis, ser destruïts pel procés autoimmune crònic de la malaltia o bé pel procés de rebuig inherent a l'implantació de teixit de MHC diferent al propi (Eissenbarth et al, 1996).

Al 1963 Rakieta demostrà que l'estreptozotosina (STZ) induïa la diabetis química (Rakieta et al, 1963). La STZ és un antibiòtic aïllat del *Streptomyces Achromogenes*, varietat *Streptozoticus* i químicament es tracta d'un derivat N-nitrós de la glucosamina. Posseeix propietats antibacterianes, diabetogèniques, antitumorals i alhora és un compost carcinogènic. Produeix un síndrom diabètic al 100% de les rates a les 48 hores de la seva administració endovenosa, mitjançant la destrucció selectiva de cèl.lules beta pancreàtiques. També s'ha demostrat el seu efecte diabetogen mitjançant l'administració intraperitoneal a dosis baixes, en ratolins (Like et al, 1976).

Amb el desenvolupament de la tècnica d'obtenció d'illots en rossegadors mitjançant la digestió amb col.lagenasa, es van practicar els primers trasplantaments d'illots pancreàtics. Els illots es trasplantaren a la cavitat peritoneal o a la massa muscular de la cuixa de rates diabètiques mitjançant l'injecció de STZ. Es va aconseguir la reducció de l'hiperglicèmia (Ballinger et al, 1972).

Estudis de diferents llocs d'implant dels illots en rossegadors van demostrar que els illots subcutanis no són funcionants, mentre els injectats a través de la vena

porta produïen i mantenien la normoglicèmia en el receptor del trasplantament (Kemp et al, 1973).

Posteriorment es va demostrar en rossegadors que els illots alogènics trasplantats eren ràpidament rebutjats, independentment que aquests illots fossin fetals, neonatals o adults.

Entre els agents immunosupressors que es van utilitzar en aquests estudis hi havia l'azatioprina i el sèrum anti-limfocitari (ALS) que produïen una moderada prolongació de la supervivència de l'aloingert intraportal d'illots, mentre la metilprednisolona no produïa cap efecte (Market et al, 1976).

L'implantació intraperitoneal de grans quantitats de teixit pancreàtic neonatal de rata ha demostrat revertir la diabetis a la rata (Leonard et al, 1974). També s'ha aconseguit la normoglicèmia en rates diabètiques trasplantant de 3 a 4 pàncreas fetals de rata sota la càpsula renal (brown et al, 1981). Aquests descobriments són de gran importància respecte on fer l'implant a l'home, ja que fisiològicament quantitats menors de teixit insular poden ser requerides per aconseguir la normoglicèmia en receptors diabètics si es trasplanten al sistema venós portal comparat amb el sistema vascular sistèmic.

La càpsula renal, així com la melsa, han estat ubicacions favorables per a l'implantació d'illots, degut a que la tècnica quirúrgica no ha estat massa complicada, es pot controlar visualment l'introducció d'illots, i a més, són òrgans molt adequats per al posterior estudi histològic (Houwing H et al, 1997).

S'ha descrit una pèrdua gradual del control metabòlic dels illots intraportals (Hiller et al, 1991) que pot ser deguda a l'inervació defectuosa de l'ingert, número insuficient, pèrdua progressiva de cèl.lula beta trasplantada, o baixa viabilitat inicial dels illots.

Un altre dels models d'implantació dels illots pancreàtics ha estat microencapsulats dins de cèl.lules de Sertoly a la cavitat peritoneal. S'ha comprovat que amb aquest mètode el funcionalisme de l'ingert ja es pot detectar entre el quart i sisè dia del trasplantament. La cèl.lula de Sertoly produeix factors

immunosupressors a nivell local exercint un efecte immunoprotector (Yang H et al, 1999).

Això indica que els ingerts d'illots han de complir uns criteris quantitius i qualitius previs al trasplantament, que han de ser determinats, ja que la composició cel.lular i la viabilitat dels ingerts pot variar considerablement d'una preparació a una altra.

L'habilitat dels ingerts per sobreviure en el lloc d'implantació depèn, entre d'altres factors, de la capacitat dels illots trasplantats per reorganitzar-se en el lloc d'implantació, desenvolupar terminacions nervioses i revascularitzar-se, amb la formació de capil.lars de novo (Mendola JF et al, 1997). Un període perllongat d'isquèmia de la cèl.lula beta trasplantada implica la seva necrosi i la falta de funció primària de l'ingert.

La revascularització dels illots trasplantats es dona a tots els llocs d'implantació examinats (fetge, ronyó, múscul), tot i que l'angiogènesi és més ràpida si l'ingert d'illots està implantat pel sistema vascular portal o en òrgans molt vascularitzats, com la melsa (Sandler et al, 1987).

S'ha descrit que l'hiperglicèmia crònica i l'administració de determinats fàrmacs immunosupressors al receptor, així com períodes de cultiu dels illots superior a 24 hores poden afectar al fluxe sanguini dels illots implantats a la càpsula renal o al fetge (Jansson et al, 1989). No obstant, existeixen discrepàncies en aquest aspecte, explicades per les diferents tècniques utilitzades en la determinació de l'angiogènesi (Mendola et al, 1994).

Les bases mol.leculars de l'absència de funció primària de l'ingert d'illots encara no es coneixen. S'ha atribuït un paper crític als mediadors inflamatoris com les citoquines i radicals lliures produïts localment. S'ha descrit que existeix producció local d'òxid nítric (NO) associat a inflamació inespecífica degut al procediment quirúrgic del trasplantament i als macròfags del receptor que intervien a la resposta immune al rebuig (Market et al, 1995). Aquesta producció d'NO és deguda a l'activitat d'una isoforma induïble per citoquines de l'enzim sintetasa de l'NO (iNOS). El NO produït per iNOS en el microambient de l'ingert d'illots, així

com el produït en els propis illots, contribueix a l'absència de funció primària dels illots trasplantats, ja que el NO inhibeix la secreció d'insulina de la cèl.lula beta. S'ha demostrat que l'administració in vivo d'inhibidors de la producció d'NO milloren l'implantació de l'ingert d'illots i prevenen la falta de funció primària (Stevens et al, 1994; Stevens et al, 1996).

### II.6.2.3. Diferents localitzacions de l'ingert

L'èxit del trasplantament d'illots pancreàtics depèn de diversos factors, d'entre els quals el lloc d'implantació n'és de gran importància. És per aquest motiu que s'ha experimentat el trasplantament a múltiples localitzacions per intentar-ne millorar el rendiment.

El fet que s'hagi intentat l'implantació d'illots a tan diverses localitzacions és significatiu, ja que és signe inequívoc que encara no s'ha trobat l'orga o localització òptima.

Les característiques histològiques (vascularització, inervació, tipus d'epiteli, ...), fisiològiques (secrecions, pH, nutrients,...), funció immunològica (òrgans immunològicament privilegiats), així com l'accessibilitat, determinen l'èxit o fracàs del lloc d'implantació.

Les localitzacions més experimentades i, per tant, més acceptades són, el fetge, mitjançant la injecció d'illots per via portal, i la càpsula renal.

Els llocs que es consideren immunològicament privilegiats fins a l'actualitat són el cervell, l'ull, els testicles i l'úter. En aquests llocs, en principi, els antígens no creen respostes immunitàries destructives.

Destacarem algunes de les localitzacions experimentades en rates:

- **Càpsula renal:** Nombrosos estudis demostren bons resultats a llarg termini en el trasplantaments d'illots de pàncreas a la càpsula renal. La supervivència de l'ingert és superior a la del trasplantament per via portal, però requereix un major número d'illots per assolir la normoglicèmia (Jaeger C et al, 1995).

- **Fetge:** Al igual que el trasplantament subcapsular renal, el trasplantament d'illots al fetge per via portal ha estat el més estudiat, obtenint bons resultats. Sembla que assoleix la normoglicèmia més ràpidament i amb menys illots, però la supervivència de l'ingert és més curta (Jaeger C et al, 1995). És el lloc d'implantació utilitzat en humans.
- **Melsa:** S'han fet diversos estudis comparant l'ingert a nivell de càpsula renal, intrahepàtic i a melsa, mostrant funcionalitat similar, i demostrant-se que la funció és depenent del número d'illots i del manteniment d'una correcta oxigenació (Carlsson PO et al, 2001 / Van Suylichem PT et al, 1994).
- **Úter:** Un estudi compara l'efecte del trasplantament d'illots a l'úter, com a òrga potencialment immunològicament privilegiat, amb el trasplantament a cavitat peritoneal. Les rates del primer grup, tot i que inicialment normalitzen les glicèmies, tornen a ser diabètiques als 20 dies del trasplantament. Histològicament s'observa un descens progressiu dels illots adherits a la cavitat uterina. Es conclou que no s'ha obtingut una supervivència a llarg termini dels illots trasplantats a l'úter (Sakonju I et al, 1994).
- **Testicle:** Nombrosos estudis demostren que el trasplantament d'illots als testicles assoleix la normoglicèmia mantinguda, i que el xenotrasplantament és més favorable als testicles en comparació amb el fetge, ronyó i melsa, motiu pel que es postula que es tracta d'un òrga immunològicament privilegiat (Bobzien B et al, 1983 / Ar'Rajab A et al, 1994).
- **Timus:** Donada la funció del timus en el reconeixement i adquisició de tolerància pels antígens propis, nombrosos estudis presenten la supervivència d'illots trasplantats a aquest òrga, sense necessitat d'immunosupressors. No obstant, els illots trasplantats no aconsegueixen normalitzar les glicèmies a la majoria dels casos, si s'implanten un número similar d'illots que al ronyó o fetge (Rayat GR et al, 1997).
- **Subcutani:** Fins a finals dels anys 90 els intents de trasplantament al teixit subcutani havien fracassat. Es justificava per l'insuficient aport d'oxigen. Estudis posteriors, utilitzant factor de creixement dels fibroblasts (bFGF),

com a factor que indueix la neovascularització, i amb els illots envoltats per una càpsula, han obtingut bon resultats (Kawakami Y et al, 2000 / Gu Y et al, 2001).

- **Múscul estriat:** És utilitzat en un estudi en que l'objectiu és determinar la importància de la contaminació de l'ingert amb teixit exocrí. S'observa que aquest dificulta la neovascularització de l'ingert (Heuser M et al, 2000).
- **Cavitat pleural:** Com les cèl.lules pancreàtiques requereixen un important aport d'oxígen, s'observa una elevada mortalitat cel.lular després d'un trasplantament d'illots. Kaur et al proposen la cavitat pleural com una font ilimitada d'oxígen per difusió, i per tant no dependent de l'aport vascular (Kaur S et al, 2000).
- **Intracerebral:** Tze WJ et practiquen alotrasplantaments d'illots al cervell de rates per demostrar que és un orga immunològicament privilegiat. Les troballes histològiques afavoreixen aquesta hipòtesi (Tze WJ et al, 1984).
- **Cisterna Magna:** Un experiment demostra en un número reduït de ratolins que l'alotrasplantament d'illots a la cisterna magna (guiat per estereoatàxia) pot ser un lloc immunològicament privilegiat, donat que manté les normoglicèmies per un període de 210 dies (Lee HC et al, 1992).
- **Ventricles cerebrals:** S'han fet estudis per intentar comprovar si era una localització immunològicament privilegiada. En rates singèniques s'ha assolit la normoglicèmia, mantinguda durant més de 34 setmanes, però l'alotrasplantament ha demostrat que no és una localització immunològicament privilegiada (McEvoy RC et al, 1983).
- **Cavitat peritoneal:** Varis estudis demostren que l'implant peritoneal dels illots pot normalitzar la glicèmia de rates diabètiques (Fritschy WM et al, 1991).
- **Mesenteri intestinal:** Hi ha poca experiència, però sembla que es pot normalitzar la glicèmia en aquest tipus de trasplantament (Behme MT et al, 1994).
- **Epiplon:** Es van encapsular illots a l'epiplon, obtenint una normoglicèmia mantinguda. Al extirpar aquestes bosses d'epiplon hi havia un ràpid retorn a la situació de diabetis (Yasunami Y et al, 1983).

- **Budell prim:** L'experiència és mínima i per tant no se'n poden treure conclusions (Sageshima J et al, 2001).
- **Recte:** Experiència anecdòtica (Lim SM et al, 1994).

#### 11.6.2.4. Problemàtica del trasplantament d'illots

El trasplantament d'illots pancreàtics hauria de substituir el trasplantament de pàncreas per al tractament de la diabetis mellitus, donat que és més fàcil d'implantar i es substitueixen únicament les cèl.lules malaltes. No obstant, nombrosos són els problemes que han anat presentant-se en aquest tipus de trasplantament. Afortunadament, sembla que els darrers resultats són més esperançadors. Enumerarem alguns dels principals problemes als que fem referència:

1. **Número d'illots:** Quantitat d'illots necessaris per assolir la normoglicèmia a la majoria dels trasplantats. Alguns factors, com l'orga on es trasplanta i la puresa dels illots poden afectar aquesta variable.
2. **Puresa de les cèl.lules trasplantades:** La contaminació amb cèl.lules exocrines dificulta l'angiogènesi de l'implant (Heuser M et al, 2000).
3. **Oxigenació de l'ingert:** Donat que les cèl.lules pancreàtiques tenen una elevada despesa energètica, després de l'implant es produeix una elevada taxa de mort cel.lular, ja que no hi ha hagut temps per a l'angiogènesi (Kaur S et al 2000). El trasplantament en òrgans ricament vascularitzats afavoreix la supervivència de l'ingert.
4. **Temps d'isquèmia:** Com en qualsevol altra orga trasplantat, el temps entre l'extracció i l'implant és de gran importància.
5. **Localització de l'ingert:** Diverses localitzacions s'han mostrat bones per al trasplantament d'illots, però es segueix experimentant per trobar el lloc que, idealment, hauria de ser de fàcil accés, ben oxigenat-vascularitzat i immunològicament privilegiat.



6. Immunosupressió: Les pautes immunosupressores han variat molt darrerament i sembla que pot ser el motiu dels darrers èxits en el trasplantament d'illots en humans. Sembla que l'eliminar els corticoids (diabetògens) de les pautes millora el control de les glicèmies.

#### II.6.2.5. Trasplantament d'illots en humans: situació actual

El número total d'alotrasplantaments entre 1974 i 31 de desembre de 2000 és de 493. De 1974 a 1989 n'hi ha 99, amb pitjors resultats, i a partir d'aquesta data n'hi ha 394, amb resultats més òptims, gràcies a l'aplicació de les tècniques de purificació d'illots de Ricordi (Ricordi et al, 1988).

Si bé els resultats actuals, en el que a la funció dels ingerts es refereix, són millors que els de la dècada dels 80 quan tan sols el 20% presentava funcionalitat dels illots a la setmana del trasplantament, encara estan lluny dels resultats que s'obtenen amb el trasplantament de pàncreas.

Fins al 31 de desembre de 2000 s'han practicat 241 trasplantaments d'illots a 18 institucions nord-americanes, 246 a 30 institucions europees i 6 a d'altres països, que sumen els 493 practicats fins aquesta data. El número total de pacients diabètics que han assolit la insulino independència per un període de >1, >3, >6, >12, >36, >48 i > de 60 mesos és de 66, 62, 54, 40, 22, 11, 6 i 2, respectivament.

Amb la millora en les tècniques d'aïllament i purificació d'illots, i el continu intercanvi d'experiències entre els diferents centres, ha augmentat considerablement el número de trasplantaments d'illots a la pràctica clínica.

Si s'analitzen les dades del període entre l'1 de gener de 1990 i el 31 de desembre de 2000, s'observa que, en pacients amb diabetis mellitus tipus 1 i en pacients diabètics post-pancreatectomia total, amb Pèptid-C negatiu pre-trasplantament, els que presenten nivells de Pèptid-C > 0.5 ng/ml al mes del trasplantament i els que assoleixen la insulino-independència durant més d'una setmana, en el període de 1985 a 89 (n=28) eren 36% i 7%, respectivament, mentre de 1990 a 93 (n=82) era

del 71% i 16%, respectivament. De 1994 al 97 (n=118) era del 68% i 15%, respectivament; i de 1998 a 1999, era del 95% i 19%, respectivament.

Els millors resultats en la funcionalitat s'expliquen pel esforços realitzats en la millora de les tècniques d'aïllament i purificació, el control de qualitat dels illots previs al trasplantament, l'eliminació dels factors adversos en els primers dies del trasplantament i la millora dels protocols d'immunosupressió. També s'estan fent esforços per intentar augmentar el nombre d'illots trasplantats d'un sol pàncreas donant.

Seguint en l'anàlisi dels resultats dels 237 trasplantaments realitzats entre 1990 i 1999, s'observa que la supervivència a un any dels pacients és del 96%, la supervivència de l'ingert a un any (definida per la concentració basal de Pèptid-C > 0.5 ng/ml), és de 41%, i l'11% dels pacients assoleixen la insulino-independència a l'any del trasplantament.

L'establiment de la independència insulínica s'afavoreix pels següents aspectes:

- a) temps de preservació dels illots < 8 hores
- b) trasplantament de > 6000 illots per Kg de pes del receptor
- c) inducció d'immunosupressió amb anticossos mono o policlonals de cèl.lules T
- d) trasplantament al fetge via portal

67 dels 237 pacients trasplantats presenten totes aquestes característiques. 58 dels 67 (87%) presentaven nivells basals de Pèptid-C > 0.5 ng/ml, 44 de 60 (73%) presentaven nivells de Hb A1c (glicosilada) < 7%, i 13 de 60 (22%) eren insulino-independents amb més d'un any de seguiment (Brendel M et al, 2001).

La majoria d'aquests trasplantaments s'han efectuat amb pautes immunosupressives que combinen globulina anti-limfocítica, ciclosporina, azatioprina i glucocorticoids (Brendel M et al, 1999).

Recentment, el grup del Dr James Shapiro de la Universitat d'Alberta ha fet públic un experiment clínic, anomenat Protocol d'Edmonton, en que s'introdueixen 2 variants importants: es millora la tècnica de depuració i implantació d'illots i, en segon lloc, una terapia immunosupressora sense corticoids ni ciclosporina, per evitar el dany sobre la cèl.lula beta i la inducció de la resistència perifèrica a la

insulina. S'han utilitzat combinacions de Sirolimus, baixes dosis de Tacrolimus i un anticòs monoclonal contra el receptor de la interleucina-2 (Daclizumab). El pacient es beneficia d'una curta estada hospitalària i d'una intervenció radiodirigida amb anestèsia local. L'implantació es pot repetir en funció de la resposta aconseguida. La sèrie publicada, tot i que curta, presenta excel·lents i esperançadors resultats. A 17 pacients se'ls van trasplantar un mínim de 9000 illots/Kg. 12 (80%) eren insulino independents a l'any i les complicacions van ser poc importants (trombosi portal parcial, sagnat portal per la punció percutània, transaminitis) i no s'ha produït cap mort (Shapiro J et al, 2000) (Ryan EA et al, 2002).

A diferència del que succeeix amb l'alotrasplantament, l'autotrasplantament d'illots de pàncreas ha assolit amb major freqüència la insulino independència del receptor. Segons el Registre Internacional de Trasplantaments, fins al 31 de desembre de 2000 s'han realitzat 240 autotrasplantaments. En el període de 1990 a 2000 s'ha assolit la insulino independència a l'any del trasplantament en el 47% dels pacients, que arribava al 71% si s'havien trasplantat més de 300.000 illots.

L'autotrasplantament s'ha practicat, sobretot, en pacients amb pancreatitis crònica dolorosa. Se'ls practica una pancreatectomia total seguida per l'aïllament d'illots i la seva infusió per via portal a les poques hores de l'intervenció. Aquesta dada és important ja que significa que es pot assolir la insulino independència amb els illots obtinguts d'un sol donant, i que la massa crítica d'illots es troba al voltant dels 250.000-300.000. Tot i això s'ha de tenir en compte que són un grup de pacients molt particulars ja que no es donen factors com l'absència de rebuig, la no administració d'immunosupressors potencialment perjudicials pels illots, l'absència d'autoimmunitat contra els illots pancreàtics, l'extracció amb la pancreatectomia de cèl·lules alfa productores de glucagó, o l'absència d'anys d'hiperglicèmia i de les complicacions de la diabetis en el receptor que podrien dificultar l'implantació dels illots.

Així doncs, si bé el rebuig dels illots sembla que juga un paper fonamental en l'escassa supervivència dels illots trasplantats, no s'entén bé per què la mateixa

pauta immunosupressora que permet obtenir la insulino independència al 80% dels trasplantaments de pàncreas tan sols ho aconsegueix al 7% dels illots trasplantats.

## **II.7. LES VESÍCULES SEMINALS COM A ÒRGAN HOSTE**

### **II.7.1. Anatomia i fisiologia de les vesícules seminals**

#### **II.7.1.1 Humans**

Són formacions tubulars enrotllades sobre sí mateixes, d'uns 5 a 10 cm de longitud, amb aspecte exterior vesiculós, profundament situades a la pelvis, en íntima relació amb la cara posterior de la bufeta, sobre la pròstata, i per fora de l'extremitat ampullosa dels conductes deferents. La seva direcció és obliqua cap a baix i dintre, i no són directament explorables al tacte rectal.

Presenta una estructura histològica tricapa (mucosa, muscular i adventícia). La mucosa, que presenta marcats replecs longitudinals, està formada per un epitelí columnar pseudoestratificat amb estereocilis i cèl.lules basals, a més d'una fina làmina pròpia. La capa muscular és molt compacta i formada per 2 estrats de múscul llis. L'adventícia destaca per la riquesa en vasos i filets nerviosos que profunditzen a la capa muscular, a la que abunden les terminacions neuromusculars. La llum de la vesícula presenta un aspecte trabeculat (Patel B et al, 2002).

Són glàndules anexas de l'aparell genital masculí i tenen la missió de segregar el vehicle físic per al transport dels gamets. La seva secreció discretament alcalina protegeix els gamets de l'acidesa vaginal, i el seu alt contingut en fructosa garanteix l'energia necessària per la motilitat dels espermatocits. Altres elements continguts a les vesícules seminals són també estimuladors de la motilitat de l'espermatocit: el potassi, el bicarbonat, el magnesi la 19-OH-prostaglandina i la prolactina (Gonzales GF et al, 2001). La presència de prostaglandines en el líquid vesicular, que equival al menys al 50% de l'ejaculat, a més de l'efecte estimulador de la motilitat de l'espermatocit, té un efecte estimulador sobre la fibra llisa del tracte genital femení. L'òrgan de la coagulació actua coagulant el semen líquid que arriba dels testicles. Aquest pas és important per que tots els espermatozous entrin en contacte amb tots els ingredients del semen. Les vesícules seminals

també tenen la funció d'incrementar l'estabilitat de la cromatina espermàtica i suprimir l'activitat immune en el tracte genital femení.

Les vesícules seminals secreten insulina o pèptids similars a la insulina fent que la concentració d'aquesta al líquid seminal sigui superior a la de la resta del plasma. El significat funcional d'aquest fet és desconegut (Gonzales GF, 2001).

#### **II.7.1.2 Rates**

Respecte les vesícules seminals humanes, destaca el seu gran tamany en proporció a òrgans contigus com la pròstata o la bufeta urinària. Cada glàndula mesura de 17 a 25 mm en l'eix longitudinal, 8-11 mm en l'eix transversal i 5-6 mm en l'eix antero-posterior. El pes varia entre 0.7 i 1.5 grams. La seva ubicació és dorsolateral a la bufeta urinària i està en contacte amb el recte a la seva cara posterior. La cara còncava (medial) està en contacte amb l'òrgan de la coagulació. Excepte en aquesta cara, tota la glàndula està recoberta de peritoni. El conducte excretor, orientat caudalment està en íntim contacte amb el lòbul dorso-lateral de la pròstata. El conducte excretor transcorre dorsal al conducte deferent fins que arriben a una comú desenvolupadura, l'ostium ejaculador.

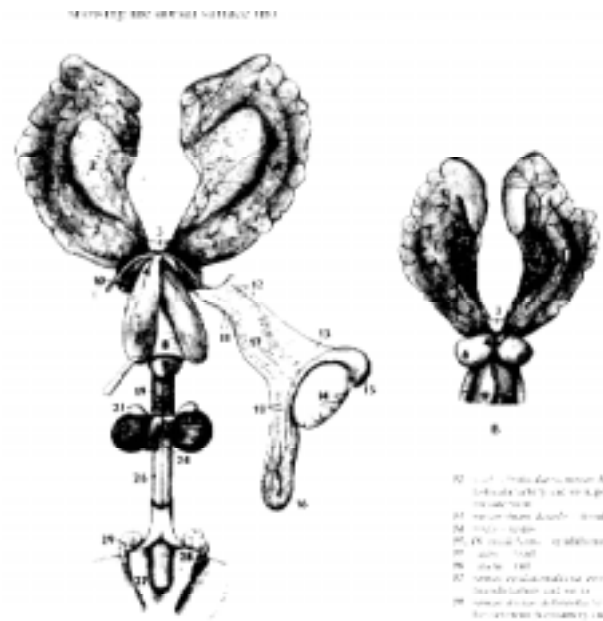
L'òrgan de la coagulació es troba a la cara còncava de les vesícules seminals i està unit a aquestes per teixit connectiu. Són un conjunt de 5 a 6 túbuls. L'òrgan mesura uns 3 a 6 mm i pesa de 40 a 110 mg. El llarg i estret conducte excretor transcorre lateral i ventral al conducte deferent i desenvolupa cranio-lateral a l'ostium ejaculador. La paret més interna de l'òrgan forma profunds solcs i septes que subdivideixen la llum en nombroses criptes.

L'hili vascular entra per l'òrgan de la coagulació i es bifurca en una arcada que irriga tota la vesícula seminal.

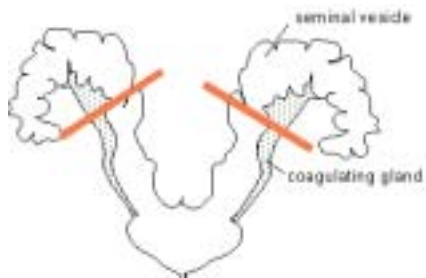
Histològicament, la glàndula està envoltada per una fina capa muscular uniforme.

L'epiteli glandular està format per una monocapa de cèl.lules columnars altes que

contenen grànuls secretors. També es troben, entre les cèl.lules columnars altes, algunes cèl.lules columnars baixes.



**Figura 1.** Aparell genitil masculí de rata. Les vesícules seminals destaquen pel seu gran tamany. A la part còncava de les vesícules s'observa l'orga de la coagulació.



**Figura 2.** Vesícules seminals de rata. Per l'orga de la coagulació transcorren els vasos principals, que es bifurquen en múltiples col.laterals que irriguen la vesícula seminal.

## **II.8. PERSPECTIVES FUTURES EN EL TRACTAMENT DE LA DIABETIS**

Actualment no existeix la prevenció enfront la diabetis tipus 1, tot i que n'és la finalitat dels recents assatjos clínics d'administració d'antígens insulars: un cop detectada de forma precoç la destrucció de les cèl·lules productores d'insulina, es puguin aplicar tractaments de tolerància que serveixin per impedir el desenvolupament de la malaltia, com és el cas de l'administració d'insulina a través de les mucoses. No es coneix com podria actuar, però seria com a immunomodulador, induint tolerància o afavorint el repòs de la cèl·lula  $\beta$ . Una altra estratègia és l'investigació de substàncies que previnguin la destrucció dels illots, com la nicotinamida, o que puguin regenerar els illots, com els derivats del tungstè.

Els pacients amb diabetis tipus 1 depenen de l'administració d'insulina exògena per a controlar els seus nivells de glucosa. Per augmentar la qualitat de vida i disminuir el risc de complicacions secundàries, les perspectives de futur s'enfoquen cap a camps revolucionaris com la teràpia gènica, les cèl·lules pluripotencials o "stem cells" i el trasplantament d'illots. En tot cas, es pretèn aconseguir una font d'insulina endògena amb regulació metabòlica.

La investigació sobre la diabetis és un camp prioritari per la seva prevalença i gravetat. És d'esperar que els propers avenços en aquest camp aconseguixin determinar les causes de la diabetis tipus 1 i aconseguir la seva prevenció mitjançant l'aplicació de vacunes o tractaments de tolerància eficaços.

Aprofundirem sobre algunes de les àrees d'investigació de més actualitat:

### **II.8.1. Immunomodulació d'illots pancreàtics**

En animals d'experimentació, principalment ratolins i rates, s'han descrit múltiples formes d'immunomodulació dels illots que han permès el trasplantament sense necessitat de mantenir un tractament immunosupressor per sempre. Entre d'altres



s'han descrit el cultiu d'illots en condicions de temperatura o atmósfera específiques abans del trasplantament (Jaeger C et al, 1994); la irradiació dels illots (Kimura T et al, 1994); el tractament dels illots amb anticossos específics anticèl.lules dendrítiques (Goss et al, 1996); o el bloqueig dels antígens del sistema major d'histocompatibilitat classe I (Osorio RW et al, 1993). El trasplantament d'illots en llocs immunoprivilegiats, com el cervell o els testicles (Barker et al, 1977) (Selawry HP et al, 1984) o la inducció de tolerància del receptor trasplantant els illots al timus (Lakey JRT et al, 1996) també ha permès la supervivència de l'ingert sense immunosupressió. La prevenció del rebuig s'ha assolit sobretot en ratolins, essent més difícil en rates. En humans, aquestes opcions en alguns casos no són viables i possiblement tampoc permetrien substituir el tractament immunosupressor (Benhamou PY et al, 1998).

En el cas del testicle, diversos treballs han posat de manifest que els alotrasplantaments d'illots a aquest nivell no requereixen d'immunosupressió sistèmica (Baeker et al, 1977), havent-se comprovat que són les cèl.lules de Sertoly les que localment impedeixen la destrucció de l'ingert. Recentment, Korbitt et al han comunicat que l'alotrasplantament d'un agregat de cèl.lules de Sertoly i d'illots assoleix la normoglicèmia a la rata diabètica sense necessitat d'immunosupressió sistèmica (Korbitt et al, 1997). A l'anàlisi dels ingerts es va observar que les cèl.lules beta estaven en estreta relació amb les cèl.lules de Sertoly que expressaven el lligand de FAS. El lligand de FAS és una proteïna de membrana tipus II d 40kD, membre de la superfamília de TNF, que indueix l'apoptosi a les cèl.lules susceptibles a FAS (Sainio-Pöllänen S et al, 1998). Recentment s'ha demostrat la seva presència no tan sols en illots de rossegadors, sinó també en humans (Loweth et al, 1998), pel que s'ha implicat en el mecanisme de mort cel.lular observat a la insulinitis autoimmune de la diabetes mellitus tipus I, de manera que la cèl.lula beta no seria una víctima passiva dels mecanismes autoimmunes de destrucció, sinó que jugaria un paper actiu d'autodestrucció mitjançant apoptosi (Loweth AC et al, 1998).

### **11.8.2. Immunoaïllament d'illots pancreàtics**

Una alternativa factible per evitar la necessitat d'immunosupressió i així permetre el trasplantament en fases inicials de la malaltia és l'immunoaïllament dels illots en dispositius biohíbrids amb membranes que els aïllin del sistema immunològic del receptor. (Davies et al, 1996)

Aquestes membranes han de permetre, no obstant, el pas a través seu de nutrients, oxígen i electrolits per preservar els illots, i dels productes de secreció cel.lular per mantenir una resposta insulínica adequada. La protecció dels illots hauria de permetre el trasplantament d'illots pancreàtics humans en pacients diabètics sense immunosupressió i, permetria també, el xenotrasplant d'illots d'altres espècies, podent-se superar així la limitació imposada per la falta d'illots humans. Però, a més, l'immunoaïllament hauria d'evitar l'atac immunològic responsable de la diabetis autoimmune en aquests pacients i, per tant, la recidiva de la malaltia, com s'ha vist que pot succeir en pacients trasplantats amb pàncreas vascularitzat (Tyden et al, 1996) o amb illots (Jaeger et al, 1996).

### **11.8.3. Xenotrasplantament**

La falta d'òrgans i teixits per trasplantar posa uns límits clars a l'expansió del trasplantament com a eina terapèutica. Aquesta manca és encara més notable en el cas de la diabetis, donada l'alta prevalença de la malaltia. Als USA hi ha 35.000 nous casos de diabetis tipus 1 a l'any, mentre que es disposa tan sols de 6.000 pàncreas de donants. El xenotrasplantament (trasplantament en humans d'òrgans d'altres espècies) és una de les vies en les que s'està estudiant per solucionar la manca de donants (Fabre JN et al, 1995).

Com a conseqüència de la seva similitud anatòmica i fisiològica amb els humans, i la facilitat per criar-los en gran nombre, es considera que el porc és la font més viable d'òrgans per aquest tipus de trasplantament (Davalli et al, 1993). L'ús de material no humà per al tractament de la diabetes no és nou, ja que les insulines

utilitzades fins a l'arribada de la insulina humana, al final de la dècada dels 80, eren bovines i porcines.

La primera sèrie de 10 xenotrasplantaments d'illots procedents de fetus de porc a humans es realitzà a Estocolm a principis dels anys 90. La funció insular va ser transitòria donada la potent resposta immune que desencadenen els teixits i cèl.lules xenotrasplantats. (Groth CG, 1994)

Les estratègies per al xenotrasplantament d'illots es plantegen des del punt de vista de l'aïllament immunològic dels illots amb el sistema d'encapsulació o de la modificació de les característiques immunològiques de l'illot per evitar o atenuar la resposta immune.

L'atenuació o evitació del rebuig hiperagut ha concentrat bona part dels esforços en el camp del xenotrasplantament d'òrgans. Un dels resultats més espectaculars s'ha produït de l'obtenció de porcs transgènics que expressen els inhibidors humans del complement (Fodor et al, 1994). També s'ha obert una via per al bloqueig dels anticossos naturals xenorreactius amb la identificació del carbohidrat  $\alpha$ -gal com una de les dianes principals dels anticossos (Sandrin et al, 1994).

S'han plantejat diverses vies per a l'implantació del xenotrasplantament, una d'elles la subcutània, amb ingerts microencapsulats. S'ha demostrat que poden mantenir un bon nivell de secreció d'insulina (Kawakami Y et al, 1997).

A part del rebuig, el xenotrasplantament planteja altres problemes que s'han de considerar. La curta expectativa de vida dels porcs en comparació als humans podria limitar els anys de funció de l'ingert, problema seriós en el cas del trasplantament de cor i fetge. En el cas dels illots, el fet de realitzar un nou trasplantament per substituir l'anterior, possiblement no plantejaria problemes importants.

No es pot obviar el risc de transmissió de malalties infeccioses de l'espècie donant a l'home. Ja ha estat observada la transmissió de retrovirus endògens porcins (PERV) des de línies cel.lulars i limfocits porcins a cèl.lules humanes *in vitro*. (Bach FH et al, 1998). La recent epidèmia d'encefalopatia espongiforme sembla haver

incrementat les reserves prèvies que es tenia en contra del xenotrasplantament. Als USA, les autoritats sanitàries han aturat qualsevol estudi clínic al respecte fins que no hi hagi l'absoluta seguretat que no hi ha la possibilitat de transmissió de retrovirus endògens.

#### **II.8.4. Trasplantament fetal**

Tenint en compte la gran capacitat de replicació del teixit pancreàtic fetal en comparació amb la dels illots adults, el seu ús per al trasplantament seria una altra manera de resoldre la manca de teixit donant. En ratolins diabètics s'ha comprovat que, una vegada trasplantat el teixit fetal, segueix madurant i la majoria de les cèl.lules es diferencien en cèl.lules  $\beta$ , que restauren la normoglicèmia mesos després del trasplantament (Tuch et al, 1996). En aquests trasplantaments d'illots fetals s'observa com inicialment mantenen la capacitat secretora d'insulina enfront a diversos secretagogs, però no a la glucosa, probablement per immaduresa en la resposta insulinosecretora. No obstant, s'ha vist que tant l'activitat de la glucoquinasa com la captació de calci estan íntegres (Tu J et al, 1997).

Per altra banda, quan es trasplanten illots fetals humans, també s'ha vist com aquests superen als illots adults en la capacitat de revertir l'hiperglicèmia, presentant més alliberació d'insulina i pèptid C que els ingerts equivalents d'illots adults en resposta a l'estímul (Hayek et al, 1997). En aquest sentit encara presenten millors resultats els conglomerats de cèl.lules d'illots obtinguts per la digestió amb col.lagenasa del pàncreas fetal que els illots fetals. En qualsevol cas, s'ha demostrat un important paper del medi i de les interaccions cel.lulars en el desenvolupament d'aquestes cèl.lules fetals (Beattie GM et al, 1996).

Recentment, en un receptor de trasplantament renal es van trasplantar de forma simultània illots fetals a la càpsula fetal i es va demostrar un descens en els requeriments d'insulina d'un 50%, i en el control ecogràfic, una duplicació del volum d'illots trasplantats als 24 mesos del trasplantament (Farkas et al, 1995).

#### **11.8.5. Teràpia gènica**

La teràpia gènica inclou les formes de tractament mitjançant les que, manipulant el genoma cel·lular, es pretèn prevenir o tractar una malaltia (Blau HM et al, 1995). Per raons ètiques i de seguretat, les cèl·lules germinals queden excloses d'aquesta manipulació, que es reserven a les cèl·lules somàtiques a les que s'introdueixen i expresen els gens recombinants. Fins ara, les malalties en que s'ha paltejat l'ús de la teràpia gènica han estat malalties hereditàries com la fibrosi quística, la malaltia de Gaucher o la distròfia muscular de Duchenne, entre d'altres. No obstant, el potencial terapèutic inclou també malalties adquirides que afecten sectors molt més amplis de la població, com és el càncer, malalties cardiovasculars o la artritis reumatoide. Per tant, l'atractiu i les possibilitats de futur de la teràpia gènica són enormes i ja hi ha un nombre considerable d'assatjos clínics en marxa. Fins ara els resultats obtinguts no han demostrat que aquest model terapèutic hagi estat efectiu en el tractament de cap malaltia en humans (Ferber S et al, 2000). Referent al trasplantament, als darrers anys, el millor coneixement de les bases mol·leculars i bioquímiques que regulen la secreció d'insulina per part de les cèl·lules beta, junt amb els avenços realitzats en tecnologia gènica, han obert noves expectatives que es basen en l'aplicació d'alternatives mol·leculars que permetin restablir una secreció d'insulina normal a la diabetis mellitus.

#### **11.8.6. Línies cel·lulars**

Una línia cel·lular beta podria representar un suministre ilimitat de cèl·lules productores d'insulina. Un dels majors obstacles per la seva consecució és el fet que les cèl·lules beta són difícils de mantenir i no es divideixen en cultiu (Arias J et al, 2001). La utilització de línies cel·lulars productores d'insulina presenta diverses avantatges teòriques sobre altres formes de substitució del teixit

productor d'insulina. Les línies cel·lulars es poden produir a baix cost, durant un llarg període de temps, en grans quantitats, a la vegada que es manté de forma constant, estable i reproducible la seva capacitat per secretar insulina.

Diversos grups d'USA i Europa estant intentant crear una línia cel·lular beta mitjançant la introducció de gens en cèl·lules beta adultes humanes per induir la seva proliferació (De la Tour D. et al, 2001). La principal dificultat està en preservar la capacitat única que posseeixen les cèl·lules beta per produir insulina d'acord amb els valors de glucosa. Les cèl·lules precursors de les ductals pancreàtiques també es consideren candidates per la creació d'una línia cel·lular que pogués ser utilitzada per al trasplantament. El grup de Lille ha trobat que, en condicions específiques de cultiu, algunes cèl·lules del ducte pancreàtic presenten una capacitat per diferenciar-se en cèl·lules productores d'insulina (Gmyr V et al, 2000) (Kerr-Conte J et al, 1996).

També es poden obtenir línies cel·lulars productores d'insulina a partir de tumors de cèl·lules beta (insulinomes). Aquest tipus de línia cel·lular presenta dos tipus de problemes: el seu origen neoplàsic i la falta de resposta a l'estímul fisiològic de la glucosa (Tziampazis et al, 1995).

#### **II.8.7. "Stem cells"**

Una de les noves línies d'investigació és la transformació de les cèl·lules mare ("stem cell") en cèl·lules progenitores, en aquest cas, cèl·lules beta pancreàtiques, donada la capacitat que tenen per diferenciar-se cap a diferents línies cel·lulars. Es defineix "stem cell" com aquella amb potencial per proliferar i diferenciar-se en qualsevol línia cel·lular, i que es pot modificar in vitro. Es coneixen diferents fonts de "stem cells": 1) "stem cells" embrionàries, 2) cèl·lules germinals embrionàries, 3) cèl·lules cancerígenes embrionàries, i 4) "stem cells" adultes (Berna G et al, 2001). Aquesta línia d'investigació té l'inconvenient d'enfrontar-se a consideracions ètiques i sobretot a problemes legals i polítics, donat que en molts països n'està prohibit l'ús en investigació. Tot això dificulta l'avenç en aquesta línia.

Malgrat tot, recentment, el grup de Bernat Soria, a la Universitat d'Alacant, ha derivat amb èxit, a partir de cèl.lules mare pluripotencials de ratolí, una línia cel.lular secretora d'insulina capaç de normalitzar la glicèmia quan es trasplanta a ratolins diabètics (Soria B et al, 2000).

A partir de cèl.lules ductals de pàncreas adult també s'ha aconseguit diferenciar els 4 tipus de cèl.lules insulars (Soria B et al, 2001).

En qualsevol cas, les línies cel.lulars sotmeses a ingenieria genètica, una vegada preparades pel trasplantament, poden patir rebuig immune. El grup de Thorens, a Lausana (Suïssa), està treballant en millorar la resistència de les cèl.lules beta al rebuig. Han desenvolupat una línia cel.lular murina productora d'insulina que ha estat modificada per soportar les dures condicions que comporta el trasplantament, com la hipòxia, l'elevada densitat cel.lular i l'exposició a estímuls inflamatoris (Dupraz P et al, 2000).

Així doncs, l'estudi de les "stem cells" obre un camp d'investigació de possibilitats incalculables a l'actualitat, i en que l'aprofundiment del coneixement del seu comportament i dels factors que poden fer que es diferenciï cap a un tipus cel.lular, pot tenir una gran repercusió sanitària en el futur.

Actualment ja es coneix com es diferencien, a partir de "stem cells", les cèl.lules hematopoiètiques, les cèl.lules nervioses centrals i perifèriques, el múscul estriat, i això ha obert les portes a l'estudi de les seves aplicacions per combatre les malalties degeneratives, l'infart de miocardi, etc. (Reig JA et al, 2002).

### III. HIPÒTESI



1. Les vesícules seminals poden ser, potencialment, òrgans immunològicament privilegiats.
2. Les vesícules seminals són òrgans ben irrigats i inervats on, potencialment, es poden implantar i sobreviure els illots de Langerhans.
3. L'experiència en el trasplantament d'illots de pàncreas a les vesícules seminals és nul·la.

Per tant, hipotèticament, les vesícules seminals poden ser un òrgan adequat per acollir illots de Langerhans trasplantats i restaurar la normoglicèmia en un model animal de diabetis experimental.

#### **IV. OBJECTIUS**

**Objectiu principal**

Esbrinar la viabilitat i funcionalitat dels illots de Langerhans trasplantats a les vesícules seminals.

**Objectius secundaris**

1. Determinar la viabilitat tècnica del trasplantament d'illots de pàncreas a les vesícules seminals de rates.
2. Determinar el funcionament del trasplantament d'illots de pàncreas a les vesícules seminals de rates singèniques amb diabetis induïda per estreptozotocina.
3. Determinar el nombre d'illots necessaris per a la curació de la diabetis al nostre model animal.
4. Determinar la durada de la insulino independència.
5. Comprovar la reversibilitat de la curació de la diabetis en extirpar la vesícula seminal trasplantada.
6. Esbrinar la localització histològica dels illots injectats a la vesícula seminal.
7. Comparar la funcionalitat dels illots a la vesícula seminal respecte els trasplantats a la càpsula renal.

## **V. MATERIAL I MÈTODES**

## V.1. ANIMAL D'EXPERIMENTACIÓ

### V.1.1. Rata Lewis

La rata Lewis és una soca creada per Lewis a partir d'una colònia de rates Wistar, traspasada a Aptekam i Bodgen al 1954 a la generació F20 i després a Silvers al 1958 a la generació F31. Fou introduïda als Laboratoris Charles River, als Estats Units d'Amèrica al 1975 i després transferida a IFFA CREDO al 1995. Són una soca albina. Es tracta d'un model àmpliament utilitzat en estudis de trasplantament, donada la seva condició singènica, la seva fàcil manipulació i la seva elevada resistència a infeccions i complicacions de l'estabulament. A més, el nostre grup té experiència prèvia amb aquest model.

Per al nostre estudi hem utilitzat 158 rates Lewis (LEW/CrI l co), singèniques, adultes, mascles, de 150 a 470 grams de pes, d'entre 6 i 20 setmanes de vida, del centre Charles River a França.

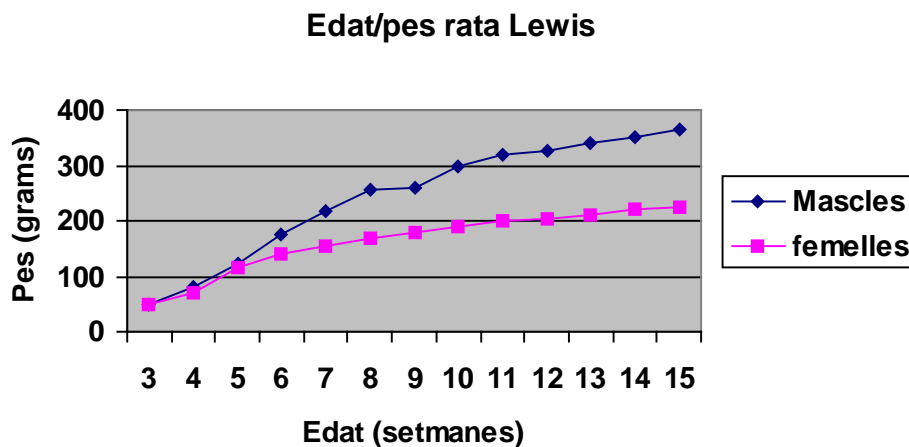


Figura 3. Gràfica que mostra el pes de les rates en funció de l'edat i el sexe.

### V.1.2. Nombre de rates

Donades les característiques de l'experiment, per la novetat que implicava, vam requerir un nombre de rates elevat:

Receptores: 49

Control: 11

Donants: 98

TOTAL: 158

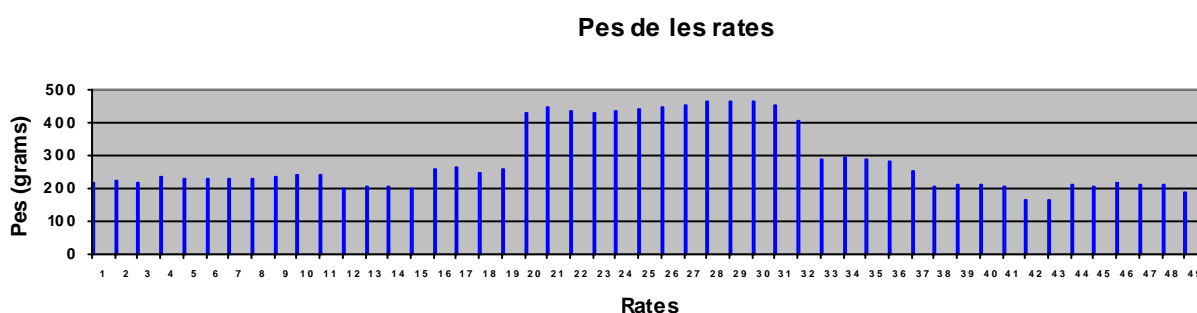


Fig. 4. Gràfica que mostra el pes inicial de les nostres rates. Destaca un grup de 13 rates per sobre dels 400 grams. La resta presenten pesos propers als 200 grams.

### V.1.3. Condicions d'estabulació

Es va mantenir els animals a l'estabulari del nostre centre a 23°C amb un cicle alternatiu de 12 hores de claror/foscor i amb lliure accés a una dieta estàndar i aigua. La cura dels animals s'ha regit per la normativa del "Principles of Laboratory care" (NIH, publicació nº 85-23, revisió del 1985) i la normativa del Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca, de la Generalitat de Catalunya amb protocol DARP nº 1870.

## V.2. INDUCCIÓ DE LA DIABETIS A LES RATES RECEPTORES

Es va induir la diabetis a les rates receptores i a les control mitjançant una injecció intraperitoneal d'Estreptozotocina (STZ, Sigma, St. Louis, MO) a una dosi de 65 mg/Kg de pes disolta en buffer citrat (pH 4.5).

Es confirmava la diabetis entre el segon i cinquè dies després de l'injecció de STZ. Es mesurava la glicèmia amb un aparell estàndar de BM-test per humans, extraient una gota de sang de la cua de la rata amb l'animal en dejuni de 2 hores. Les rates presentaven glicèmies > 20 mM (360 mg/dl) en una sola determinació o bé > 11 mM (>198 mg/dl) en dues determinacions consecutives, pèrdua de pes, poliúria i polidípsia (Vargas F, 2001). El seguiment es mantenia cada 48 hores fins al setè dia de la inducció que corresponia amb el del trasplantament.

### V.3. EXTRACCIÓ DELS PÀNCREAS DONANTS

Amb l'animal en dejuni de 6 hores s'anestesien les rates amb una injecció intraperitoneal d' 1 ml d'una mescla de: Ketolar (2.3 mg/ml, Parke-Davis, Barcelona, Espanya), Diazepam (1.8 mg/ml, Prodesfarma, Barcelona, Espanya) i d'Atropina (0.2 mg/ml, Braun, Barcelona, Espanya).

Es practica una laparotomia mitja per a l'exposició de la cavitat abdominal.

Es disseca el colecoc i es lliga amb sutura de seda de 5/0 per evitar el pas de la sol.lució de col.lagenasa cap al fetge.



Fig. 5. Lligadura del coledoc per evitar l'extravassació de col.lagenasa cap al fetge

Es punxiona amb un catèter de 24 Fr a nivell de la cara antimesentèrica de la segona porció duodenal. Es retira la guia metàl.lica i s'introdueix el catèter a través de la papil.la de Vater canalitzant el conducte pancreàtic de Wirsung.

Es fixa el catèter amb sutura per transfixió de seda de 4/0.





Fig. 6. Canalització del conducte de Wirsung per punció transduodenal a fi d'injectar la col.agenasa al pàncreas.

S'introdueixen lentament 20 ml d'una solució que conté Col.lagenasa P (Batch 83411922-08, Roche, Basel, Suïssa) i DNAsa (0.05 mg/ml, Roche) en tampó HBSS (Hanks Balanced Salt Solution, Gibco BRL, Paisley, Scotland) fins a la completa distensió del pàncreas. L'enzim col.lagenasa produirà la digestió del pàncreas.

La pròpia distensió facilita la dissecció del pàncreas. S'allibera el pàncreas del marc duodenal, mitjançant dissecció amb tisora, fins realitzar una pancreatectomia total.

Es manté el pàncreas en un medi a 4°C fins el moment de la seva digestió, durant un període inferior als 20 minuts, mentre es trasllada al laboratori.

#### **V.4. AÏLLAMENT DELS ILLOTS DE LANGERHANS**

S'incuba la glàndula pancreàtica a 37°C durant 15 minuts en un flascó d'Erlenmeyer.

Es treu del bany la glàndula digerida, es refreda ràpidament per aturar la reacció enzimàtica i es passa 3 vegades a través d'una pipeta de 15 ml per acabar de disgregar el material. Es passa la mostra resultant per un filtre de 500 µm per tal d'eliminar els ganglis i fragments no digerits.

Es sotmet la mostra a gradient discontinu de densitat (1124, 1110, 1102, 1085 i 1077 g/L) utilitzant una mescla de Pielograf (Juste, SAQF, Madrid, Espanya) i Lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, Noruega). Aquest fet es basa en la propietat de les cèl.lules de situar-se a la zona del gradient en la qual la seva densitat és la mateixa que la del

medi del gradient; com la densitat dels illots i la del teixit exocrí són diferents, aquests es poden separar en diferents capes del gradient de densitat. Les capes, de 7 ml cada una, se situen de més a menys densitat en un tub de 50 ml. A la capa superior s'afegeixen 10 ml del digerit pancreàtic. Es centrifuga la mostra obtinguda durant 20 minuts a 700 G (1200 rpm).

Els illots que migren a la interfase 1110/1068 es recuperen amb una pipeta i es renten 3 vegades amb medi salí Hanks que conté un 2% de sèrum fetal de vedella (FCS, "Fetal Calf Serum") i es resuspenen en 1 ml de sèrum fisiològic.

Una mostra de 50  $\mu$ l es mescla a 50  $\mu$ l de DTZ (Ditizona, Sigma) tenyint-se els illots de vermell i les cèl.lules exocrines de blanc, podent-se així fer un recompte dels illots obtinguts i del seu grau de puresa del material endocrí respecte l'exocrí.

Els illots es mantenen a una temperatura de 4°C fins al moment del seu trasplantament i mentre es traslladen del laboratori a l'animalari.

## **V.5. RECOMPTE, PURESA, VIABILITAT I AVALUACIÓ DELS ILLOTS OBTINGUTS**

Existeix un criteri estandaritzat d'avaluació per quantificar i qualificar el material obtingut.

### **V.5.1. Recompte d'illots**

Es realitza prenent una mostra representativa del total i tenyint-la amb DTZ per comptar el nombre i mida dels illots. La mida es realitza amb una gradeta calibrada situada a l'ocular del microscopi. Per convertir el nombre d'illots en nombre d'equivalents d'illots (EIN) s'aplica un factor de conversió a cada tamany (considerant com a tamany estàndar l'illot de 150  $\mu\text{m}$ ). (Ricordi et al, 1991)

### **V.5.2. Puresa**

La puresa d'una mostra es mesura tenyint una mostra dels illots amb DTZ i calculant visualment el percentatge d'illots respecte la resta de material pancreàtic. També es pot fer bioquímicament calculant el quocient insulina/amilassa.

### **V.5.3. Viabilitat**

Es pot referir a la integritat de les membranes citoplasmàtiques o a la integritat funcional.

La primera es mesura tenyint una mostra representativa del total amb colorants fluorescents com són el diacetat de fluoresceïna/bromur d'etidi o taronja d'acridina/iodur de propidi o taronja d'acridina/bromur d'etidi. Aquest últim és el que utilitzem nosaltres.

#### **V.5.4. Avaluació funcional**

La integritat funcional o avaluació funcional dels illots es pot mesurar *in vitro* o *in vivo*, trasplantant-los en animals diabètics (per pancreatectomia total o per inducció mitjançant STZ), i observant si s'assoleix la normoglicèmia.

Nosaltres utilitzem la tinció amb taronja d'acridina/bromur d'etidi d'una mostra de 150 µl i posterior avaluació del percentatge de cèl.lules vives en un microscopi de fluorescència (Zeiss Axiopla, Germany).

Posteriorment es fa un estudi *in vitro* per avaluar la secreció i el contingut d'insulina així com una determinació de mort espontània amb Cr<sup>51</sup>.

#### **V.6. ESTUDI IN VITRO**

A fi de confirmar que la nostra tècnica per a l'aïllament d'illots de Langerhans era correcte, i que per tant, aquests eren viables i responien a la glucosa, prèviament al trasplantament, vam dissenyar dos estudis al laboratori:

- Determinació del contingut i secreció d'insulina
- Estudi de toxicitat amb Cr<sup>51</sup>

##### **V.6.1. Determinació del contingut i secreció d'insulina**

Per determinar l'efecte de la col.lagenasa a la síntesi i alliberació d'insulina, vam incubar durant 90 minuts illots de Langerhans acabats d'aïllar, amb sol.lució de Krebs Ringer 1% BSA a diferents concentracions de glucosa (2.9, 5.5 i 16.7 mM). Els sobrenedants es van guardar a -20°C fins obtenir les determinacions per insulina. Per mesurar el contingut d'insulina, els illots eren lisats per ones de xoc ultrasòniques a 4°C en 0.5 ml de sol.lució alcohòlica àcida. La insulina era mesurada per RIA utilitzant

insulina de rata com a estàndar (sensibilitat 0.1 ng/ml, Linco Research, St Charles, MO, USA).

#### V.6.2. Estudi de toxicitat amb Cr51

Es va valorar la toxicitat dels enzims utilitzats durant l'aïllament dels illots (col.lagenasa) mitjançant mesura d'aïllament de Cr51.

Els estudis de toxicitat es basen en la incubació de les cèl.lules diana (els illots de Langerhans) amb  $^{51}\text{Cr}$ , que és captat per aquestes i s'uneix a les proteïnes. Després de la incubació s'elimina mitjançant rentat el  $^{51}\text{Cr}$  no captat i es cultiven les cèl.lules diana durant 4-16 hores. A continuació es retira el sobrenedant i s'efectua el recompte de radiactivitat per determinar el crom alliberat a partir de les cèl.lules diana que han presentat una mort espontània.

La toxicitat directe de les preparacions enzimàtiques es prova en els següents substrats :

- La dispersió total de les cèl.lules pancreàtiques obtingudes per digestió de la glàndula sencera amb col.lagenasa.
- Aïllament d'illots de pàncreas purificats per gradient de densitat (illots amb >90% puresa).
- Fragments de teixit exocrí sense la major part del illots.
- La línia de la cèl.lula insular humana (NES2Y).

Aquesta línia cel.lular va ser cultivada com a monocapa i es va exposar a col.lagenasa a 1 mg/ml durant 20 minuts a 38°C, per imitar les condicions a que els illots de les rates són sotmesos durant el seu aïllament.

El percentatge de lisi espontània es va calcular seguint la fórmula: cpm de lisi espontània/ cpm de lisi màxima.

### **V.7. ESTUDI *IN VIVO* DE VIABILITAT DELS ILLOTS: TRASPLANTAMENT A CÀPSULA RENAL**

Aprofitant l'experiència del nostre grup en el trasplantament d'illots de pàncreas, vam determinar la viabilitat metabòlica dels illots *in vivo* prèviament al trasplantament a les vesícules seminals. El trasplantament d'illots a la càpsula renal està estandaritzat pel nostre grup (Vargas F. et al, 2001) amb resultats superposables amb els trobats a la literatura. Així doncs, el grup trasplantat a la càpsula renal exercirà de control.

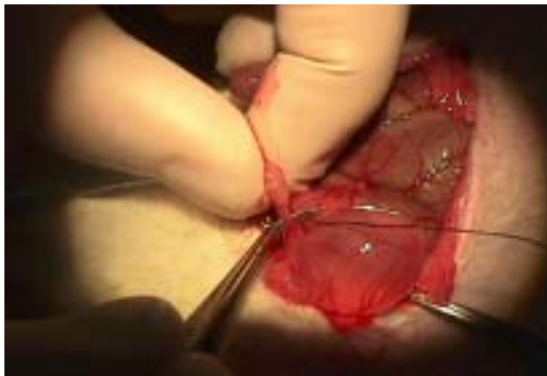
Els animals que es van utilitzar per a l'estudi són de les mateixes característiques que els del nostre actual estudi.

## V.8. TRASPLANTAMENT D'ILLOTS PANCREÀTICS A LES VESÍCULES SEMINALS

Es realitza als 7 dies de la inducció de la diabetis, prèvia comprovació de les hiperglicèmies (glicèmia > 11mM) de les 43 rates receptores.

Es practica una laparotomia mitja i s'exposen la bufeta de l'orina i les vesícules seminals.

Es disseca el conducte excretor de la vesícula seminal dreta i es sutura amb seda 5/0, preservant així el pedicle vascular de la vesícula (anomenat òrgan de la coagulació).



**Fig. 7.** Dissecció del conducte excretor de la vesícula seminal i de l'òrgan de la coagulació, preservant el pedicle vascular.

Es fixa la vesícula entre els dits i es canula pel pol superior amb una agulla de 19 G que es connecta a una xeringa de Hamilton d' 1 ml. S'introdueix una sol.lució de 50 µl de RPMI 1640 (Gibco BRL, Paisley, Escòcia) que conté de 800 a 1500 illots de Langerhans d'una puresa del 70% i una viabilitat mínima del 90%, obtinguts de dos pàncreas de rata donant. Es clampa amb lligadura de seda el punt d'injecció per evitar l'extravassació de la sol.lució. Es tanca la laparotomia amb sutura continua de seda 4/0.



**Fig. 8.** Introducció dels illots mitjançant punció pel pol superior de la vesícula seminal.

No es van incloure a l'estudi els casos en que la sol.lució es va extravassar parcialment a la cavitat peritoneal durant l'injecció a les vesícules seminals.

A les rates controls se'ls va practicar el mateix procediment però injectant 50 $\mu$ l de sèrum fisiològic a l'interior de la vesícula seminal dreta en lloc de la sol.lució amb illots pancreàtics. (Luna A et al, 2002).



#### **V.9. MONITORITZACIÓ DEL FUNCIONAMENT DEL TRASPLANTAMENT**

Es van mesurar, cada 2 dies i fins al dia 42 després del trasplantament, els nivells de glucosa en sang (Glucocard, Menarini, Diagnostics, Barcelona, Spain) obtenint la sang de la rata mitjançant punció de la cua. Es mesurava, també, el pes de la rata cada 2 dies. Totes les mesures es van obtenir entre les 12:00 i les 15:00 hores amb 2 hores de dejú.

Es va considerar la normoglicèmia com la concentració de glucosa en sang inferior a 11 mM. La recurrència de la diabetis es va considerar quan la glicèmia era  $> 11$  mM en 2 mesures consecutives o bé  $> 20$  mM en una sola mesura.

Es van anotar també altres símptomes relacionats amb la diabetis: polidípsia, poliúria i polifàgia. (Vargas F et al, 2000)

#### **V.10. REVERSIBILITAT DE LA DIABETIS**

Per tal de demostrar que la normoglicèmia de l'animal trasplantat era conseqüència de l'empelt i no de l'extravassació d'illots al peritoni, en un grup de 7 animals es va extreure la vesícula que contenia l'empelt i es va continuar la monitorització de la glicèmia. Aquestes extraccions es van fer en tres temps diferents després del trasplantament: 0 hores (1 rata), 48 hores (3 rates) i 96 hores (3 rates). Passat aquest temps, l'animal es mantenia en condicions normals d'estabulació durant un període de 42 dies amb determinacions de glicèmia i pes cada 48 hores.

### **V.11. EXTRACCIÓ DE LES VESÍCULES SEMINALS**

Les vesícules seminals s'extreien a les 5 rates de l'estudi de reversibilitat de diabetis i a totes les altres receptores de l'estudi per fer-ne l'estudi immunohistològic i esbrinar la localització histològica dels illots trasplantats, així com possibles reaccions inflamatòries.

L'animal trasplantat, un cop anestesiats, se sotmetia a laparotomia. Tant la vesícula seminal trasplantada com la de l'animal control (normal) s'extreia i es fixaven en formol al 4% i se'n feia l'estudi immunohistològic.

Els animals que ja estaven al final del període de seguiment, es sacrificaven, un cop anestesiats, mitjançant exanguinació per secció de l'artèria aorta, segons la normativa vigent. Els animals de l'estudi de reversibilitat es mantenien durant un període de 42 dies, i per tant, un cop extreta la vesícula es tancava la laparotomia i es mantenia l'animal en condicions normals d'estabulació.

El seguiment del pes i les glicèmies es mostra a l'apartat VI.

Al grup en que s'obtingué bona resposta al trasplantament es va fer un estudi histològic del pàncreas per demostrar que no s'havien regenerat els illots de Langerhans.

### **V.12. ESTUDI IMMUNOHISTOLÒGIC**

Es va fer l'estudi immunohistològic de les vesícules trasplantades i les control. L'estudi es feia amb l'objectiu de localitzar els illots a les diferents capes de la vesícula i relacionar-ho amb el temps que portava trasplantat.

Es feien seccions de 4 µm que es desparafinaven prèviament al procediment de tinció. En primer lloc es va fer una determinació de l'estat histològic de l'òrgan mitjançant tinció convencional d'hematoxilina/eosina (H/E). Un cop verificat el bon estat de la vesícula i localitzats els illots trasplantats es va dur a terme un procediment

immunohistoquímic amb anticossos contra hormones insulars pancreàtiques. Els anticossos utilitzats han estat: anticòs monoclonal contra el glucagó (Glu 001, Dr P. Jorgensen, NOVO, Copenague, Dinamarca) i antisèrum contra la insulina (Guinea Pig anti-porcine insulin, ICN, Lislei, Indiana, USA) per identificar les cèl.lules alfa i beta dins dels illots, respectivament.

Breument: Les seccions s'incubaven seqüencialment amb l'anticòs anti-hormona durant tota la nit (12 hores). Seguidament i després dels corresponents rentats en PBS (Phosphate Buffered Saline) la secció s'incubava amb un anticòs secundari Cavall-anti-Ratolí (Horse-anti-Mouse) per la tinció de glucagó o Cabra-anti-Conill d'Índies (Goat-anti-Guinea Pig) per la tinció d'insulina; aquests secundaris estaven marcats amb Biotina i es feia una incubació de 30 minuts. Seguidament s'aplicava una capa d'Avidina marcada amb peroxidasa (Vector, Burlingame, CA, USA) i el cromogen 3,3-diaminobenzidina tetraclorid (Aldrich, Millwakee, WI, USA). Les tincions s'observaven sota un microscopi òptic amb analitzador d'imatges (Confocal Openlab).

### **V.13. ESTUDI ESTADÍSTIC**

Per l'estudi estadístic s'ha utilitzat el programa SPSS 11.5.

Per a l'anàlisi de mostres de distribució normal hem aplicat el test ANOVA per a mostres independents, aplicant la modificació de Bonferroni. Es consideren diferències estadísticament significatives quan la  $p < 0.05$ .

Per a mostres independents de distribució desconeguda s'ha aplicat el test de Wilcoxon.

Per a mostres independents amb variables qualitatives no paramètriques s'ha aplicat el test de Fisher.

## VI. RESULTATS

## VI.1. ESTUDI *IN VITRO*

### VI.1.1. Secreció d'insulina

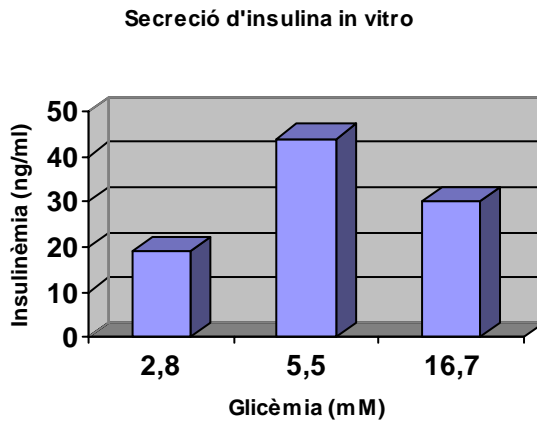


Fig. 9. Gràfica que mostra la secreció d'insulina *in vitro* d'illots acabats d'aïllar després de la digestió amb col.lagenasa i incubats a 2.8, 5.5 i 16.7 mM de glucosa durant 90 minuts. S'observa una major insulinèmia a concentracions de glucosa de 5.5 mM.

### VI.1.2. Contingut d'insulina

El contingut d'insulina dels illots cultivats en mitjà de normoglicèmia és significativament superior ( $p < 0.05$ ) al dels illots cultivats en condició d'hipo i hiperglicèmia.

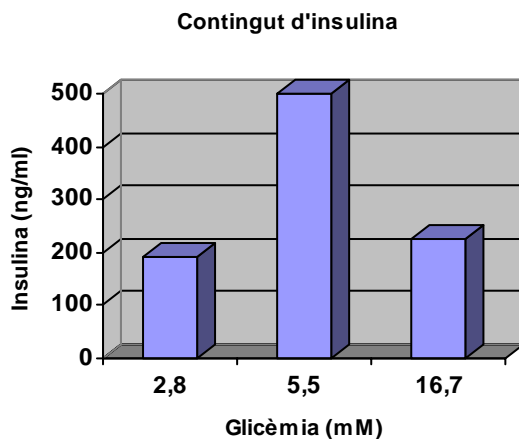
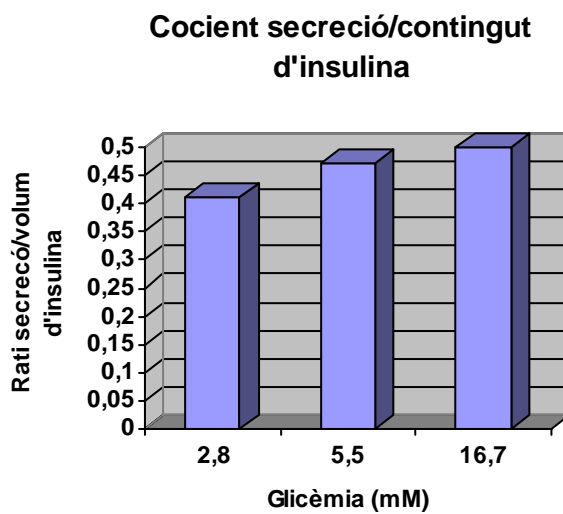


Fig. 10. Gràfica que mostra que el contingut d'insulina *in vitro* d'illots acabats d'aïllar després de la digestió amb col.lagenasa i incubats a 2.8, 5.5 i 16.7 mM de glucosa durant 90 minuts. S'observa un major contingut d'insulina als illots cultivats a concentracions de glucosa de 5.5 mM ( $p < 0.05$ ).

### VI.1.3. Cocient secreció/contingut d'insulina

Considerant les inevitables diferències en el tamany dels illots, expressem els resultats per a cada condició com el cocient entre la secreció d'insulina i el volum d'insulina.

Els illots, aïllats amb col.lagenasa, van mostrar un augment significatiu ( $p < 0.05$ ) en el cocient quan es va exposar a 16.7 mM de glucosa, que indica secreció activa.



**Fig. 11.** Gràfica que mostra el cocient entre la secreció i el contingut d'insulina d'illots acabats d'aïllar després de la digestió amb col.lagenasa i incubats a 2.8, 5.5 i 16.7 mM de glucosa durant 90 minuts. Mostra diferències significatives ( $p < 0.05$ ) en la secreció d'insulina quan els illots s'exposen a glicèmies elevades, tenint en compte el volum de l'illot.

#### VI.1.4. Toxicitat

Els substrats preparats per dispersió enzimàtica del pàncreas van mostrar un nivell d'alliberació espontània de  $^{51}\text{Cr}$  que reflexa la fragilitat intrínseca de les cèl.lules pancreàtiques parenquimatoses. Mostrem l'anàlisi de la toxicitat de la col.lagenasa a la glàndula pancreàtica sencera digerida, al teixit exocrí i als illots de Langerhans.

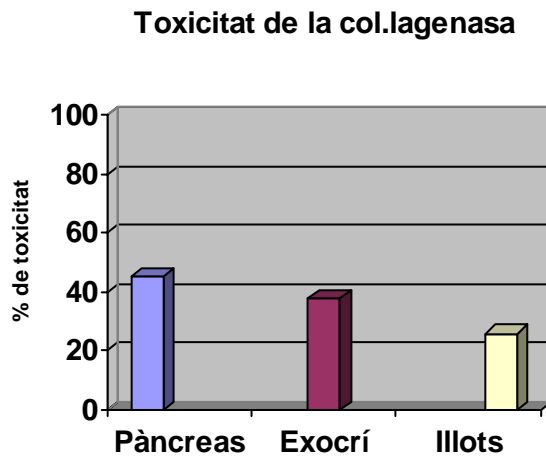


Fig. 12. Gràfica que mostra el percentatge de mort espontània després de la digestió amb col.lagenasa. La mort cel.lular als illots aïllats és significativament menor respecte la glàndula sencera i el teixit exocrí.

## **VI.2 EXTRACCIÓ VESÍCULA IMPLANTADA: RETORN A LA DIABETIS**

Presentem el seguiment de glicèmies del grup de 7 rates que s'han fet diabètiques mitjançant injecció intraperitoneal d'estreptozotocina i a les que s'ha extret, immediatament després del trasplantament (0 hores), la vesícula seminal (rata control), a les 48 hores (rates 1, 2 i 3) i a les 96 hores (rates 4, 5 i 6). Es fa el seguiment durant 42 dies.

S'observa clarament una tendència a la normalització de les glicèmies després del trasplantament d'illots i un immediat retorn a l'estat de diabetis un cop extretes les vesícules (figura 13). Aquest fet, demostra que el descens de les glicèmies és conseqüència de l'ingert dels illots a les vesícules seminals i exclou la possibilitat que aquest fet pugui ser degut a l'extravassació d'illots al peritoni.

Aquest experiment inicial justificà un estudi més ampli per intentar demostrar si les vesícules seminals poden ser un bon òrgan hoste.



VI.2.1 Taula de seguiment de glicèmies

	Dia de seguiment												
	STZ	TX				R-1	R-2						
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12-42
<b>Glicèmia rata 1</b>	4,5	16,1	16,8	19	25,7	29,4	20,2	28,6	24,6	25,4	29,4	32,5	>33
<b>Glicèmia rata 2</b>	4,9	14,0	16,6	23	24,3	28,5	18,4	24,9	22,5	22,8	30,2	31,5	>33
<b>Glicèmia rata 3</b>	4,7	15	16,7	21	25	28,9	19,1	27,1	23,6	28,5	29,8	32	>33
<b>Glicèmia rata 4</b>	4,2	8,4	19,8	22,6	31	>33	22,4	19,9	18,4	17	>33	>33	>33
<b>Glicèmia rata 5</b>	4,0	8,1	20,2	23,4	29	33	22,0	20,3	18,2	18	>33	>33	>33
<b>Glicèmia rata 6</b>	4,1	8,3	20	23	30	33,1	22,2	20,1	18,3	17,5	>33	>33	>33
<b>Glc rata control (7)</b>	4,6	6,2	26,6	31	32	>33	>33	>33	>33	>33	>33	>33	>33

**STZ** Injecció d'estreptozotocina

**TX** Trasplantament d'illots a les vesícules seminals

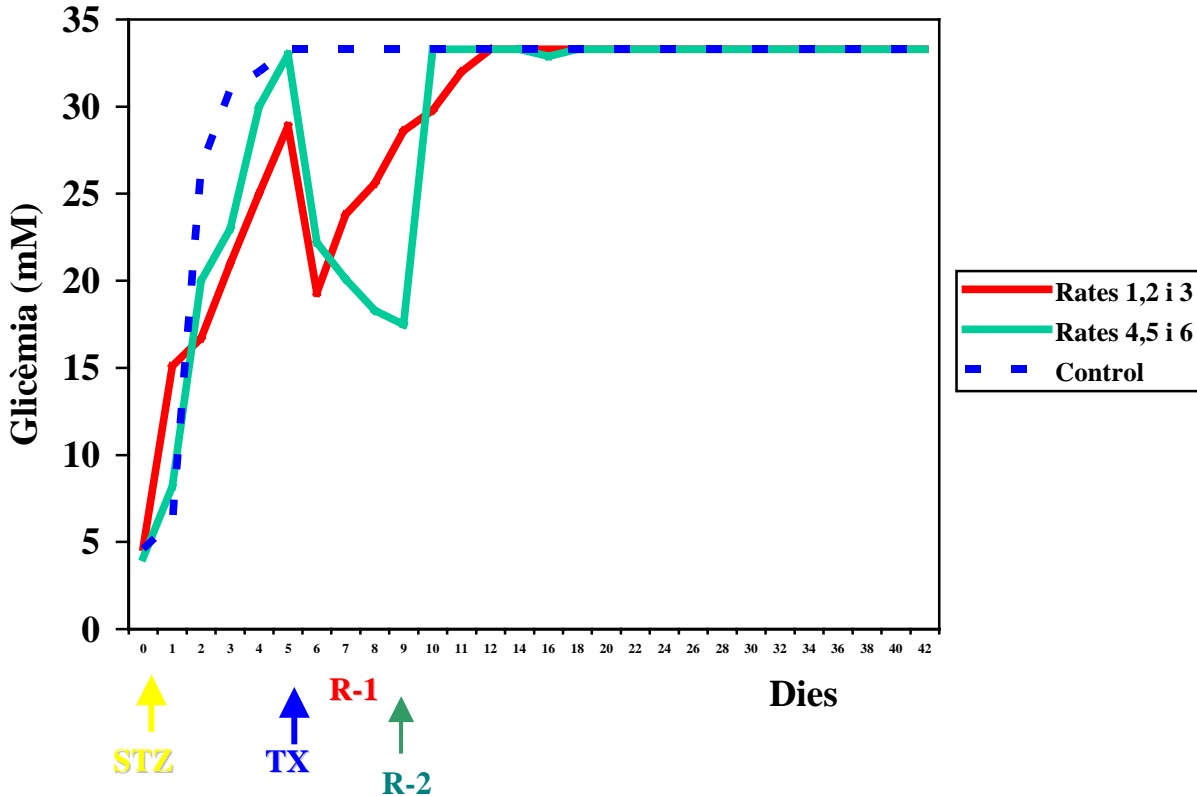
**R-1** Exèresi de la vesícula trasplantada al primer grup (48 hores)

**R-2** Exèresi de la vesícula trasplantada al segon grup (96 hores)

**Taula 1.** Seguiment de glicèmies (en mM), des de l'injecció d'STZ, del grup de rates al que s'ha extret la vesícula trasplantada a les 48 hores (R-1 = rates 1-3) i a les 96 hores (R-2 = rates 4-6) per demostrar el retorn a l'estat de diabetis. A partir del dia 12 totes les mesures de glicèmia són superiors a 33 mM. Considerem diabetis les glicèmies > 20 mM en una mesura o > 11 mM en 2 mesures consecutives.  
> 33: glicèmia màxima que capta l'aparell

### VI.2.2. Gràfica de seguiment de glicèmies

Presentem en aquest gràfic, per facilitar-ne l'interpretació, agrupades les 3 rates a les que se'ls va extreure la vesícula a les 48 hores i les que se'ls va extreure a les 96 hores.



- STZ** Administració Estreptozotocina
- TX** Trasplantament illots pancreàtics
- R-1** Extracció vesícula a les 48 hores del trasplantament
- R-2** Extracció vesícula a les 96 hores del trasplantament

Fig. 13. Gràfica que demostra la tendència a la normalització de les glicèmies un cop trasplantades, i el retorn a la diabetis un cop extreta la vesícula seminal trasplantada, tant a R-1 com a R-2. La rata control, un cop injectada l'STZ es manté diabètica.

Dia 0: Administració Estreptozotocina

Dia 5: Trasplantament illots pancreàtics a les 7 rates i extracció vesícula seminal de la rata control

Dia 7: Extracció vesícula seminal de les rates 1, 2 i 3

Dia 9: Extracció vesícula seminal de les rates 4, 5 i 6

### **VI.3. EVOLUCIÓ DEL PES EN FUNCIÓ DE L'ÈXIT DEL TRASPLANTAMENT**

En un grup de 42 rates, de les quals 10 són rates control, es fa el seguiment, cada 48 hores, del pes des del dia -8 (dia en que s'administra la dosi intraperitoneal de STZ) fins al dia 42 (fi del seguiment), en que el dia 0 és el del trasplantament d'illots.

Les rates que han respòs correctament al trasplantament d'illots han presentat un augment significatiu ( $p < 0.05$ ) del pes respecte el grup control i la resta de grups.

El grup de rates que han presentat una bona resposta inicial han presentat un augment inicial no significatiu del pes, però no s'ha confirmat en el seguiment, mantenint-se amb un pes estable.

Les rates que no han tolerat la STZ han presentat un descens del pes.

Les rates control i les que no han respòs correctament al trasplantament s'han mantingut amb un pes estable.

VI.3.1. Taules de seguiment del pes

## VI.3.1.1. Grup control

## Dia de seguiment

	STZ										IQ										
	-8	-6	-4	-2	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	26	30	34	38	42
<b>Pes rata 15</b>	200	194	193	195	196	207	216	216	219	225	232	235	241	250	251	252	251	251	253	252	255
<b>Pes rata 16</b>	257	266	271	265	257	261	265	266	270	272	273	274	275	274	274	276	276	278	280	282	284
<b>Pes rata 22</b>	438	396	390	386	382	379	375	369	365	351	331	336	345	339	335	340	327	319	308	306	305
<b>Pes rata 28</b>	465	442	435	432	430	402	392	360	331	325	324	322	320	321	319	318	317	314	317	314	310
<b>Pes rata 36</b>	285	271	276	279	281	284	265	262	264	269	265	267	265	261	263	262	259	261	264	266	262
<b>Pes rata 41</b>	206	207	207	214	229	236	243	252	261	269	273	273	280	270	263	262	259	261	264	266	262
<b>Pes rata 42</b>	166	156	154	160	173	171	172	171	167	183	196	199	205	209	210	211	212	215	216	218	221
<b>Pes rata 43</b>	166	163	161	170	180	175	179	182	184	195	204	204	218	227	228	229	231	231	232	235	238
<b>Pes rata 47</b>	206	207	207	214	229	236	243	252	261	269	273	273	280	270	263	263	199	205	203	202	205
<b>Pes rata 48</b>	166	156	154	160	173	171	172	171	167	183	196	199	205	209	210	199	189	191	198	195	199
<b>Mitjana</b>	255	245	244	247	253	252	252	250	248	254	256	258	263	263	261	255	252	252	253	253	254
<b>Desv. est.</b>	110	100	98	94	89	82	77	70	66	57	49	48	47	43	41	47	46	43	41	41	38

STZ Injecció d'estrepto-zotocina

IQ Injecció de sèrum fisiològic a la vesícula seminal dreta

Taula 2. Seguiment del pes (en grams) de les rates control. A partir del dia 22 hem indicat la dada cada 4 dies. El dia 0 es practica una laparotomia mitja i injecció de sèrum fisiològic a la vesícula seminal dreta. De mitjana, el pes es manté estable.

## VI.3.1.2. Grup empelt funcionant

## Dia de seguiment

	STZ										TX										
	-8	-6	-4	-2	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	26	30	34	38	42
<b>Pes rata 8</b>	229	227	232	242	244	232	234	235	242	251	261	269	275	286	288	292	305	314	324	330	336
<b>Pes rata 9</b>	236	225	226	233	240	224	230	237	237	247	260	264	267	277	282	283	296	305	313	316	326
<b>Pes rata 10</b>	240	239	234	246	245	235	237	240	248	254	261	271	276	287	293	293	307	316	323	333	338
<b>Pes rata 11</b>	242	241	238	247	248	249	248	255	254	263	270	274	280	288	293	299	308	317	326	333	334
<b>Mitjana</b>	236	233	232	242	244	235	237	241	245	253	263	269	274	284	289	291	304	313	321	328	333
<b>Desv. Est.</b>	5.7	8.1	5	6.3	3.3	10.4	7.7	9	7.3	6.8	4.6	4.2	5.4	5	5.2	6.6	5.4	5.4	5.8	8.1	5.2

STZ Injecció d'estrepto-zotocina

TX Trasplantament d'illots a les vesícules seminals

Taula 3. Seguiment del pes (en grams) de les rates en que l'empelt ha estat funcionant. A partir del dia 22 hem indicat la dada cada 4 dies. S'observa una tendència a l'augment de pes.

## VI.3.1.3. Grup empelt parcialment funcionant

## Dia de seguiment

	STZ				TX																
	-8	-6	-4	-2	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	26	30	34	38	42
<b>Pes rata 33</b>	287	273	268	267	269	261	262	272	274	278	277	276	277	275	273	273	271	271	268	269	266
<b>Pes rata 34</b>	294	283	269	270	272	262	259	275	280	285	282	280	278	279	280	279	277	275	274	270	268
<b>Pes rata 35</b>	289	298	317	320	331	308	291	283	289	289	288	286	284	285	284	283	282	281	278	275	273
<b>Pes rata 37</b>	255	252	274	279	285	283	293	298	305	314	312	311	313	312	310	311	314	314	319	320	320
<b>Pes rata 44</b>	213	208	196	196	204	201	211	196	201	196	198	200	195	209	198	194	185	181	188	184	180
<b>Pes rata 45</b>	207	196	196	195	203	199	204	193	201	200	199	206	202	220	211	214	196	203	207	200	200
<b>Pes rata 46</b>	219	209	202	201	205	203	205	196	198	199	195	200	194	205	197	196	183	184	180	178	177
<b>Mitjana</b>	252	245	246	246	252	245	246	244	249	251	250	251	249	255	250	250	244	244	244	242	240
<b>Desv. Est.</b>	38	41	47	49	49	44	39	47	47	51	50	47	50	42	46	47	54	53	52	54	54

STZ Injecció d'estreptozotocina

TX Trasplantament d'illots a les vesícules seminals

Taula 4. Seguiment del pes (en grams) de les rates en que l'empelt ha estat parcialment funcionant. A partir del dia 22 hem indicat la dada cada 4 dies. S'observa una tendència a l'augment de pes inicialment i posteriorment un descens progressiu o bé una estabilitat.

## VI.3.1.4. Grup empelt no funcionant

## Dia de seguiment

	STZ					TX															
	-8	-6	-4	-2	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	26	30	34	38	42
Pes rata 12	201	203	205	198	180	175	193	188	187	187	186	186	185	184	182	181	181	176	174	172	168
Pes rata 13	206	207	208	195	185	178	185	189	188	187	185	182	183	183	181	180	178	175	174	169	167
Pes rata 14	206	194	194	193	189	186	192	195	194	192	193	192	190	191	188	186	181	178	175	172	170
Pes rata 17	267	251	254	255	257	247	255	258	253	252	253	251	250	249	248	246	244	240	238	235	230
Pes rata 18	250	234	238	236	235	228	230	226	202	198	196	197	196	195	194	193	190	187	184	183	178
Pes rata 19	256	240	240	238	237	216	227	225	200	199	198	198	196	195	194	194	190	188	185	180	175
Pes rata 26	447	402	402	390	386	359	356	359	356	349	352	351	350	349	350	348	345	342	338	332	328
Pes rata 27	452	412	410	407	401	380	375	364	364	364	340	363	366	361	362	360	359	356	352	347	344
Pes rata 29	467	418	403	401	400	392	390	388	386	383	382	380	378	378	377	375	370	364	360	355	347
Pes rata 38	208	211	210	212	223	223	221	220	218	217	215	214	211	210	210	209	207	204	201	196	191
Pes rata 39	212	209	212	219	228	230	230	231	225	223	225	224	222	220	219	217	214	210	208	203	198
Pes rata 40	209	210	209	213	227	228	226	223	221	219	218	217	215	214	215	213	208	208	203	201	194
Pes rata 49	189	189	200	191	185	173	182	203	201	200	198	195	194	193	190	188	190	185	178	175	170
Mitjana	281	265	265	263	262	253	256	255	249	247	245	246	245	244	243	241	238	235	232	228	224
Desv. Est.	105	87	84	83	82	77	73	70	72	71	69	72	72	72	73	72	72	72	71	70	70

STZ Injecció d'estreptozotocina

TX Trasplantament d'illots a les vesícules seminals

Taula 5. Seguiment del pes (en grams) de les rates en que l'empelt no ha estat funcionant. A partir del dia 22 hem indicat la dada cada 4 dies. S'observa una tendència al descens del pes.

## VI.3.1.5. Grup STZ tòxica

## Dia de seguiment

	STZ				
	-8	-6	-4	-2	0
Pes rata 20	431	380			
Pes rata 21	446	394			
Pes rata 23	428	380			
Pes rata 24	437	385			
Pes rata 25	441	391			
Pes rata 30	464	434	413	383	
Pes rata 31	455	427	399	371	
Pes rata 32	403	381	364	359	
Mitjana	438	396	392	371	
Desv. Est.	18.5	21.6	25.2	12	

STZ Injecció d'estreptozotocina

Taula 6. Seguiment del pes (en grams) de les rates que van morir després de l'injecció d'estreptozotocina. Cap d'elles es va arribar a trasplantar.

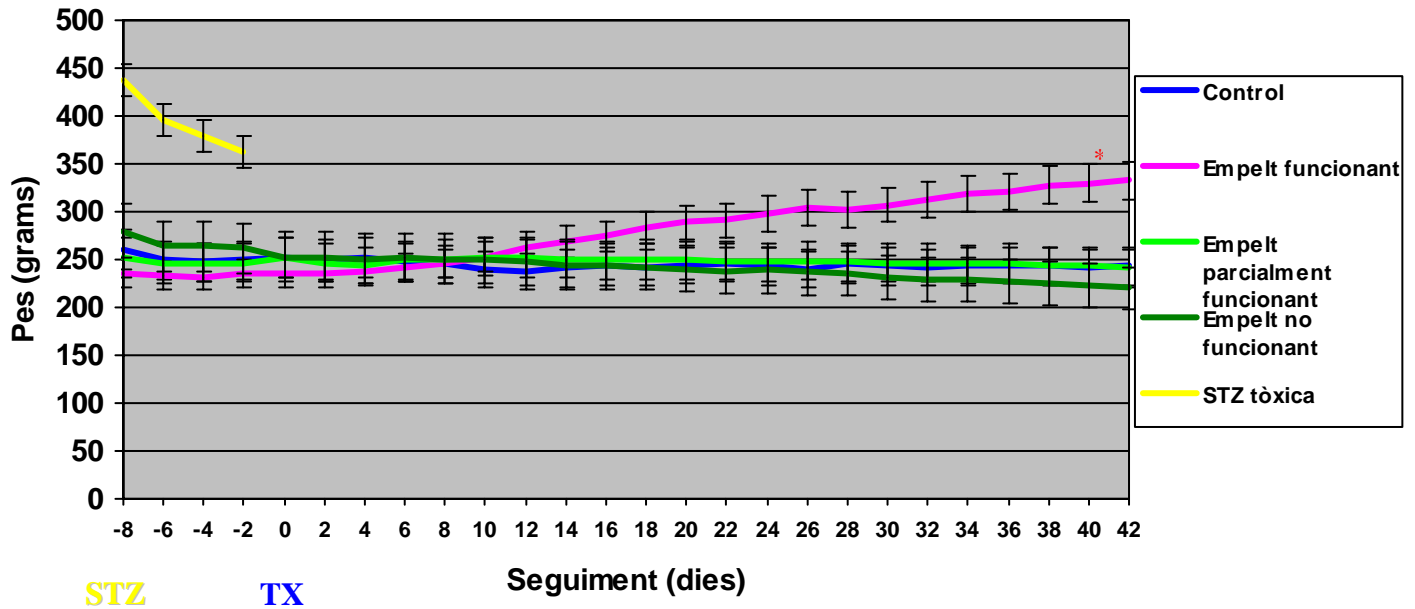
VI.3.2. Gràfica de seguiment del pes

Fig. 14. Gràfica del seguiment del pes (en grams). Hem agrupat les rates en 5 grups segons la resposta que van presentar al trasplantament. Per facilitar-ne l'interpretació hem fet la mitjana dels pesos de cada grup amb la corresponent desviació estàndard. El grup en que l'empelt ha estat funcionant presenta un augment significatiu (\*  $p < 0.05$ ) del pes respecte el grup control i respecte els altres grups, mentre els grups empelt parcialment funcionant i no funcionant, presenten una tendència a l'estabilitat o descens no significatiu del pes, respecte el grup control i la resta de grups. Les rates que van morir després de l'injecció de l'estreptozocina van mostrar un descens del pes abans de morir.

#### **VI.4. EVOLUCIÓ DE LA GLICÈMIA EN FUNCIÓ DE L'ÈXIT DEL TRASPLANTAMENT**

En un grup de 42 rates, de les quals 10 són rates control, es fa el seguiment, cada 48 hores, de les glicèmies des del dia -8 (dia en que s'administra la dosi intraperitoneal de STZ) fins al dia 42 (fi del seguiment), en que el dia 0 és el del trasplantament d'illots.

Un total de 4 rates han presentat un descens estadísticament significatiu ( $p < 0.05$ ) de les glicèmies després del trasplantament (rates 8,9,10 i 11).

Un total de 7 rates han presentat un descens inicial de les glicèmies, però no s'ha confirmat en el seguiment (rates 33,34,35,36,44,45 i 46).

Un total de 13 rates han presentat una nul·la resposta després del trasplantament (rates 12,13,14,17,18,19,26,27,29,38,39,40 i 49).

Un total de 8 rates han mort dies després de l'injecció d'STZ, sense arribar-se a realitzar el trasplantament (rates 20,21,23,24,25,30,31,32).



VI.4.1. Taules de seguiment de glicèmies

## VI.4.1.1. Grup control

	Dia de seguiment															
	STZ								IQ							
	-8	-6	-4	-2	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22-42
Glicèmia rata 15	6,1	18,5	19,6	22,3	27,3	31,9	>33	>33	>33	>33	>33	>33	>33	29,7	30	>33
Glicèmia rata 16	5,5	24,5	25	24,1	24,5	32	28,5	29,4	29,7	>33	>33	>33	33	>33	>33	>33
Glicèmia rata 22	5,7	23,1	25,2	29	>33	30,1	33,3	29,6	29,2	30,7	>33	>33	29,5	>33	>33	>33
Glicèmia rata 28	5,2	19,3	14,8	23	25	27	28,5	32	31	32	>33	>33	>33	>33	>33	>33
Glicèmia rata 36	5,9	28,2	>33	32,3	32,4	32,7	31	30,6	28	27,1	>33	>33	>33	>33	>33	>33
Glicèmia rata 41	5,2	18,5	21,7	17,8	32,8	22,7	30,7	>33	>33	>33	>33	>33	>33	>33	>33	>33
Glicèmia rata 42	5,3	15,1	16,7	23	28,9	19,3	26,8	23,6	28,6	29,8	>33	>33	>33	>33	>33	>33
Glicèmia rata 43	5,4	8,2	20	28	33	22,2	20,1	28,3	27,5	>33	>33	>33	32,9	>33	>33	>33
Glicèmia rata 47	5,8	24	29,7	26,4	18,8	27,4	>33	23,1	25	22,8	32,1	29,2	26,9	>33	>33	>33
Glicèmia rata 48	5,4	22	21,4	25,5	23,6	20,8	>33	23,9	29,1	31	32	>33	25,8	27,7	31	>33
Mitjana	5,5	20,1	22,7	25,14	27,9	26,6	29,79	28,65	29,41	30,5	32,8	32,6	31,3	32,1	32,5	33
Desv. Est.	0,3	5,6	5,6	4	4,9	5	4,1	3,8	2,4	3,3	0,4	1,2	2,8	1,87	1	0

STZ Injecció d'estreptozotocina

IQ Laparotomia + injecció de sèrum fisiològic

Taula 7. Seguiment de glicèmies (en mM) del grup de rates control. El dia 0 es practica laparotomia mitja i injecció de sèrum fisiològic a la vesícula seminal dreta. A partir del dia 22 totes les mesures de glicèmia són superiors a 33 mM. Això indica que totes les rates van esdevenir diabètiques després de l'administració d'STZ i no es va modificar amb l'IQ.

Considerem diabetis les glicèmies > 20 mM en una mesura o > 11 mM en 2 mesures consecutives.

> 33: glicèmia màxima que capta l'aparell

## VI.4.1.2. Grup empelt funcionant

	Dia de seguiment																						
	STZ											TX											
	-8	-6	-4	-2	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	34	38	42
Rata 8	5,8	13,3	11,8	13,5	13,5	4,7	6,05	6,5	5,7	6,8	6,1	6,9	6	8,6	7	6,6	5,72	4,8	5,8	6,7	7,1	6,1	6,1
Rata 9	5	19,2	16	22,9	22,9	4,7	6,2	7,1	5,6	6,2	7,5	6,2	6,9	6,8	7,6	6,7	7,16	5,8	7,1	6,7	6,7	6,2	6,1
Rata 10	5,8	20,7	21,7	23,5	23,5	4,1	11,8	10,3	6	11,1	8,2	8,1	6,9	9,05	7,8	7,3	8,7	6	8,8	6,6	9,3	7,5	7,6
Rata 11	6,3	17,1	15,9	25,8	25,8	5,7	16,8	11,1	8,2	15,9	10,4	11,3	9,05	17,7	13,5	7,3	6,8	5,5	7,1	8	9	8,1	8,3
Mitjana	5,7	17,5	16,3	21,4	21,4	4,8	10,2	8,7	6,3	10	8	8,1	7,2	10,5	8,9	6,9	7,1	5,5	7,2	7	8	6,9	7
D. Est.	0,5	3,2	4	5,4	5,4	0,6	5,1	2,2	1,2	4,5	1,8	2,2	1,3	4,8	3	0,4	1,2	0,5	1,2	0,6	1,3	0,9	1,1

STZ Injecció d'estreptozotocina

TX Trasplantament d'illots a les vesícules seminals

Taula 8. Seguiment de glicèmies (en mM) del grup de rates en que l'empelt ha funcionat correctament. Després del trasplantament s'observa una normalització mantinguda de les glicèmies.

Considerem diabetis les glicèmies > 20 mM en una mesura o > 11 mM en 2 mesures consecutives.

## VI.4.1.3. Grup empelt parcialment funcionant

	Dia de seguiment															
	STZ				TX											
	-8	-6	-4	-2	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22-42
<b>Glc rata 33</b>	5,4	24,1	26,6	26,6	26,4	3,5	3,5	21,6	26,6	27,5	28,5	29	30	32	>33	>33
<b>Glc rata 34</b>	5,5	31,5	24,1	29,1	28,9	14,2	24,1	32,2	31,6	>33	>33	>33	>33	>33	>33	>33
<b>Glc rata 35</b>	6,1	11,8	16,7	26,2	26,3	21,1	10,5	15,2	33	13	32,8	>33	>33	>33	>33	>33
<b>Glc rata 37</b>	5,4	17,7	22,7	25,7	25,6	5,5	5,8	11	5,8	9,8	4,7	>33	>33	>33	>33	>33
<b>Glc rata 44</b>	4,7	18,1	20,3	18,6	21,7	16,7	33,3	7,1	23,8	21,6	23,2	>33	>33	>33	32	>33
<b>Glc rata 45</b>	4,6	20,7	24,6	21,1	16,8	5	>33	>33	20	15,8	16,4	>33	20,7	>33	33	>33
<b>Glc rata 46</b>	5,1	20,7	22,2	22	19,3	15,5	32,2	>33	20,5	25,1	21,5	32,1	24,7	>33	>33	>33
<b>Mitjana</b>	5,2	20,6	22,4	24,1	23,6	11,6	21,9	21,8	23	20,8	21,9	32,3	29,6	32,8	32,8	33
<b>Desv. Est.</b>	0,5	6	3,2	3,7	4,4	6,9	13,9	11,1	9,1	8,3	10,6	1,5	5	0,4	0,4	0

**STZ** Injecció d'estreptozotocina

**TX** Trasplantament d'illots a les vesícules seminals

**Taula 9.** Seguiment de glicèmies (en mM) del grup de rates en que l'empelt ha funcionat parcialment. Els primers dies post-trasplantament hi ha una resposta en que s'observa un descens de les glicèmies que no es manté en el seguiment. Progressivament totes les rates esdevenen diabètiques.

A partir del dia 22 totes les mesures de glicèmia són superiors a 33 mM.

Considerem diabetis les glicèmies > 20 mM en una mesura o > 11 mM en 2 mesures consecutives.

> 33: glicèmia màxima que capta l'aparell

## VI.4.1.4. Grup empelt no funcionant

	Dia de seguiment															
	STZ								TX							
	-8	-6	-4	-2	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22-42
Glicèmia rata 12	6,2	15,5	15,1	24,5	24,5	23,5	22,8	33,1	>33	>33	>33	>33	>33	>33	>33	>33
Glicèmia rata 13	5,4	18,6	18,4	24,9	33,3	26	29,8	33,3	>33	>33	>33	>33	>33	>33	>33	>33
Glicèmia rata 14	5,5	27,6	30,2	24,2	>33	24,6	21	21,3	>33	>33	>33	>33	>33	>33	>33	>33
Glicèmia rata 17	5,7	27,5	32	>33	>33	31,5	>33	26,7	>33	>33	>33	>33	>33	>33	>33	>33
Glicèmia rata 18	5,5	26,3	33,1	>33	>33	33,3	32	28,6	>33	>33	>33	>33	>33	>33	>33	>33
Glicèmia rata 19	5,2	27,7	>33	>33	>33	26,5	>33	>33	>33	>33	>33	>33	>33	>33	>33	>33
Glicèmia rata 26	5,2	20,8	27,7	28	29,7	26,6	26,4	30,7	27,3	26,1	>33	>33	>33	>33	>33	>33
Glicèmia rata 27	5,1	23,7	25,9	27	24,8	18	19,2	25	28	21,1	22,6	28	28	31,7	30	>33
Glicèmia rata 29	5,4	19,7	26	28,8	31	>33	>33	>33	>33	>33	>33	>33	>33	>33	>33	>33
Glicèmia rata 38	4,9	23,5	23,2	27,5	28,1	25,4	25	29	24	28	31	>33	>33	>33	>33	>33
Glicèmia rata 39	5,1	22,5	26,2	27,5	32,6	27,1	22	25	19	22	28	31	32	>33	>33	>33
Glicèmia rata 40	5,3	23,5	19,5	27,4	32,8	24,7	29	24	18	22	25	29	31	>33	>33	>33
Glicèmia rata 49	20	22	21,4	25,5	28,2	30,5	>33	>33	>33	>33	>33	>33	>33	>33	>33	>33
Mitjana	6,5	23	25,5	28	30,5	27	27,6	28,9	29,2	29,5	31	32,1	32,4	32,9	32,7	33
Desv. Est.	4,1	3,7	5,8	3,1	3,2	4,2	5,1	4,1	5,6	4,9	3,5	1,7	1,4	0,3	0,8	0

STZ Injecció d'estreptozotocina

TX Trasplantament d'illots a les vesícules seminals

Taula 10. Seguiment de glicèmies (en mM) del grup de rates en que l'empelt no ha funcionat. En algun cas hi ha un lleuger descens de la glicèmia que no és significatiu i que no es manté. La resta no presenten cap tipus de resposta al trasplantament.

A partir del dia 22 totes les mesures de glicèmia són superiors a 33 mM.

Considerem diabetis les glicèmies > 20 mM en una mesura o > 11 mM en 2 mesures consecutives.

> 33: glicèmia màxima que capta l'aparell

## VI.4.1.5. Grup STZ tòxica

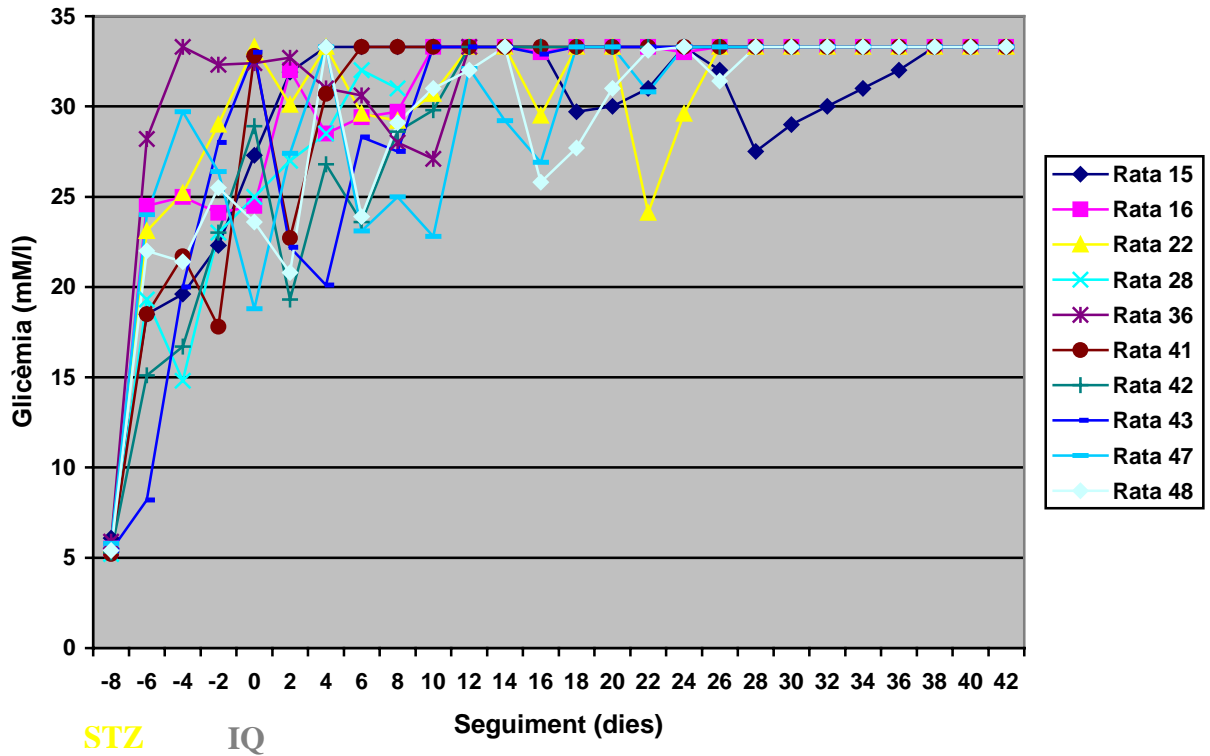
	Dia de seguiment				
	STZ				
	-8	-6	-4	-2	0
<b>Glicèmia rata 20</b>	5,3	18,1			
<b>Glicèmia rata 21</b>	5,2	18,4			
<b>Glicèmia rata 23</b>	5,3	13,8			
<b>Glicèmia rata 24</b>	5,4	17,5			
<b>Glicèmia rata 25</b>	5,4	21,7			
<b>Glicèmia rata 30</b>	5,5	24,1	19,5	29,1	
<b>Glicèmia rata 31</b>	6,2	23,7	22,1	13,2	
<b>Glicèmia rata 32</b>	6,2	21,1	21,1	23,5	
<b>Mitjana</b>	5.5	19.8	20.9	21.9	
<b>Desv. Est.</b>	0.4	3.4	1.3	8.1	

## STZ Injecció d'estreptozotocina

Taula 11. Seguiment de glicèmies (en mM) del grup de rates que han mort després de l'injecció d'estreptozotocina. Totes van esdevenir diabètiques abans de morir. Considerem diabetis les glicèmies > 20 mM en una mesura o > 11 mM en 2 mesures consecutives.

## VI.4.2. Gràfiques de seguiment de glicèmies

## VI.4.2.1. Grup control



STZ Administració Estreptozotocina  
 IQ Laparotomia + injecció de sèrum fisiològic a la vesícula seminal dreta

Fig. 15. Gràfica de seguiment de glicèmies (en mM) del grup control. Hiperglicèmia mantinguda després de l'injecció d'estreptozotocina. Es practica laparotomia mitja i injecció de sèrum fisiològic a la vesícula seminal dreta.

## VI.4.2.2. Grup empelt funcionant

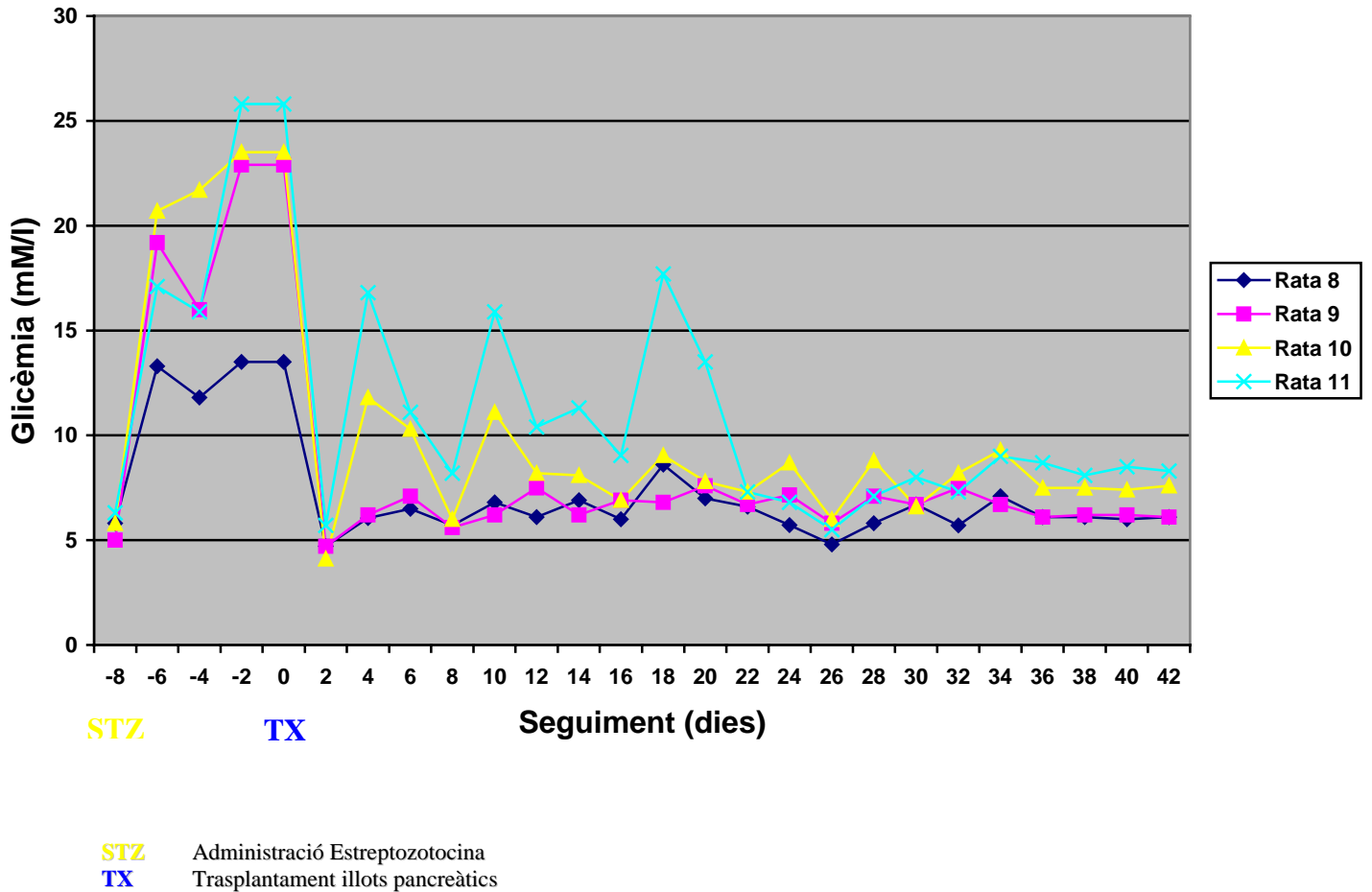
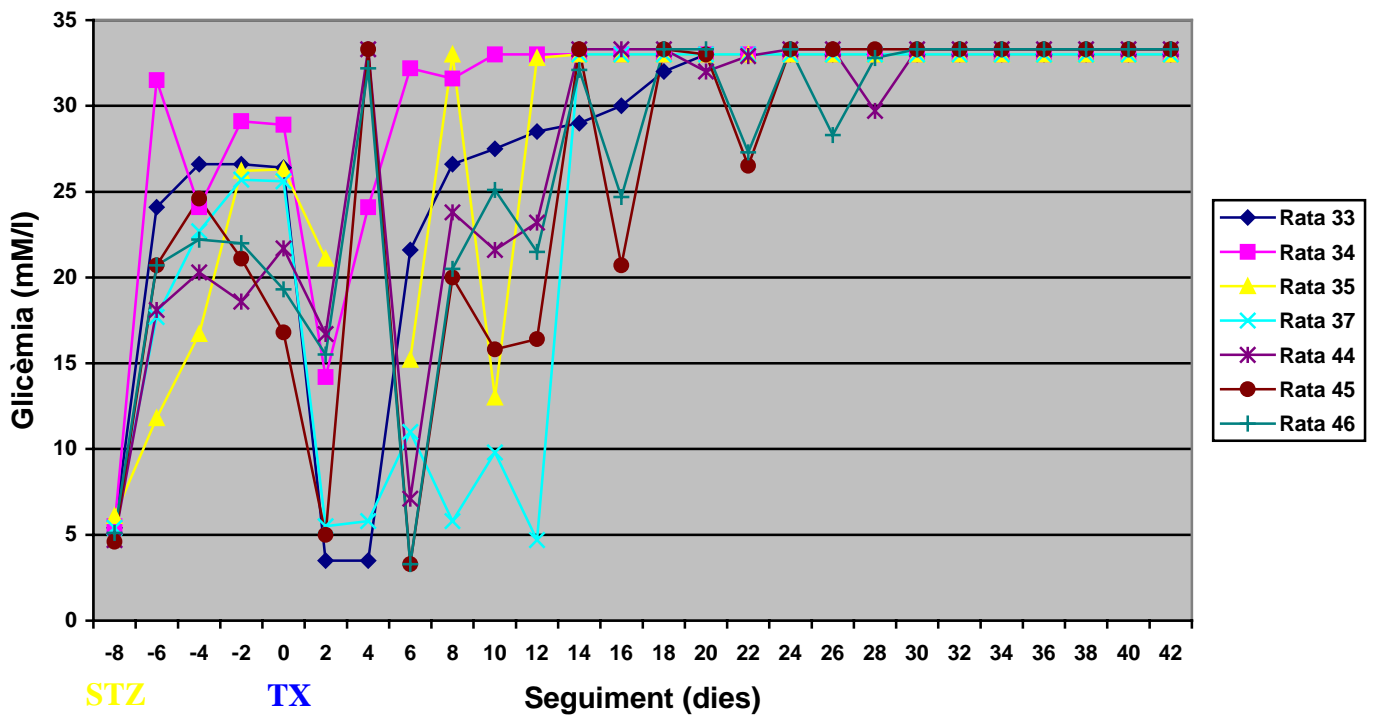


Fig. 16. Gràfica de seguiment de glicèmies (en mM) del grup en que l'empelt ha estat funcionant. S'observa un descens significatiu i mantingut de la glicèmia després del trasplantament d'illots de Langerhans i fins a la fi del seguiment.

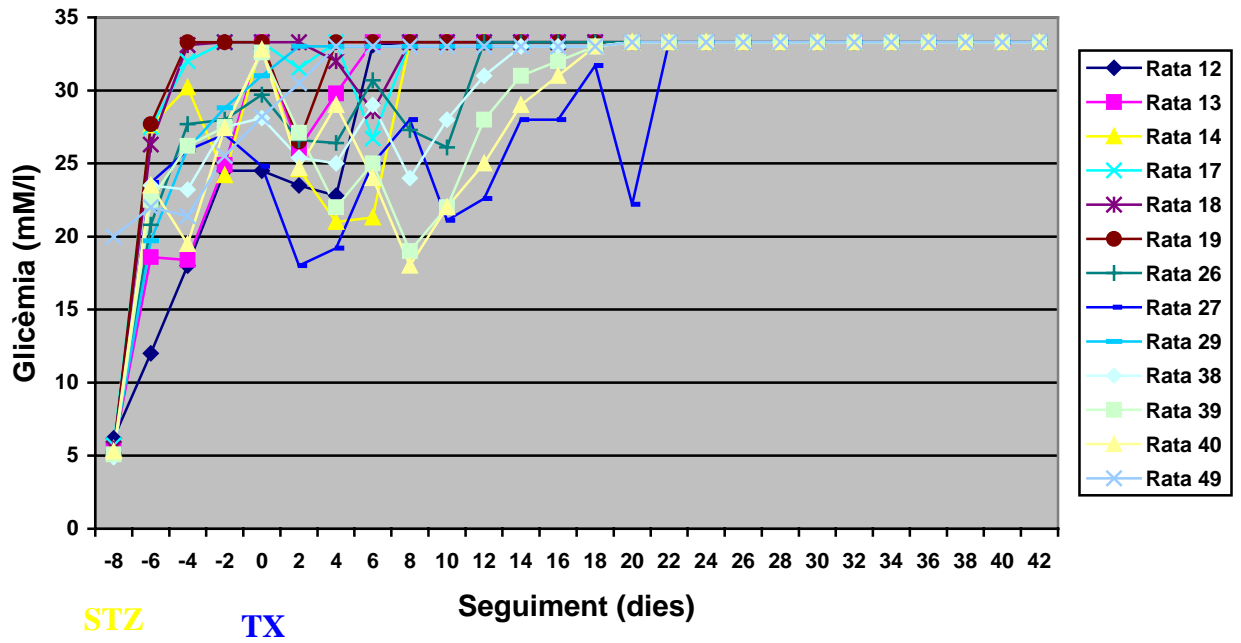
## VI.4.2.3. Grup empelt parcialment funcionant



**STZ** Administració Estreptozotocina  
**TX** Trasplantament illots pancreàtics

Figura 17. Gràfica de seguiment de glicèmies del grup de rates en que l'empelt ha funcionat parcialment. Els primers dies post-trasplantament hi ha un descens de les glicèmies, parcial o inclòs fins a la normalització, però que no es manté en el seguiment.

VI.4.2.4. Grup empelt no funcionant

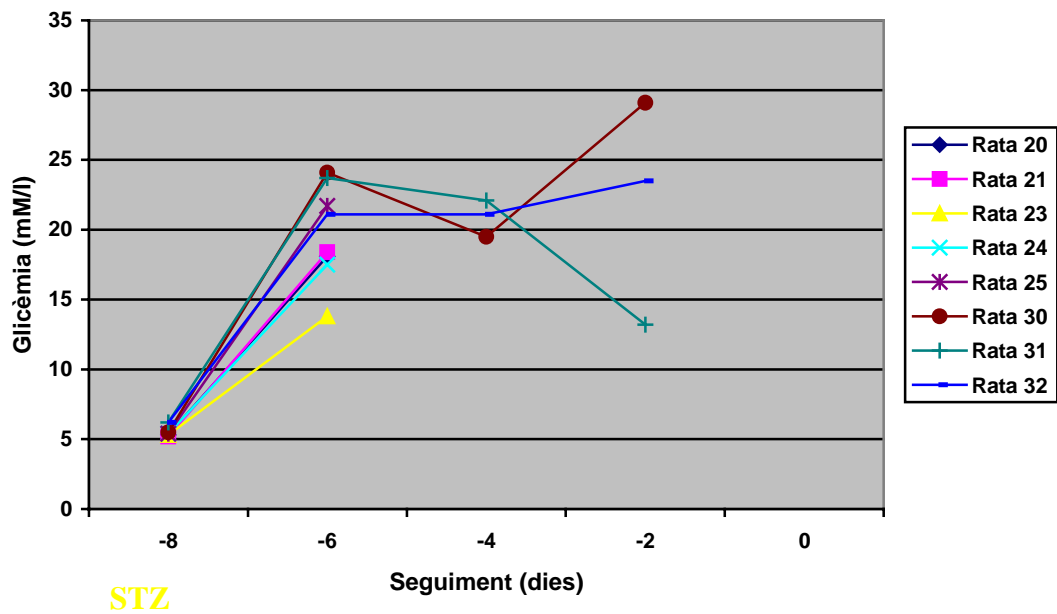


**STZ** Administració Estreptozotocina  
**TX** Trasplantament illots pancreàtics

Figura 18. Gràfica de seguiment de glicèmies del grup de rates en que l'empelt no ha funcionat. No es produeix resposta al trasplantament d'illots de Langerhans.



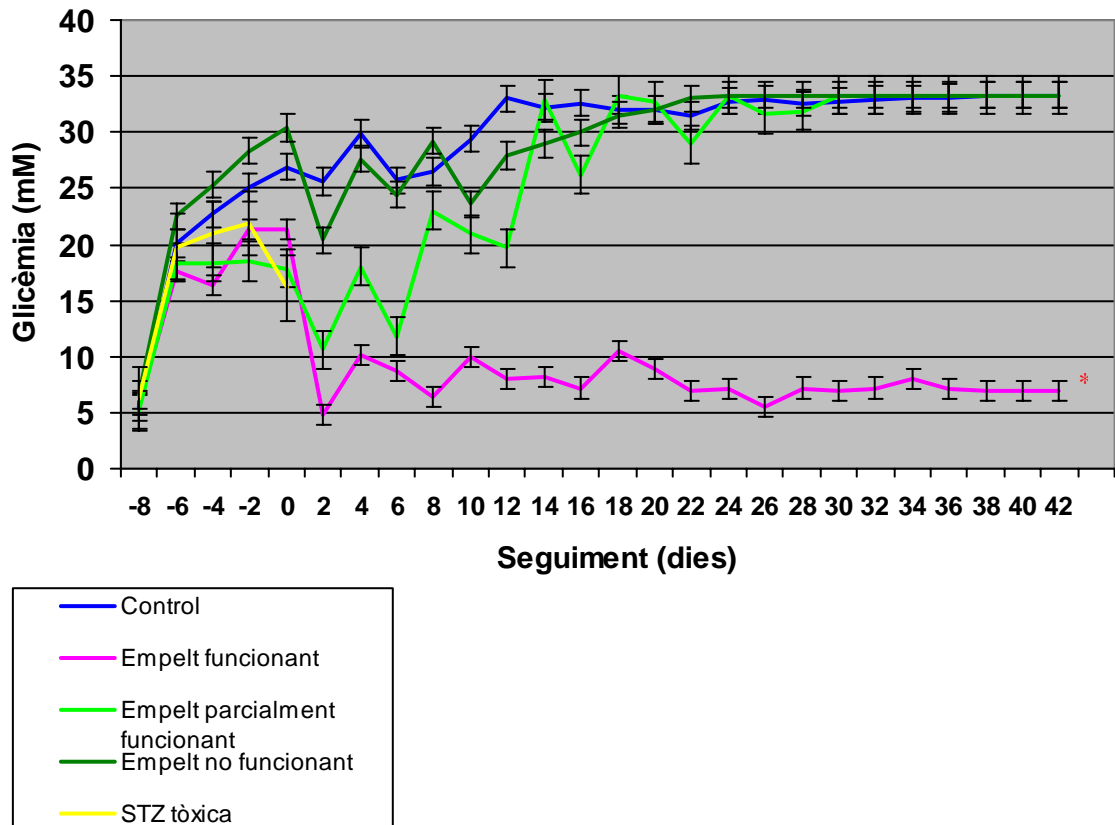
## VI.4.2.5. Grup STZ tòxica



STZ Administració Estreptozotocina

Figura 19. Gràfica de seguiment de glicèmies del grup de rates en que l'estreptozotocina ha estat tòxica, produint l'èxitus de les rates. Totes esdevenen diabètiques després de l'injecció d'STZ.

## VI.4.2.5. Mitges dels 5 grups



**Figura 20.** Gràfica que compara les mitges de les glicèmies dels 5 grups de rates. Destaca el grup "empelt funcionant" que després del trasplantament presenta un descens mantingut significatiu ( $*p < 0.005$ ) de la glicèmia respecte el grup control i la resta de grups. El grup "empelt parcialment funcionant", inicialment presenta un descens de la glicèmia, però no es manté en el seguiment. El grup "control" i el "no funcionant" presenten una corba similar, mantenint-se amb un estat d'hiperglicèmia durant tot el seguiment. No hi ha diferències significatives entre els grups "empelt parcialment funcionant" i "empelt no funcionant" amb el grup "control". El grup "STZ tòxica" presenta un seguiment curt donat l'èxitus de les rates als pocs dies de l'injecció d'STZ. Totes són diabètiques.

### VI.4.3. Resposta al trasplantament

En el següent gràfic es pot observar el percentatge de rates trasplantades amb illots (excloem les rates control i les que han mort per l'efecte tòxic de l'STZ) que han respost correctament, el de les que han respost parcialment i el de les que no han respòs al trasplantament.

Així podem dir que un 44% de les rates presenten una resposta positiva al trasplantament, mentre que el restant 56% no ho fan.

Del grup de rates que responen al trasplantament, tan sols un 16% presenten una resposta definitiva, mentre el 28% ho fan de forma temporal o parcial.

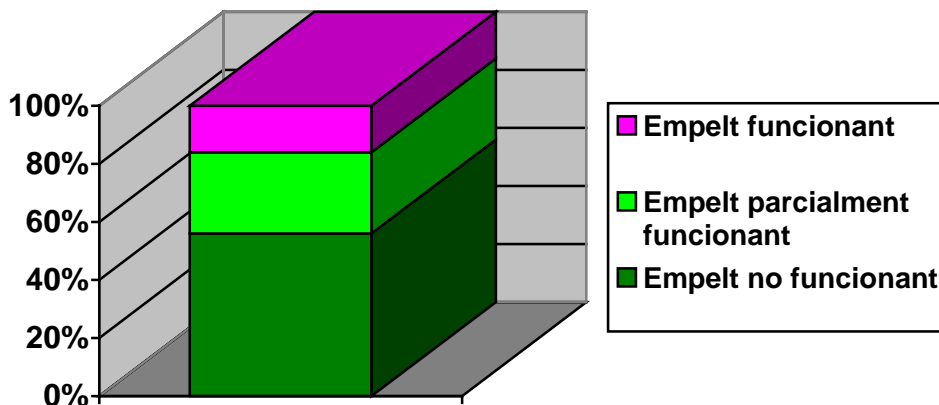


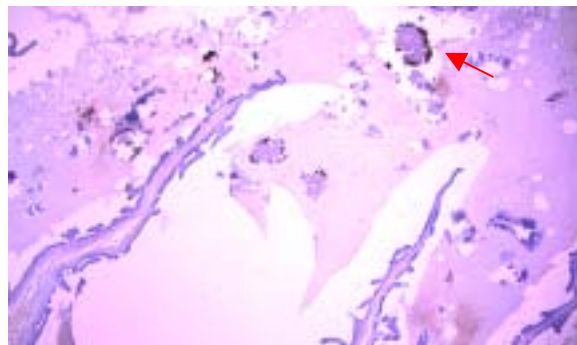
Figura 21. Gràfica que mostra el percentatge de respostes al trasplantament a les vesícules seminals. El 16% responen de forma definitiva al trasplantament. El 28% ho fan de forma temporal o parcial i el 56% no han respòs correctament al trasplantament.

#### **VI.4.4. Efecte tòxic de l'estreptozotocina**

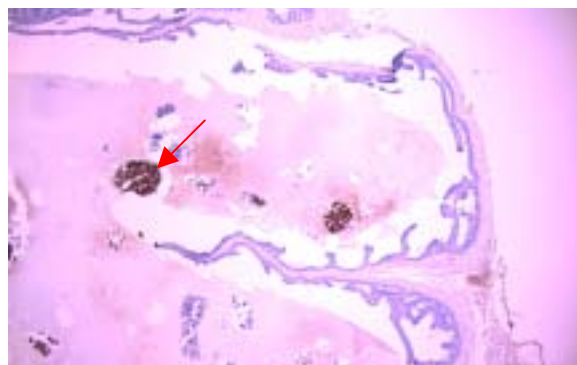
Un grup de 8 rates han mort entre 4 i 8 dies després de l'administració de l'estreptozotocina. Les autòpsies han demostrat que no ha estat conseqüència de complicacions per l'injecció intraperitoneal d'aquesta. Tampoc es relaciona amb glicèmies excessivament altes, ja que en tots els casos eren inferiors a 25 mM. Hi ha una dada comú a tot el grup, el pes inicial de les rates. El grup afectat (8 rates) presenta una mitjana de pes inicial de 438 grams, superior a la mitjana del pes inicial de la resta de rates (216 grams). Aplicant un test no paramètric de Wilcoxon, aquest fet té una significació estadística important ( $p < 0.0001$ ).

## VI.5. ANÀLISI HISTOLÒGIC DE LES VESÍCULES TRASPLANTADES

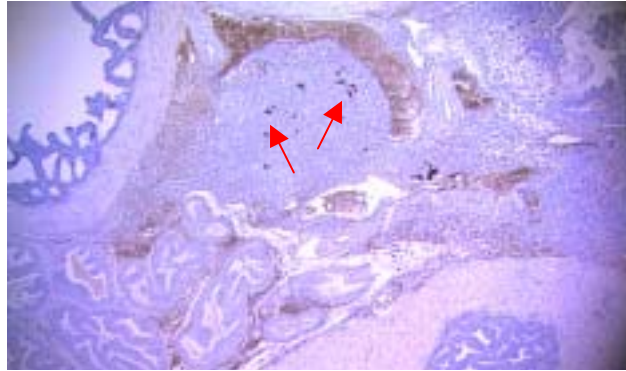
L'estudi histològic amb hematoxilina-eosina i l'immunohistoquímic amb tincions d'insulina i glucagó ens mostra com els illots, immediatament després del trasplantament estan presents a la llum de la vesícula seminal, mentre a les 48 i 96 hores del trasplantament s'aprecien implantats a la paret de la vesícula seminal. Aquesta mateixa troballa s'observa a les vesícules trasplantades en que l'empelt ha estat funcionant al final del seguiment. En els grups en que l'empelt ha funcionat parcialment o no ha funcionat, el nombre d'illots que es visualitzen és escàs o nul. A les vesícules control, òbviament, s'observa l'estructura normal de la vesícula seminal.



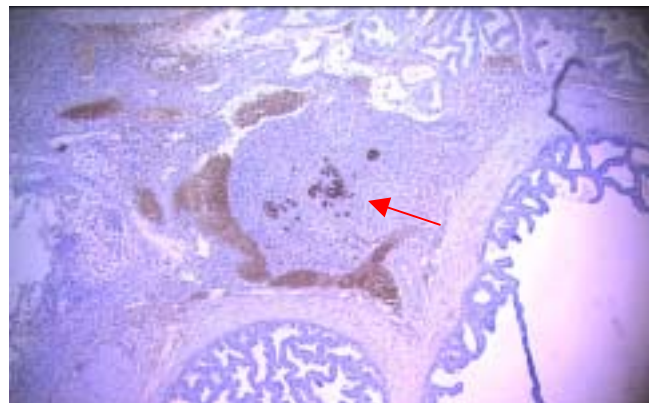
**Figura 22.** Marcatge immunohistoquímic anti-glucagó sobre una secció de vesícula seminal amb illots acabats de trasplantar. La imatge mostra els illots a la llum de la vesícula. 100 augments.



**Figura 23.** Marcatge immunohistoquímic anti-insulina sobre una secció de vesícula seminal amb illots acabats de trasplantar. La imatge mostra els illots a la llum de la vesícula. 100 augments.



**Figura 24.** Tinció immunohistoquímica anti-glucagó d'una secció de vesícula extreta a les 96 hores del trasplantament. Els illots es troben al teixit connectiu de la vesícula. 100 augments.



**Figura 25.** Tinció immunohistoquímica anti-glucagó. Illots al teixit connectiu de la vesícula. Fi del seguiment de 42 dies del grup "empelt funcionant". 100 augments.

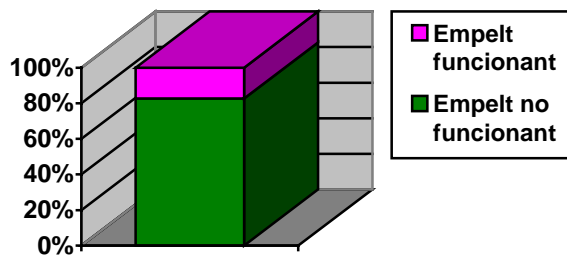
**VI.6. ESTUDI COMPARATIU: CÀPSULA RENAL vs VESÍCULA SEMINAL**

Analitzant i comparant els resultats obtinguts en ambdós estudis, s'observa que el percentatge d'empelts no funcionants és superior al grup "vesícula seminal" (84%) respecte el 55.6% del grup "càpsula renal". Al grup "càpsula renal" s'obtenen millors respostes definitives al trasplantament (44.4%) que al grup "vesícula seminal" (16%). Als dos grups hem considerat com a "empelt no funcionant" tots aquells que no han presentat una resposta definitiva, és a dir, "empelt parcialment funcionant" i "empelt no funcionant".

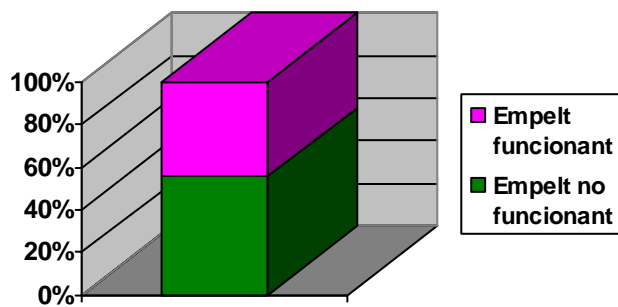
No obstant això, aplicant un test no paramètric de Fisher, no es troben diferències significatives. Es requeriria una n superior per poder obtenir significació estadística.

Els resultats obtinguts a l'estudi de la càpsula renal són similars als trobats a la literatura.

## Vesícula seminal



## Càpsula renal



**Figura 26.** Gràfiques comparatives del trasplantament a les vesícules seminals i a la càpsula renal. Destaca un millor percentatge de funcionament definitiu dels illots a la càpsula renal respecte a la vesícula seminal (44.4% vs. 16%).



## VII. DISCUSSIÓ

## VII.1. PLANTEJAMENT

El trasplantament d'illots de pàncreas, des de fa anys, es presenta com una possible alternativa pel tractament definitiu de la diabetis mellitus. Els resultats obtinguts fins a l'actualitat no han estat els esperats i és per això que s'estan buscant possibles alternatives que puguin millorar-los. Són diverses les possibles causes del fracàs de l'empelt i és per aquest motiu són molt diversos els camps d'estudi. Seguint la línia d'investigació en trasplantament d'illots que desenvolupa el nostre grup, dirigit pel Dr Pujol, des del 1989, hem indagat sobre els òrgans immunològicament privilegiats. L'excepcional d'aquests òrgans es basa en que els antígens en interaccionar amb les cèl.lules T, en lloc de provocar una resposta immunitària destructiva, indueixen tolerància o una resposta que no és destructiva pel teixit.

Els llocs immunològicament privilegiats són interessants per dos motius. En primer lloc, la comunicació entre el lloc privilegiat i el cos és atípica, donat que el fluid extracel.lular en aquests llocs no passa a través dels limfàtics convencionals, tot i que les proteïnes localitzades en aquests llocs els abandonen i poden tenir efectes immunològics. En segon lloc, els factors humorals, presumiblement citoquines, que afecten la conducta de la resposta immunitària, són produïts en aquests llocs immunològicament privilegiats i els abandonen juntament amb els antígens. Sembla que la citoquina antiinflamatòria TGF- $\beta$  és particularment important en aquest aspecte. Els antígens barrejats amb TGF- $\beta$  semblen induir respostes de cèl.lules T que no danyen els teixits. Es creu que alguns antígens expresats en llocs immunològicament privilegiats no indueixen tolerància ni activació, però si la activació és induïda en un altre lloc, poden convertir-se en dianes d'un atac autoimmunitari. És per això que es diu que les cèl.lules T específiques d'antigen que són segrestades en llocs immunològicament privilegiats estan en un estat d'ignorància immunològica (Janeway et al, 2000).

Malgrat tot, encara es desconeixen moltes de les característiques dels llocs immunològicament privilegiats.

Donat que les vesícules seminals presenten una estructura histològica similar als testicles, que com la còrnea, l'úter o el cervell, es consideren òrgans immunològicament privilegiats, i que presenten una membrana semipermeable, se'ns plantejava el dubte, si des d'aquest punt de vista, es poden considerar òrgans immunològicament privilegiats. En aquest sentit destaquem que no hem trobat cap treball a la literatura mèdica que faci referència al trasplantament d'illots a les vesícules seminals, i que, per tant, aquest treball és la primera experiència mundial.

Les vesícules seminals, a banda de la seva possible consideració com a òrgan immunològicament privilegiat, presenten altres avantatges:

- 1) La duplicitat anatòmica permet treballar sobre una de les vesícules sense alterar la funcionalitat de l'altra.
- 2) Fàcil accés quirúrgic en experimentació animal.
- 3) Possible reproducció tècnica en humans mitjançant un abordatge mínimament invasiu com la laparoscòpia, amb la que ja hi ha descrites exèresis de quists de vesícules seminals (Cherullo EE, 2002) (McDougall EM, 2001).
- 4) Contingut de les vesícules ric en fructosa, potassi, magnesi, bicarbonat, prostaglandines, prolactina i altres nutrients.
- 5) Efecte immunosupressor al inhibir l'activitat dels leucocits en situació de leucocitospèrmia. S'ha descrit que en homes amb leucocitospèrmia i hipofunció de les vesícules seminals, s'afecta el nombre i motilitat dels espermatozous i la morfologia del semen, mentre en homes amb leucocitospèrmia i funcionament correcte de les vesícules seminals, la qualitat del semen és correcte. Aquestes troballes sugereixen que el normal funcionament de les vesícules seminals és important per evitar els efectes negatius dels leucocits sobre l'esperma (Gonzales GF, 2001).

- 6) Secreció d'antígens per prevenir la resposta immune de la femella contra els espermatozous, com ara IgG-Fc, que protegeixen els espermatozous de la resposta cel·lular citotòxica mediada per IgG (Bukovsky A et al, 1991).

Totes aquestes característiques fan de les vesícules seminals un potencial òrgan per a implantar-hi els illots de forma exitosa.

## VII.2. RESULTATS

Els resultats obtinguts pel nostre grup en l'aïllament *in vitro* dels illots pancreàtics de rata són d'una viabilitat dels illots >90%, una puresa >60% i un rendiment (recuperació d'illots post-gradient) d'un 75%, resultat comparable amb altres sèries reconegudes (Scharp DW et al, 1990) (Vargas F et al, 1998). Els illots obtinguts poden presentar alteracions de la membrana en el procés de digestió. Així, al 25% d'illots morts durant la digestió s'hi ha d'afegir uns illots amb una estructura alterada. Si a aquest percentatge hi afegim els que moren en el procés de trasplantament i que només es trasplanten illots de diàmetre superior a 150 µm, és fàcil entendre que el nombre d'illots necessaris per a fer un trasplantament amb garanties ha de procedir d'un mínim de 2 pàncreas donants. Aquest fet ja es constata en humans.

A la nostra experiència prèvia de trasplantament d'illots de pàncreas, a la sub-càpsula renal, ja vam requerir d'un nombre d'illots entre 800 i 1200 (procedents de 2 pàncrees). Es va obtenir una correcta funcionalitat de l'ingert en un 44% dels receptors. Seguint la mateixa tècnica i pel mateix grup, hem practicat el trasplantament d'illots a les vesícules seminals obtenint una funcionalitat definitiva de l'ingert en un 16% dels receptors i una funcionalitat temporal o parcial en un 28% més. No obstant, a l'experiment vam demostrar que el trasplantament era efectiu, ja que al extreure la vesícula seminal implantada les glicèmies augmentaven fins a l'estat de diabetis inicial.

### **VII.3. FACTORS QUE ALTEREN LA FUNCIONALITAT**

Per què sota unes premisses que ens farien pensar en un major funcionament de l'empelt no hem obtingut els resultats esperats? Diversos factors poden intervenir:

- 1) La manipulació de les vesícules seminals durant la cirurgia, la lligadura del conducte excretor, la distensió de la vesícula, poden provocar una reacció inflamatòria que pugui alterar la correcta implantació i funcionament dels illots.
- 2) La revascularització dels illots a la vesícula seminal és un dels interrogants que ens hem plantejat. Així com a òrgans com la càpsula renal o la melsa s'observa una neovascularització important, a la vesícula seminal, els illots que no s'implanten a la paret, sinó que es queden a la llum, poden presentar un dèficit d'aportació sanguini. En aquest context, creiem que els illots que van presentar un funcionalisme correcte va ser per la seva implantació a la paret de la vesícula seminal. Aquest fet es pot observar a les imatges histològiques obtingudes al final del seguiment, en el grup que va presentar un funcionalisme correcte.
- 3) L'inervació dels illots és un interrogant que no ens podem contestar amb aquest experiment, i que també pot tenir la seva importància, donat el seu paper en la regulació de la resposta dels illots a la concentració plasmàtica de glucosa. La manca de neovascularització pot estar molt lligada a la manca de neoinervació.
- 4) Les hiperglicèmies mantingudes després de l'administració d'estreptozotocina podrien provocar l'esgotament metabòlic de l'illot quan encara no està ben vascularitzat, fet que podria explicar per què en un grup de rates es va aconseguir una reducció de les glicèmies inicialment, que posteriorment no es va mantenir. En aquest aspecte ens plantejem la possibilitat d'administrar insulina exògena els primers dies del trasplantament a fi de disminuir els requeriments de l'illot.

- 5) El pes inicial de les rates, també pot tenir una influència important. El grup "empelt funcionant" té una mitjana de pes inicial de 236 grams. El grup "empelt parcialment funcionant" de 252 grams i el grup "empelt no funcionant" de 274 grams (diferències no significatives). El major requeriment d'illots en relació al pes de la rata pot influir en l'èxit o fracàs del trasplantament, tot i que no és l'únic factor determinant ja que algunes rates amb baix pes inicial també van presentar una baixa funcionalitat.
- 6) La variabilitat de la tècnica quirúrgica no ha influït en els resultats, donat que la reproduïm d'una forma molt estandaritzada i és relativament senzilla. En alguns casos en que la tècnica és erràtica, és fàcil de visualitzar-ho i es treuen del protocol. Donada l'experiència del grup en el trasplantament experimental d'illots, creiem que es pot relativitzar la importància d'aquest aspecte.
- 7) Factors de viabilitat que alteren el metabolisme i la funcionalitat de la cèl.lula  $\beta$ , durant el procés de digestió i purificació. Això, acompanyat de les hiperglicèmies inicials i la manca de vascularització en el post-trasplantament immediat, podria disminuir la funcionalitat i capacitat d'adaptació de l'illot.

Comparant els nostres resultats amb els obtinguts en els primers trasplantaments en altres òrgans, el percentatge de funcionalitat és similar. Creiem que millorant el protocol d'obtenció d'illots, augmentant el nombre d'illots per trasplantament i millorant la tècnica d'implantació quirúrgica, es podria assolir una funcionalitat similar a l'obtinguda pel trasplantament a d'altres òrgans.

Donat que l'estudi el vam realitzar en rates singèniques, no ens permet treure conclusions sobre el potencial privilegi immunològic de les vesícules seminals. En aquest estudi hem avaluat la funcionalitat dels illots en aquest òrgan i un cop assolits nivells de funcionalitat òptims caldrà fer trasplantaments en un model al·logènic.

#### **VII.4. LIMITACIONS DE L'ESTUDI**

El fet que el nostre estudi es basi en el trasplantament d'illots a les vesícules seminals, limita, òbviament, el potencial benefici als mascles. És un punt de controvèrsia, però que donada l'amplitud de la potencial població beneficiada, i que si hagués funcionat de forma òptima obria les portes a seguir investigant en òrgans femenins, com ja s'ha fet a l'úter, o bé a les trompes de Falopi.

Treballar amb rates singèniques també limita les conclusions que es podrien treure de l'estudi, ja que no permet conèixer si les vesícules seminals són òrgans potencialment privilegiats, però no era l'objectiu de l'estudi, ja que el que volíem conèixer és si eren un bon lloc per trasplantar-hi illots i en un futur es planteja l'estudi en rates al·logèniques.

#### **VII.5. ESTREPTOZOTOCINA**

Durant l'estudi es va produir un fet inesperat, la mort de 8 rates als pocs dies de l'administració d'STZ. Aquest fet, poc documentat a la literatura mèdica. S'ha atribuït al possible efecte tòxic de l'STZ sobre altres òrgans, a més del pàncreas. En l'experiència del grup de Kravnak en limfocits humans en cultiu, el tractament curt amb dosis altes d'STZ o tractament perllongats amb baixes dosis d'STZ indueix la mort cel·lular i inhibició de la mitosi en grau important.

A la nostra experiència destaca que les rates que van morir presentaven un pes inicial significativament superior a la resta. Creiem que la dosi d'STZ pot ser la responsable de la mort de l'animal. En aquest sentit destaquem que la dosi requerida per assolir la diabetis en ratolins, rates o gossos no és proporcional al seu pes, sinó que el ratolí requereix dosis proporcionalment més elevades que la rata, i aquesta respecte el gos (Pelegrin M et al, 1998) (Tobin BL et al, 1993). Si a

una rata de 200 grams se li administra la mateixa proporció d'STZ que a una de 400 grams, pot ser que aquesta dosi li sigui tòxica, com així hem constatat.

#### VII.6. FUTUR

Els darrers anys, el trasplantament d'illots de pàncreas en humans ha fet un canvi de rumb. Si bé inicialment els resultats no eren els desitjats, des de l'aplicació del protocol d'Edmonton els resultats estan essent molt esperançadors. Encara és aviat per saber l'abast d'aquest avenç, però sembla que les millores en les tècniques de purificació dels illots, el major nombre d'illots trasplantats, la repetició del trasplantament tantes vegades com sigui necessari per assolir el control esperat, les millores en les tècniques d'implantació i en l'immunosupressió han canviat radicalment el panorama i han estimulat novament la investigació en aquest camp.

Darrerament, a la investigació del trasplantament d'illots de pàncreas, han pres gran rellevància les cèl.lules mare o "stem cells". Creiem que aquesta línia d'investigació pot significar un altre pas important, com ja s'està demostrant a la pràctica clínica en d'altres branques de la Medicina.

Si a partir de "stem cells" d'adult autòlogues poden obtenir illots d'un mateix pacient s'evitaran dos grans limitacions del trasplantament d'illots, el rebuig i el nombre insuficient d'illots de que disposem. Quedarà per millorar el punt sobre el que hem treballat, el lloc d'implantació dels illots, donat que l'actual lloc d'implantació, el fetge per via portal, no està exempt de complicacions. Tot i l'evident avenç que està suposant l'investigació en "stem cells" encara queda un llarg camí per recórrer, on les consideracions ètiques per l'ús d'embrions en l'investigació, estan suposant un fre.



Els evidents progressos obtinguts els darrers anys a la pràctica clínica i en investigació no han fet més que reactivar l'activitat científica en aquest camp i els fruits d'aquest fet s'han de recollir durant la propera dècada, on esperem trobar una sol.lució definitiva pels milions de malalts de diabetis mellitus tipus 1. Més lluny es troba la possibilitat d'actuar sobre els factors etiopatogènics i poder així prevenir la instauració de la malaltia.

## VIII. CONCLUSIONS

- 1- L'empelt d'illots a la vesícula seminal és viable tècnicament.
- 2- Les vesícules seminals són òrgans on l'empelt d'illots pot funcionar adequadament.
- 3- El nombre mínim d'illots trasplantats per aconseguir un empelt funcionant al nostre estudi és de 800, obtingut de la purificació de 2 pàncreas donants.
- 4- Els empelts funcionants (17.4%) ho han estat fins a la finalització del seguiment (42 dies).
- 5- L'exèresi de les vesícules trasplantades als empelts funcionants provoca el retorn immediat a l'estat de diabetis.
- 6- Histològicament, als empelts funcionants es troben illots inclosos a la paret de la vesícula seminal.
- 7- L'empelt d'illots a la vesícula seminal presenta un percentatge de funcionalisme inferior a l'obtingut pel nostre grup a la càpsula renal.

## IX. BIBLIOGRAFIA

Alba A, Pujol-Borrell R, Vives-Pi M. Diabetes tipo 1: autoinmunidad frente a la célula beta. *Endocr y Nutr*, en prensa, 2003.

Alejandro R, Cufield RG, Shienvold RL, Polonsky KS, Noel J, Olson L, Dillberger J, Miller J, Mintz DH. Natural history of intrahepatic canine islet cell autografts. *J Clin Invest*, 1986; 1339-1348.9-2361.

Alejandro R, Mintz DH, Noel J, Latif A, Koh N, Russell E, Miller J. Islet cell transplantation in type I diabetes mellitus. *Transplant Proc*, 1987; 19: 235

Arias J, Vara E, Balibrea JL. Últimos avances en el campo del trasplante de islotes de Langerhans. *Cir Esp*, 2001; 70: 310-313.

Ar'Rajab A, Dawidson IJ, Harris RB, Sentementes JT. Immune privilege of the testis for islet xenotransplantation (rat to mouse). *Cell Transplant*, 1994; 3(6): 493-8.

Bach JF, Chatenoud L: Tolerance to islet autoantigens in type I diabetes. *Annu. Rev. Immunol.* 19:131-61, 2001

Bach FH, Fishman JA, Daniels N, Proimos J, Anderson B, Carpenter CB et al. Uncertainty in xenotransplantation: individual benefit versus collective risk. *Nat Med*, 1998; 4: 141-144.

Balibrea JL, Arias Díaz J. Tratamiento de la Diabetes Mellitus tipo I mediante trasplante de islotes de Langerhans. A: Manejo de la cirugía de trasplantes. Ed. Universidad de Oviedo. 1996; 357-370.

Ballinger WF, Lacy Pe. Transplantation of intact pancreatic islets in rats. *Surgery*, 1972; 72: 175-176.

Banting FG, Best CH. The intestinal secretion of the pancreas. *J Lab Clin Med* 1922; 7: 251-66.

Behme MT, Dupre J, Stiller CR. Intestinal mesenteric site for islet transplantation. *Transplant Proc*, 1994; 26(2): 678-9.

- Bell RH, Hye RJ. Animal models of diabetes mellitus: physiology and pathology. *J Sug Res*, 1983; 35: 433-460.
- Bell GI, Picter RI, Rutter WJ, Cordell B, Tischler E, Goodman HM. Sequence of the human insulin gene. *Nature* 1980; 284: 26-32.
- Benhamou PY, Moriscot C, Badet L, Halimi S. Strategies for graft immunomodulation in islet transplantation. *Diabetes Metab*, 1998; 24: 3, 215-24.
- Bennet DL, Bailyes EM, Nielsen E et al. Proinsulin conversion in the insulin secretory granules is mediated by two sequences-specific endoproteases related to the Kex2 homologues, PC2 and PC3. *J Biol Chem*, 1992; 267: 15229-36.
- Berna G, Leon-Quinto T, Fuentes E, Andreu E, Nadal A, Roche E, Martin F, Reig JA, Soria B. Stem cells and diabetes. *Rev Clin Esp*, 2001; 201 (9): 548-56.
- Bild DE, Selby DV, Sinnock P, et al. *Diab Care*. 1989; 12: 24.
- Bobzien B, Yasunami Y, Mejerick M, Lacy PE, Davie JM. Intratesticular transplants of islets xenografts (rat to mouse). *Diabetes*, 1983; 32(3): 213-6.
- Bohme J, Haskins K, Stecha P, Van Ewijk W, LeMeur M, Cerlinger P, Benoist C, Mathis D. Transgenic mice with I-A are normoglycemic but immunologically intolerant. *Science*, 1989; 244: 1179-83.
- Bonner-Weir S., Smith FE. Islets of Langerhans: morphology and its implications. A: *Joslin's Diabetes Mellitus*. Kahn CR, Weir GC (Eds.). Baltimore: Williams and Wilkins. 1993; 15-28.
- Botazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D. Islet cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiency. *Lancet*, 1974; 2:1279-1283.
- Boyd AE, Rajan AS, Gaines KL. Regulation of insulin release by calcium. A: *Insulin secretion*. Alan R. Liss, Inc., New York. 1989; 93-105.
- Brain SD, Williams TJ, Ippins JR, Morris HR, McIntyre I. Calcitonin generelatid peptide is a potent vasodilatador. *Nature* 1985; 31: 54-56.

Brendel M, Hering B, Schultz A, Bretzel R. International Islet Transplant Registry report. Giessen, Germany: University of Giessen, 1999: 1-20.

Brendel M, Hering B, Schultz A, Bretzel R. International Islet Transplant Registry. Newsletter N°9, Vol. 8, N° 1, June 2001.

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

Bukovsky A, Thaler CJ, McIntyre JA, Antigens of immunoglobulin G-Fc receptor III in human male reproductive tract accessory glands. *Fertil Steril*, 1991; 55: 595-602.

Carlsson PO, Palm F, Andersson A, Liss P. Markedly decreased oxygen tension in transplanted rat pancreatic islets irrespective of the implantation site. *Diabetes*, 2001; 50(3): 489-95.

Chen MC, Proost P, Gysemans C, Mathieu C, Eizirik DL: Monocyte chemoattractant protein-1 is expressed in pancreatic islets from prediabetic NOD mice and in interleukin-1 beta-exposed human and rat islet cells. *Diabetologia*, 2001; 44:325-332.

Cherullo EE, Meraney AM, Bernstein LH, Einstein DM, Thomas AJ, Gill IS. Laparoscopic management of congenital seminal vesicle cysts associated with ipsilateral renal agenesis. *J Urol*, 2002; 167(3): 1263-7.

Currie CJ, Kraus D, Morgan CL, et al. *Diab Med*. 1997; 14: 686.

Dean BM, Walker R, Bone AJ, Baird JD, Cooke A. Pre-diabetes in spontaneously diabetic BB/E rat: lymphocyte subpopulations in the pancreatic infiltrate and expression of rat MHC class II molecules in endocrine cells. *Diabetologia*, 1985; 28: 464-6.

De la Tour D, Halvorsen T, Demeterco C, Tyrberg B, Itkin-Ansari P, Loy M, et al. Beta cell differentiation from a human pancreatic cell line in vitro and in vivo. *Mol Endocrinol*, 2001; 15: 476-483.

Dubernard JM, Sutherland D. International handbook of pancreas transplantation. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston. London, 1989.

Dubernard JM, Traeger J, Neyra P, Touraine JL, Tranchant D, BlankBrunat N. A new method of preparation of segmental pancreatic grafts for transplantation: trials in dogs and man. *Surgery*, 1978; 84: 633-9.

Dupraz P, Cottet S, Hamburger F, Doici W, Felley-Bosco E, Thorens B. Dominant negative MyD88 proteins inhibit interleukin-1 beta/interferon-gamma-mediated induction of nuclear factor kappa B-dependent nitrite production and apoptosis in beta cells. *J Biol Chem*, 2000; 275: 37672-78.

Eissenbarth GS, Stegall M. Islet and pancreatic transplantation-autoimmunity and alloimmunity. *N Eng J Med*, 1996; 335(12): 888-889.

Faber O, Binder C. C-peptide response to glucagon: a test for the residual beta-cell function in diabetes mellitus. *Diabetes*, 1977; 26: 605-610.

Felt-Ramssen B, Mathiesen ER, Deckert T. Effect of two year of strict metabolism control on progression of incipient nephropathy in insulin-dependent diabetes. *Lancet*, 1986; 2: 1300-04.

Ferber S. Can we create new organs from our own tissues? *Isr Med Assoc J*, 2000; Jul, 2 suppl: 32-36.

Foulis AK, Liddle CN, Farquharson MA, et al. The histopathology of the pancreas in type 1 diabetes: a 25 year review of deaths in patients under 20 years of age in the United Kingdom. *Diabetologia*, 1986; 29:267-274.

Fritschy WM, Van Straaten JF, De Vos P, Strubbe JH, Wolters GH, Van Schilfgaarde. The efficacy of intraperitoneal pancreatic islet isografts in the reversal of diabetes in rats. *Transplantation*, 1991; 52(5): 777-83.

Garvin P, Reese J, Burton F, Lindsey L, Ardge D, Carney K, Niehoff M, Kurtz M. Pancreatic allograft function during reversible rejection episodes in dual kidney-pancreas recipients. *Transplantation* 1991; 23: 1608-10.



- Gerich J, Charles M, Grodsky G. Regulation of pancreatic insulin and glucagons secretion. *Ann Rev Physiol*, 1976; 38: 353.
- Gil-Vernet JM, Fdez-Cruz L, Andreu J, Figuerola D, Caralps A. Urinary tract diversion in clinical pancreas trasplantation. *Traspl Proc*, 1986; 18: 1132.
- Gonzales GF. Function of seminal vesicles and their role on male fertility. *Asian J Androl*, 2001; 3: 251-258.
- Grewall IS, Rutledge BJ, Fiorillo JA, et al. Transgenic MCP-1 in pancreatic islets produces monocyte-rich insulitis without diabetes. *J. Immunol*; 1997; 159:401-408.
- Groth CG, Korsgren O, Tibell A, Tollemar J, Moller E, Bolinder J, et al. Transplantation of porcine fetal pancreas to diabetic patients. *Lancet*, 1994; 344: 1402-1404.
- Groth G, Tyden G, Ostman J. Fifteen years experience with pancreas transplantation with pancreaticoenterostomy. *Diabetes*, 1985; 34: 1008-13.
- Gruessner RWD, Burke GW, Stratta R, Sollinger H, Benedetti E, Marsh C, Stock P, Boudreaux JP, Martin M, Drangstveit MB, Sutherland DER, Griessner A. A multicenter analysis of the first experience with FK506 for induction and rescue therapy after pancreas transplantation. *Transplantation*, 1996; 61: 261-273.
- Guest PC, Hutton JC. Biosynthesis of insulin secretory granule proteins. A: Nutrient regulation of insulin secretion. London: Flatt PR, editor. Portland Press. 1992; 59-82.
- Gu Y, Tabata Y, Kawakami Y, Balamurugan AN, Hori H, Nagata N, Satake A, Cui W, Qi M, Misawa Y, Toma M, Miyamoto M, Nozawa M, Inoue K. *Cell Trasplant*, 2001; 10(4-5): 453-7.
- Hanninen A, Jalkanen S, Salmi M, Toikkanen S, Nikolakaros G, Simell O. Macrophages, T cell receptor usage, and endothelial cell activation in the pancreas at the onset of insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*, 1992; 90:1901-1910.
- Hegre OD, Lazarow A. Islet transplantation. A: The diabetic pancreas. Volk BW, Wellmann KF, Eds. Plenum Press, New York (1977), p. 517-550.

Heuser M, Wolf B, Vollmar B, Menger MD. Exocrine contamination of isolated islets of Langerhans deteriorates the process of revascularization after free transplantation. *Transplantation*, 2000; 69(5): 756-61.

Houwing H, Hilbrands LG, Van Suylichem PT, Bruggink JE, Steffens AB, Strubbe JH. Control of insulin secretion and glucose homeostasis in exercising diabetic rats with intrasplenic or kidney subcapsular islets grafts. *Cell Transplant*, 1997; 4: 413-22.

Jaeger C, Wohrle M, Federlin K, Bretzel RG. Pancreatic islet xenografts at two different transplantation sites (renal subcapsular versus intraportal): comparison of graft survival and morphology. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 1995; 103(2): 123-8.

Janeway CA, Travers P, Walport M. Schlomchick. *Autoinmunidad y trasplante. A: Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad.* Ed. Masson. Madrid, 2000. p. 539-551.

Jansson L, Jellerström c. A rapid method of visualizing the pancreatic islets for studies of islet capillary blood flow using non-radioactive microspheres. *Acta Physiol Scand* 1981; 113: 371-4.

Johnston CF, Shaw C, O'Hare MMT, Buchanan KD. *Anatomía y Fisiología de los islotes pancreáticos. A: Diabetes Clínica.* GM Besser, HJ Bodansky & AG Cudworth (Eds.). Gower Medical Publishing, London 1988, p. 110-114.

Katz H, Homan M, Velosa J, Robertson P, Rizza R. Effects of pancreas transplantation on postprandial glucose metabolism. *N Engl J Med*, 1991; 325: 1287.

Kaur S, Cortiella J, Vacanti CA. Identifying a site for maximum delivery of oxygen to transplanted cells. *Tissue Eng*, 2000; 6(3): 229-32.

Kawakami Y, Iwata H, Gu Y, Miyamoto M, Murakami Y, Yamasaki T, Cui W, Ikada Y, Imamura M, Inoue K. Modified subcutaneous tissue with neovascularization is useful as the site for pancreatic islet transplantation. *Cell Transplant*, 2000; 9(5): 729-32.

Kemp CB, Knight MB et al. Transplantation of isolated pancreatic islets into the portal vein of diabetics rats. *Nature*, 1973; 244: 447.

Kerr-Conte J, Pattou F, Lecompte-Houcke M, Xia Y, Boilly B, Proye C, et al. Ductal cyst formation in collagen-embedded adult human islet preparations. A means to the reproduction of nesidioblastosis in vitro. *Diabetes*, 1996; 45: 1108-14.

Koevary S, Rossini AA, Stoller W, Chick W, Williams R. Pasive transfer of diabetes in the BB/W rat. *Science*, 1983; 220: 727-728.

Konigsrainer A, Tilg H, Reibnegger G, Steurer W, Schmid TH, Wachter H, Margreiter R. Pancreatic juice neoterin excretion. A reliable marker of pancreas allograft rejection. *Transp Proc*, 1992; 24: 907-908.

Kronenberg M. Self-tolerance and autoimmunity. *Cell*, 1991; 65: 537-42.

Laing SP, Swerdlow AJ, Slater SD, et al. *Diab Med*, 1999; 16: 466.

Lakey JRT, Warnock GL, Rajotte RV, Suarez-Almazor ME, Ao Z, Shapiro AMJ, Kneteman NM. Variables in organ donors that affect the recovery of human islets of Langerhans. *Transplantation*, 1996; 61: 1047-1053.

Largiader F, Kolb E, Binswanger U. A long-term functioning human pancreatic islet allotransplantation. *Transplantation*, 1980; 29: 76-77.

Lee HC, Ahn KJ, Lim SK, Kim KR, Ahn YS, Lee KE, Huh KB. Allograft transplantation of rat islets into the cisterna magna of streptozotocin-induced diabetic rats. *Transplantation*, 1992; 3: 513-6.

Leonard RJ, Lazarow A. Islet cell transplantation. *Kidney Int*, 1974; 6(sup11): 169-178.

Like AA, Weringer EJ, Holdash A, McGill P, Atkinson D, Rossini A. Adoptive transfer of autoimmune diabetes in BioBreeding/Worcester (BB/W) inbred and hybrid rats. *J Immunol*, 1985; 134: 1583-7.

Lim SM, Li SQ, Poh LH, Lim NK, Seah ML, Heng KK. The rectum a a novel site for islet cell trasplantation. *Transplantation*, 1994; 57(2): 294-6.

- Luna A, Julian JF, Alba A, Colobran R, G-Cuyás F, Fdez-Figueras MT, Broggi MA, Llamazares JF, Pujol-Borrell R, Vives-Pi M. Islet transplantation in seminal vesicles restores glycemia in diabetic rats: a preliminary study. *Transplant Proc*, 2002; 34: 196-199.
- Makino S, Tochino Y. The spontaneously nonobese diabetic mouse. *Exp. Anim*, 1978; 27:27-29.
- Market R, Heystek G. Effect of immunosuppressive treatment on the survival of allogenic islets of Langerhans in rat. *Transplantation*, 1976; 20: 428-431.
- Market R, Bonthius F, Duval SY. Macrophages and nitric oxide are involved in primary non-function of islets xenografts. *Transplant Proc*, 1995; 27: 252-253.
- Matchinsky FM. Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic cell and hepatocytes. *Diabetes*, 1990; 39: 647-52.
- Mauer SM, Sutherland DER, Steffes MW, Leonard RJ, Najarian JS, Michael AF, Brown DM. Pancreatic islet transplantation: effects of the glomerular lesions of experimental diabetes in the rat. *Diabetes*, 1974; 23: 748-753.
- Mauer SM, Campice M. Successful intrasplenic autotransplantation of pancreatic tissue in totally pancreatectomized dogs. *Transplantation*, 1976; 21: 265-9.
- McDougall EM, Afane JS, Dunn MD, Shalhav AL, Clayman RV. Laparoscopic management of retrovesical cystic disease: Washington University experience and review of the literature. *J Endourol*, 2001; 15(8): 815-9.
- McEvoy RC, Leung PE. Transplantation of fetal rat islets into the cerebral ventricles of alloxan-diabetic rats. Amelioration of diabetes by syngenic but not allogenic islets. *Diabetes*, 1983; 32(9): 852-7.
- Mendola JF, Goity C, Fdez Cruz L, Gomis R. Immunocytochemical study of pancreatic islet revascularization in islet isograft: effect of hyperglycemia of the recipient and of in vitro culture of islets. *Transplantation*, 1994; 57: 725-730.

- Minkowski O. Untersuchungen über den diabetes mellitus nach exstirpation des pankreas. *Virchows Archiv für Pathologische Anatomie*, 1993; 31: 85-89.
- Nakhoda AF, Like AA, Chappel CI, Wei CN, Marliss EB. The spontaneously diabetic Wistar rat (the BB rat). *Diabetologia*, 1978; 14: 199-207.
- Nankivell BJ, Allen RDM, Bell B, Wilson T, Chapman JR. Factors affecting urinary amylase excretion after pancreas transplantation. *Transp Proc*, 1990; 22: 2156-57.
- O'Brien BA, Harmon BV, Cameron DP, Allan DJ. Apoptosis is the mode of beta cell death responsible for the development of IDDM in the nonobese diabetic (NOD) mouse. *Diabetes*, 1997; 46:750-757.
- Okamoto H. Molecular basis of experimental diabetes: generation, oncogenesis and regeneration of pancreatic beta cells of islets of Langerhans. *Bioessays*, 1987; 2: 15-21.
- Orci L. Macro and Micro Domains in the endocrine pancreas. *Diabetes* 1982; 31: 538-65.
- Oschilewski U, Kiesel U, Kolb H. Administration of silica prevents diabetes in BB rats. *Diabetes*, 1985; 34: 197-9.
- Parham P. Intolerable secretion in tolerant transgenic mice. *Nature*, 1988; 333: 500-503.
- Patel B, Gujral S, Jefferson K, Evans S, Persad R. Seminal vesicle cysts and associated anomalies. *BJU International*, 2002; 90: 265-271.
- Patzelt C, Labrecque AD, Duguilid JR et al. Detection and kinetic behavior of preproinsulin in pancreatic islets. *A: Proc Natl Acad Sci*. 1978. USA 75: 1260-4.
- Peakman M, Tree TI, Endl J, van Endert P, Atkinson MA, Roep BO. Characterization of preparations of GAD65, proinsulin, and the islet tyrosine phosphatase IA-2 for use in detection of autoreactive T-cells in type 1 diabetes: report of phase II of the Second International Immunology of Diabetes Society Workshop for Standardization of T-cell assays in type 1 diabetes. *Diabetes*, 2001; 50: 1749-1754.

Pelegri M, Devedjian JC, Costa C, Visa J, Solanes G, Pujol A, Asins G, Valera A, Bosch F. Evidence from transgenic mice that interferon beta may be involved in the onset of diabetes mellitus. *J. Biological Chemistry*, 1998; 273 (20): 12332-12340.

Pozzilli P, Signore A, Williams AJK, Beales PE. NOD mouse colonies around the world-recent facts and figures. *Immunol Today*, 1993; 14:193-196.

Pukel C, Baquerizo H, Rabinovitch A. Interleukin 2 activates BB/W diabetic rat lymphoid cell cytotoxic to islet cells. *Diabetes*, 1987; 36: 1217-22.

Rabinovitch A. An update on cytokines in the pathogenesis of insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev*, 1998; 14:129-151.

Rakieten ML, Madkarmi MV. Studies on the diabetogenic action on streptozotocin. *Cancer Chemotherapy*, 1963; 28: 91-98.

Rayat GR, Korbitt GS, Elliott JF, Rajotte RV. Survival and function of syngenic rat islet grafts placed within the thymus versus under the kidney capsule. *Cell Transplant*, 1997; 6(6): 597-602.

Rayfield EJ, Kelly KJ, Yoon JW. Rubella virus-induced diabetes in hamsters. *Diabetes*, 1986; 34: 1278-81.

Reig JA, Enseñat-Waser R, Roche E, Soria B. Terapia celular en la diabetes mellitus. *Endocrinol Nutr*, 2002; 49(8): 260-8.

Rhodes CJ, Halban PA. Newly synthesised proinsulin/insulin and stored insulin are released from pancreatic cell predominantly via a regulated than a constitutive pathway. *J Cell Biol*. 1987; 105: 145-154.

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

Ricordi C, Alejandro R, Zeng Y. Human islet isolation and purification from pediatric-age donors. *Transplant Proc* 1991; 1: 783.

Ryan EA, Lakey JR, Paty BW, Imes S, Korbitt GS, Kneteman NM, Bigam D, Rajotte RV, Shapiro AM. Successful islet transplantation: continued insulin reserve provides long-term glycemic control. *Diabetes*, 2002 Jul; 51(7): 2148-57.

Sageshima J, Kirchof N, Shibata S, Hiraoka K, Sutherland DE, Hering BJ. Small bowel subserosal space as a site for islet transplantation and local drug delivery. *Transplant Proc*, 2001; 33(1-2): 1710.

Sakonju I, Taura Y, Nakaichi M, Nakama S, Kagabu S. Intrauterine transplantation of isogenic pancreatic islets in experimental diabetic rats. *J Vet Med Sci*, 1994; 56(4): 729-33.

Samols E, Weir GC. Adrenergic modulation of pancreatic A, B and D cells. *J Clin Invest* 1979; 2: 415-416.

Sandler S, Jansson L. Blood flow measurements in pancreatic islets of the rat. Impairment of the blood perfusion of the graft during hyperglycemia. *J Clin Invest*, 1987; 80:17-20.

Sarvetnik N, Liggitt D, Pitts SL, Hansen SE, Stewart TA. Insulin-dependent diabetes mellitus induced in transgenic mice by ectopic expression of class II MHC and interferon gamma. *Cell*, 1988; 52: 773-782.

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

Shapiro J, Lakey J, Ryan E, Korbitt G, Toth E, Warnock G, Kneteman N, Rajotte R. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med*, 2000; 343: 230-238.

Somoza N, Vargas F, Roura-Mir C, et al. Pancreas in recent onset insulin dependent diabetes mellitus: Changes in HLA, Adhesion molecules and autoantigens, Restricted T cell receptor V $\beta$  usage and cytokine profile. *J.Immunol*, 1994; 153:1360-1377.

Soria B, Roche E, Berna G, León-Quinto T, Reig JA, Martín F. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes*, 2000; 49: 157-162.

Soria B. In-vitro differentiation of pancreatic beta-cells. *Differentiation*, 2001; 68 (4-5): 205-19.

Sospedra M, Ferrer-Francesch X, Dominguez O, Juan M, Foz-Sala M, Pujol-Borrell R. Transcription of a broad range of self-antigens in human thymus suggests a role for central mechanisms in tolerance toward peripheral antigens: *J Immunol*, 1998; 161:5918-29.

Springer, TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell*, 1994; 78: 301-314.

Stevens RB, Ansite JD. Expression of intrahepatic inducible nitric oxide synthetase mRNA correlates with production of nitric oxide during intraportal isogenic and allogenic rat islet transplantation. *Transplant Proc*, 1994; 27(1): 615-616.

Stevens RB, Ansite JD. Nitric oxide mediates early dysfunction of rat and mouse islets after transplantation. *Tranplantation*, 1996; 53: 407-414.

Tisch R and McDevitt H: Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* 35:291-297, 1996.

Tobin BL, Finegood DT. Reduced insulin secretion by repeated low doses of STZ impairs glucose effectiveness but does not induce insulin resistance in dogs. *Diabetes*, 1993; 42(3):474-83.

Tochino Y. Discovery and breeding of the NOD mouse. *Insulinitis and type I diabetes. A: Lessons from the NOD mouse.* S. Tarui, Y. Tochino, K. Nonaka (Eds). Academic Press. Tokio, 1986: p. 3-10.

Tze WJ, Tai J. Intracerebral allotransplantation of purified pancreatic endocrine cells and pancreatic islets in diabetic rats. *Transplantation*, 1984; 38(2):107-111.

Vaifler NJ. Etiology and pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *A: Textbook of rheumatology.* WN Kelley, ED Harris, S Ruddy, CB Sledge (Eds). WB Saunders, Philadelphia, 1981: p. 1079-1105.

Van der Vliet JA, Navarro X, Kennedy WR. The effect of pancreas transplantation on diabetic polyneuropathy. *Trasplantation*, 1988; 45: 185-188.



Van Suylichem PT, Strubbe JH, Houwing H, Wolters GH, Van Schilfgaarde R. Rat islet isograft function. Effect of graft volume and transplantation site. *Transplantation*, 1994; 57(7): 1010-7.

Vargas F, Vives-Pi M, Somoza N, Armengol P, et al. Endotoxin contamination may be responsible for the unexplained failure of human pancreatic islet transplantation. *Transplantation*, 1998; 65(5): 722-727.

Vargas F, J. F. Julián, J. F. Llamazares, F. Garcia-Cuyàs, M. Jiménez, R. Pujol-Borrell, M. Vives-Pi. Engraftment of islets obtained by collagenase and Liberase in diabetic rats: a comparative study. *Pancreas* 23:406-13, 2001.

Viberti G. Diabetes mellitus: a major challenge in transplantation. *Transplant Proc*, 2001; 33(5A):3S-7S.

Vives M, Somoza N, Soldevila G, et al. Re-evaluation of autoantibodies to islet cell membrane in insulin dependent diabetes: failure to detect islet cell surface antibodies using human islet cells as substrate. *Diabetes*, 1992; 41: 1624-1631.

Vives-Pi M, Somoza N, Vargas F, et al. Expression acid decarboxylase (GAD) in the cytoplasm of alpha, beta and delta cells in normal and diabetic human islets: implications for the pathogenesis of type I diabetes. *Clin. and exp. Immunol*, 1993; 92:391-396.

Vives-Pi M. ¿Cuál es la base molecular de la reacción autoinmune en la diabetes tipo I? A: *Diabetes 2000-1*. Ed. Ramon Gomis. Apogeo, Barcelona. pp34-36, 2000.

Vives-Pi M, N. Somoza, F. Vargas, R. Pujol-Borrell: Overexpression of MHC proteins in pancreatic islets: a link between cytokines, viruses, breach of tolerance and Insulin Dependent Diabetes Mellitus. A: G. E. Blair, C.R. Pringle and D.J. Maudsley (Eds), *Modulation of MHC Antigen expression and disease*. Cambridge University Press, 1995, pp. 361-389.

Vives-Pi M, Vargas F, James RFL, et al. Proteasome subunits, low-molecular-mass polypeptides 2 and 7 are hyperexpressed by target cells in autoimmune thyroid disease but not in IDDM. *Tissue Antigens*, 1997; 50:153-163.

Vives-Pi M, Sarri Y, Conget I, Somoza N, Alcalde L, Armengol P, Fernández J, Lorenzo C, Martí M, Soldevila G, Usac EF, Mañalich M, Gomis R, Pujol-Borrell R. Human islet function after automated isolation and bovine serum albumin gradient purification. *Transplantation* 1992; 53: 243-5.

Vyse TJ, Todd JA: Genetic analysis of autoimmune disease. *Cell*, 1996; 85:311-318.

Warnock GL, Rajotte RV. Critical mass of purified islets that induce normoglycemia after implantation into dogs. *Diabetes*, 1988; 37: 467-470.

Weir GC, Bonner-Weir S, Leahy JL. Islet mass and function in diabetes and transplantation. *Diabetes* 1990; 39: 401-405.

Weir GC, Bonner-Weir S. Islets of Langerhans: The puzzle of intraislet interactions and their relevance to diabetes. *J. Clin. Invest.* 1990a; 85: 983-987.

Wicker LS, Todd JA, Peterson LB. Genetic analysis of autoimmune diabetes in the NOD mouse. *Annu. Rev. Immunol*, 1995; 13:179-200.

Wong FS, Dittel BN, Janeway Jr CA. Transgenes and knockout mutations in animal models of type 1 diabetes and multiple sclerosis. *Immunological Reviews*, 1999; 169: 93-106.

Yang H, Wright JR. Co-encapsulation of Sertoly enriched testicular cell fractions further prolongs fish-to-mouse islet xenografts survival. *Transplantation*, 1999; 67: 815-20.

Yasunami Y, Lacy PE, Finke EH. A new site for islet transplantation: a peritoneal-omental pouch. *Transplantation*, 1983; 36(2): 181-2.

Yoon JW, Austin M, Onodera T, Notkins AB. Virus-induced diabetes mellitus: isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis. *N Eng J Med*, 1979; 300: 1173-9.

## X. ARTICLES I COMUNICACIONS

A. Luna, JF. Julián, A. Alba, R. Colobran, F. García-Cuyás, MT. Fdez-Figueras, R. Pujol, MA. Broggi, JF. Fdez-Llamazares, M. Vives-Pi. **Trasplante de islotes pancreáticos en vesículas seminales de ratas diabéticas.**

Presentat com a pòster al "VI Congrés de la Societat Catalana de Trasplantament", a Barcelona al Gener de 2001.

A. Luna, JF. Julián, A. Alba, R. Colobran, F. García-Cuyás, MT. Fdez-Figueras, R. Pujol, MA. Broggi, JF. Fdez-Llamazares, M. Vives-Pi. **Islet transplantation in seminal vesicles restores glycemia in diabetic rats: a preliminary study.** *Trasplantation Proceedings*, 2002; 34: 196-199.

A. Luna, JF. Julián, M. Vives-Pi, A. Alba, F. García-Cuyás, E. Herrero, R. Pujol, MA. Broggi, JF. Fdez-Llamazares. **Trasplante de islotes de Langerhans en vesículas seminales de ratas singénicas.**

Presentat com a comunicació oral al "XXIV Congreso Nacional de Cirugía", a Madrid al Novembre de 2002.

## ABREVIACIONS

<b>BB</b>	Biobreeding
<b>Con A</b>	Concanavalina A
<b>Desv. Est.</b>	Desviació estàndar
<b>DMID</b>	Diabetis mellitus insulinodepenent
<b>DM</b>	Diabetis mellitus
<b>DNA</b>	Àcid desoxirribonucleic
<b>DTZ</b>	Ditizona
<b>Glc</b>	Glicèmia
<b>ICA</b>	I slet Cell Antibodies
<b>iNOS</b>	Enzim sintetasa de l'òxid nítric
<b>LETL</b>	Long Evans Tokushima Lean
<b>MHC</b>	Complexe Major d'Histocompatibilitat
<b>NOD</b>	Non Obese Diabetic
<b>NOR</b>	Non Obese Diabetic Resistant
<b>NO</b>	Òxid nítric
<b>RNA</b>	Àcid ribonucleic
<b>RER</b>	Reticle endoplasmàtic rugós
<b>STZ</b>	Estreptozotocina