

XENOTRASPLANTE DE ISLOTES PORCINOS MICROENCAPSULADOS EN PERROS DIABÉTICOS TIPO I

Dr. Adrián Gustavo Abalovich (1) (3) (4)

Dra. Susana Lopez (2)

Dra. Liliana Doglia (2)

Sr. José Motola (2)

1: Servicio de cirugía del Hospital Interzonal Gral de agudos Eva Perón

2: Sector de endocrinología del Laboratorio Central del Hospital Interzonal Gral de agudos Eva Perón

3: Escuela de ciencia y tecnología de la Universidad Nacional de San Martín

UNSAM

4: Instituto de investigaciones cardiológicas, Fac. Medicina, UBA, Conicet

Resumen:

ANTECEDENTES: El xenotrasplante de islotes porcinos representa una atractiva forma de vencer el problema de la escasez de órganos humanos. En este protocolo, implantamos un número bajo de islotes porcinos microencapsulados en alginato-poli-lisina, en perros diabéticos insulino dependientes.

OBJETIVO: Evaluar si es posible lograr el control metabólico de la enfermedad.

LUGAR DE APLICACION: Hospital Interzonal Gral. de Agudos Eva Perón de San Martín, Universidad nacional de San Martín (UNSAM) e Instituto de Investigaciones Cardiológicas, Facultad de Medicina, UBA, Conicet.

DISEÑO: Prospectivo experimental.

POBLACION: Cinco perros espontaneamente diabéticos insulino dependientes.

METODO: Los páncreas se obtuvieron de cerdos adultos. Los islotes fueron aislados en colagenasa sin purificación. La encapsulación se realizó por el método de Sun. Se implantaron 5.000 IsloteEquivalente/kg microencapsulados en alginato (Keltone ®,UK) al 1.6 % . Insulinemia y hemoglobina glicosilada cada 3 y 4 meses ,fueron dosadas La glucemia se detectó 2 veces al día luego de la comida matinal y nocturna.

RESULTADOS: Un significativo descenso en las necesidades de insulina fué detectado. ($p \leq 0.01$). Luego de 6-12 meses del trasplante, la insulinemia mejoró significativamente. ($p \leq 0.05$). La Hemoglobina glicosilada también mostró un descenso significativo ($p \leq 0.01$).

CONCLUSIONES: La mejoría observada, nos llevan a proponer al implante de

islotes porcinos microencapsulados como una vía complementaria a la insulino-terapia para lograr mejorar el control metabólico de la enfermedad sin el riesgo de la inmunosupresión.

Palabras claves: diabetes tipo I- islotes porcinos-microencapsulación.

Introducción:

El problema de la diabetes

La diabetes (DBT) es una enfermedad caracterizada por la presencia de hiperglucemia resultante de un defecto en la secreción de insulina, en la acción de la misma o en ambos. Se clasifica en dos tipos:

Tipo 1 -antes llamada “diabetes insulino dependiente” o “diabetes juvenil”- es el resultado de la destrucción de las células beta del páncreas por un fenómeno autoinmune, presenta tendencia a la cetosis y constituye el 15% de los casos de DBT.

Tipo 2 - antes llamada “diabetes no insulino dependiente” o “diabetes del adulto”- se caracteriza por insulinoresistencia asociada a insulinoopenia en grado variable y representa el 85% de los pacientes diabéticos.

El Congreso de la Asociación Europea para el estudio de la Diabetes, Copenhague 2006, calculó para el año 2007 en 240 millones el número total de diabéticos, con un crecimiento de 7 millones por año.

En Argentina se estima una prevalencia del 7 % (aproximadamente unos 2.800.000 enfermos diabéticos) (1).

A partir del aumento de la esperanza de vida de los pacientes diabéticos, adquiere gran importancia la calidad de vida, la que se ve afectada por las complicaciones tardías de la enfermedad. Estas complicaciones son, principalmente, la nefropatía, la oftalmopatía, la vasculopatía y la neuropatía.

La nefropatía diabética se halla en el 32,9 % de los pacientes recién diagnosticados (1) y representa el 24,4 % de las causas de enfermedad renal

terminal que lleva a la diálisis y al trasplante renal. La oftalmopatía diabética representa la principal causa de ceguera entre los jóvenes. Con respecto a la vasculopatía, el 22% de los diabéticos recién diagnosticados presenta enfermedad cardiovascular y el 12,5 % enfermedad vascular periférica; asimismo, la diabetes incrementa el riesgo de infarto de miocardio, amputación de miembros inferiores y muerte por causa cardiovascular.

Los costos generados por la enfermedad son altísimos. Se calcula que representan entre el 5 y el 10 % del presupuesto total en salud. En los EEUU, el costo anual directo e indirecto originado por la enfermedad excede los 90 billones de dólares. En la Argentina, en 1997, el costo por atención integral de un paciente diabético no complicado oscilaba en los 1000 dólares al año (2). Todos estos datos reflejan el enorme costo en salud que esta enfermedad origina, enfermedad cuya incidencia aumenta entre 3 y 4 puntos por año.

Trasplante de islotes pancreáticos

El descubrimiento y posterior utilización clínica de la insulina permitió suponer que la curación completa de la diabetes se había alcanzado. Sin embargo, si bien la enfermedad dejaba de ser mortal, la cronicidad de la misma permitió observar el deterioro progresivo de diferentes órganos tales como riñones, retina, aparato cardiovascular y sistema nervioso.

La alteración de estos tejidos se produce por la imposibilidad de alcanzar un control metabólico perfecto mediante la administración exógena de la insulina, control que solamente puede ser logrado por el islote pancreático. Las células beta de los islotes, son estructuras capaces de detectar cambios en la concentración de la glucosa en sangre, para verter a la misma la cantidad exacta de insulina que se requiere.

Por lo tanto, es lógico pensar que el implante de islotes pancreáticos en un paciente diabético tipo I, representaría la solución ideal para lograr el control metabólico. Este implante puede lograrse a partir del trasplante de todo el páncreas o bien del 1% de este órgano representado por los islotes pancreáticos. El trasplante de islotes siempre fue comparado con el trasplante de páncreas, observándose la ventaja de evitar el implante del tejido acinar -inútil en un paciente con diabetes- y de poder realizarse sencillamente por la punción del sistema portal.

Sin embargo, y pese a estas ventajas, hasta el año 2000 los resultados del trasplante de islotes frente al trasplante de páncreas total han sido enormemente inferiores. Hasta esa fecha, la reversión de la diabetes al año del implante de los islotes se lograba en solo el 11% de los trasplantados (3), contra el 80% observado al año del trasplante de páncreas.

Hering (4) planteó diversas causas como responsables de los pobres resultados obtenidos. Entre las mismas se destacan: 1) baja masa de islotes implantados, 2) alta demanda metabólica y 3) reacción inmunológica al trasplante.

La mayoría de estos trasplantes se realizaba en simultáneo o *a posteriori* de un trasplante renal en aquellos pacientes diabéticos tipo I con falla renal terminal. En estos casos se aprovechaba de la inmunosupresión a la que obligaba el

trasplante de riñón. Los islotes pancreáticos se obtenían de uno o varios páncreas de donantes cadavéricos a través de un complejo sistema, perfeccionado en 1988 (5), que permitió mejorar el número y la calidad de islotes aislados. Esto contribuyó al aumento del número de trasplantes realizados.

Según el *International Islet Transplant Registry*, entre 1990 y 1999 se efectuaron 237 trasplantes en diabéticos con péptido C menor a 0,5 ng/ml., obteniéndose la insulinoindependencia al año del implante en el 11% de los pacientes y la sobrevida del injerto al año en el 46% de los casos (3). Como comentamos anteriormente, estos resultados difieren en mucho de los obtenidos luego del trasplante vascularizado de páncreas.

En el año 2000, el grupo Canadiense de Edmonton encabezado por Shapiro (6), publica su experiencia en siete diabéticos tipo I trasplantados con islotes, lográndose la reversión de la enfermedad en todos ellos con un seguimiento medio de 11,9 meses. En esta serie, los pacientes no se encontraban en falla renal crónica sino que presentaban severas hipoglucemias o inestabilidad metabólica que no respondía a la insulina exógena.

Una de las modificaciones introducidas en este protocolo en relación a los anteriores, consiste en un régimen inmunosupresor sin el uso de los corticoides. Los mismos son reconocidos hiperglucemiantes y podrían generar, en etapa precoz del implante, el deterioro de los islotes.

Por cada paciente se requirió el procesamiento de 2 a 4 páncreas para obtener islotes que fueron implantados secuencialmente en los espacios porta por vía percutánea guiada por fluoroscopia.

Con respecto a los resultados, repetimos que en todos ellos se alcanzó la insulino-independencia con valores de hemoglobina glicosilada normales.

El *International Islet Transplant Registry* presentó en el año 2002 en el Congreso Mundial de Trasplantes, en Miami (7) una actualización de los resultados que evidenciaron la insulinoindependencia a un año del trasplante en 28 de 35 pacientes (80%) con el protocolo de Edmonton, resultado similar al que se obtiene con el trasplante de órgano vascularizado.

Los islotes, frescos o cultivados, son inyectados por vía percutánea al sistema portal bajo anestesia local con una internación de 12 a 24 horas.

Problemas actuales con el trasplante de islotes y soluciones propuestas

Recientemente, publicaciones del *Instituto de Inmunología y Trasplantes* de la Universidad de Minnesota y del *Diabetes Research Institute* de la Universidad de Miami, nos informan que la insulinoindependencia al año del implante en estos centros alcanzó el 90 % de los pacientes, pero con un gradual deterioro del funcionalismo del implante a partir del segundo y tercer año post trasplante (8, 9). Una de las causas postuladas para explicar este fenómeno es el alto número de islotes que se pierden en el período inmediato al trasplante debido a fenómenos trombóticos e inflamatorios al contactar los islotes con la sangre del receptor. El escaso número de islotes sobrevivientes, junto a la pérdida de la capacidad de la neogénesis (de 250.000 islotes por año), hace que al segundo o tercer año queden escasos islotes funcionantes en el receptor.

Se han realizado varias críticas al protocolo de Edmonton. Entre ellas se ha remarcado que, frente al trasplante de páncreas vascularizado, presenta como un

gran inconveniente la necesidad de utilizar dos a tres páncreas para revertir la enfermedad de un solo paciente diabético. Este problema adquiere relevancia cuando se toma en cuenta la desproporción entre el número de órganos disponibles para el trasplante y el número de enfermos con diabetes. Cada año en los EEUU aparecen 5000 donantes con muerte cerebral frente a 30.000 nuevos casos de diabetes tipo I en el mismo período (2).

Este problema se ve agravado por la necesidad de utilizar mediante este procedimiento, de dos o más páncreas para el tratamiento de un solo paciente diabético.

Es por ello que se encuentran en pleno desarrollo diferentes líneas de investigación tendientes a aumentar la disponibilidad de islotes para el trasplante o bien disminuir la necesidad de islotes a transplantar.

Para aumentar la disponibilidad de islotes se trabaja en líneas de expansión de células beta (10) y en la utilización de animales como dadores de órganos (xenotrasplante) (11).

Otra estrategia para permitir el acceso de todos los diabéticos tipo I al implante consiste en evitar la inmunosupresión. Con tal fin, se trabaja en lograr la tolerancia inmunológica del receptor (12), en la creación de animales transgénicos humanizados (13) y en la *inmunoprotección de los islotes (páncreas bioartificial)* (14).

Entre las formas conocidas de páncreas bioartificial encontramos el sistema de microencapsulación. Este sistema se basa en la formación de pequeñas cápsulas menores a 1 mm. que rodean a uno o varios islotes y que presentan poros en su superficie de tamaño tal que impide el contacto con los islotes de ciertos elementos del sistema inmune tales como los linfocitos y los anticuerpos.

El material mas utilizado en la microencapsulación de islotes es un polisacárido obtenido de las algas denominado alginato.

En síntesis, luego del protocolo de Edmonton la historia del trasplante de islotes de páncreas ha sufrido un vuelco significativo. En algunos centros, los resultados al año, son equiparables al del trasplante de órgano vascularizado con menor morbimortalidad. No obstante, si bien este protocolo ha demostrado ser de gran ayuda a los diabéticos poseedores de una diabetes tipo I lábil, para extender el procedimiento a todos los tipos de diabéticos, se requiere de la elaboración de estrategias que permitan superar los problemas enunciados.

En otras palabras: el trasplante de islotes de acuerdo al protocolo de Edmonton presenta tres puntos negativos que deben considerarse: la escasez de páncreas humanos disponibles en relación al número de diabéticos, la necesidad de inmunosuprimir al receptor y el deterioro del implante entre el segundo y tercer año post trasplante.

Como líneas propuestas para la resolución del problema de la escasez de órganos mencionamos:

- El xenotrasplante (trasplante de órganos de especies diferentes, ej: cerdo-humano)
- Generación de islotes a partir de células madre adultas o embrionarias del mismo paciente o de un dador.
- Creación de mecanismos que resuelvan la autoinmunidad que causa la diabetes tipo I, para luego estimular la generación de nuevos islotes a partir de células precursoras de islotes del páncreas del propio paciente.

Xenotrasplante de islotes porcinos

La utilización de islotes porcinos para curar la diabetes del humano ha sido y es motivo de investigación en grupos de renombre mundial. La insulina porcina es muy parecida a la humana y el islote responde a la hiperglucemia igual al islote humano. Además los islotes de cerdo representarn una fuente prácticamente inagotable de células beta.

Sin embargo, el problema de rechazo que los antígenos del cerdo generan en un humano aún no han sido resueltos. Para vencer este problema, diversos investigadores trabajan encapsulando islotes porcinos con el fin de evitar el rechazo que el sistema inmune humano produce apenas es expuesto a células de cerdo evitando la inmunosupresión crónica (17, 18,19).

Otro de los inconvenientes que presenta el xenotrasplante es el riesgo de transmisión de agentes infecciosos. El cerdo tiene un retrovirus endógeno (PERV : "porcine endogenous retrovirus") con 60% de homología con el "gibbon ape leukemia virus". Sin embargo, la transmisión del PERV de islotes fetales porcinos a humanos ha sido negativa (20).

Por lo tanto, la microencapsulación de islotes porcinos, representaría una estrategia apta para resolver los principales problemas que impiden que el trasplante de islotes se convierta en la piedra angular del tratamiento de todos los pacientes diabéticos tipo I.

Objetivos:

El xenotrasplante de islotes porcinos, representa una atractiva forma de resolver el problema de la escasez de órganos humanos para el trasplante insular.

Los islotes porcinos son muy estudiados para el xenotrasplante, principalmente por la similitud entre la insulina de cerdo y la humana.

Para evitar el rechazo inmunológico inmediato de las células de cerdo, diversas estrategias se han desarrollado entre las que encontramos la microencapsulación.

La microencapsulación es un procedimiento mediante el cual, diversas estructuras son rodeadas de un material biocompatible que otorga inmunoprotección parcial a la estructura a la cual cubre.

En cuanto a la diabetes mellitus en perros, presenta una prevalencia en Gran Bretaña de un 0,32 %, generándose por una lenta disfunción de la célula beta que se asemeja a la diabetes autoinmune del humano (21).

Por lo tanto los perros diabéticos, se nos presentan como un modelo adecuado para efectuar una fase preclínica del xenotrasplante de islotes porcinos.

El objetivo de este trabajo, es el de reportar los datos preliminares de esta etapa preclínica del xenotrasplante de islotes porcinos microencapsulados, implantados en perros espontáneamente diabéticos.

Material y métodos:

Aislamiento de islotes

Los páncreas fueron obtenidos del frigorífico de animales de entre 100 y 150 kilos. El método utilizado para el aislamiento se basa en el descrito por Camilo Ricordi previamente modificado por nuestro equipo (22).

Luego de la antisepsia correspondiente y una exanguinación parcial, se realizó la pancreatometomía total a través de una incisión mediana (foto 1). El páncreas se trasladó en solución de Hanks

(Sigma Chemical Co., St Louis, Mo) suplementada con: 0,25% BSA (fracción V Sigma Chemical Co., St Louis, Mo) 10 mmol/L Hepes (Sigma Chemical Co., St Louis, Mo) , 100UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina, a 5 ° C de temperatura, al laboratorio de aislamiento y cultivo y bajo flujo laminar, se cortó en pequeños trozos de 1 mm.de espesor (foto 2). El tiempo de isquemia caliente y fría fue de 5 y 10 minutos respectivamente. A estas pequeñas porciones pancreáticas dentro de un tubo Falcon de 50 ml , se les agregó colagenasa (colagenasa P, Roche Indianápolis) a una concentración de 2,5 mg/ml. El páncreas se digirió en un baño termostático a 37°C durante 18 minutos. Luego se filtró a través de una malla de acero inoxidable de 500 micrones. Luego de la filtración, el material se lavó tres veces en solución de Hanks suplementado (0,25% BSA (fracción V Sigma Chemical Co., St Louis, Mo) 10 mmol/L Hepes

(Sigma Chemical Co., St Louis, Mo) , 100UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina) a 190 G durante 2 minutos cada lavado. Luego se cultivó el tejido en Ham`s F12 (*Life Technologies*, Grand Island NY) suplementado con 10 mmol/l de glucosa, 10 µmol/l de 3 isobutyl-1-methylxanthine (Sigma, St. Louis, MO), 2 mmol/l de L-glutamina (Sigma St. Louis, MO), 10 mmol/l de nicotinamida (Sigma St. Louis, MO), 25 mg/l de CaCl₂ (Sigma St. Louis, MO), 0,5 % de BSA (Sigma St. Louis, MO) , 100UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina.

El suero fue omitido debido a su capacidad de promover fibroblastos y células pancreáticas exócrinas, la albúmina fue seleccionada como sustituto del suero, IBMX fue usado por su capacidad para estimular la síntesis de ADN en islotes de ratas, la glucosa por su acción en la replicación de células β y la nicotinamida por su habilidad para estimular la replicación del ADN de las células de los islotes

El material se cultivó en cuatro botellas plásticas de 50 ml c/u durante 7 días con cambio de medio en los días 2, 4 y 6.

Alícuotas se tomaron del material aislado para la evaluación de morfología, pureza y viabilidad.

Pretratamiento

Este procedimiento para reducir el número de cápsulas imperfectas, se basa en la descripción de Weber y colaboradores (23). Esta técnica que embebe los islotes en alginato y cloruro de calcio, forma una fina película de alginato alrededor de cada islote.

Microencapsulación

Islotes aislados (5000 IE/kg peso perro), se mezclaron con alginato de baja viscosidad al 1,6% (Keltone ®, SI, UK) en Ca²⁺ KRH (Krebs ringer hepes) (relación islote/alginato= 1:10) .

La solución de alginato se convierte en cápsulas utilizando un sistema generador de cápsulas por aire (24).

La microencapsulación se efectuó de acuerdo a la técnica de Lim y Sun (25).

En el día 7 de cultivo, se extrajeron los islotes de los frascos (Fotos 14 y 15) y se lavaron en solución de Krebs-Ringer libre de calcio (KRH s/ Ca).

Luego los mismos se mezclaron con Alginato (Keltone ®, SI, UK) de baja viscosidad, al 1,6 % en KRH s/Ca, en una relación 2 ml. de islote / 20 ml. de alginato . La mezcla se colocó en un tubo de 50 ml. donde se ubicó el extremo de la tubuladura de una bomba peristáltica (Harvard Co, Inc, USA). Se activó la bomba de acuerdo a la velocidad deseada y se prendió el compresor de aire (Harvard apparatus Co, Inc, USA) de acuerdo a la velocidad requerida. Las gotas cayeron en una solución de Cl₂Ca al 1,1% y se dejaron reposar 5 minutos. Luego las microcápsulas se extrajeron del Cl₂Ca y se lavaron dos veces en KRH s/Ca.

Posteriormente se incubaron durante 10 minutos en una solución de Poli-L-Ornitina (Sigma, mw:17 kD) al 0,12 % en solución salina isotónica. Luego se cultivaron en 5,5 mM de PIPES (Sigma) pH: 7,4 en salina isotónica durante 4 minutos previo a una segunda incubación en poli-L-ornitina 0,04 % por 6 minutos. Luego se lavaron dos veces en KRH s/Ca y se incubaron con alginato al 0,04%. Las cápsulas obtenidas nuevamente se lavaron en KRH s/ Ca y se expusieron a citrato de sodio (Sigma) 55 mM por 6 minutos.

Finalmente se lavan en KRH con Ca y se dejaron reposar en el mismo por 5 minutos. Luego se extrajo el sobrenadante y se lavó en RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St Louis, Mo) . Por último se retiró el sobrenadante y se agregó el RPMI para sembrar en botellas de cultivo de 50 ml.

Finalmente las cápsulas alcanzaron un diámetro de 700 μm (foto) con un poro de 70 kDa. Las microcápsulas se cultivaron en RPMI con 10 % de suero fetal bovino en 5 % CO_2 de aire y temperatura de 37°C durante 36 hs.

La viabilidad de los islotes fue confirmada antes del trasplante con azul de tripano. Islotes con viabilidad por debajo del 80 % fueron descartados.

Las microcápsulas luego del cultivo se colocaron en jeringas de 60 ml. con RPMI y se transportaron en frío al lugar del trasplante.

Pacientes

Los perros diabéticos fueron provistos por el servicio de endocrinología de la facultad de veterinaria de la Universidad de Buenos Aires. Los dueños firmaron el consentimiento informado y todos los procedimientos fueron revisados por un comité de ética.

Los perros se encontraban en buen estado de salud y presentaban al menos un año de evolución de su enfermedad tratada con insulina glargina.

Implante

Todos los animales se encontraban libres de insulina, desde 24 hs. antes del implante.

Bajo sedación con Ketamina (0.3 mg./kg peso) un abocath 14 G fue insertado en la cavidad abdominal del receptor. Previamente, sangre venosa se obtuvo de una vena periférica para determinación de insulina por quimioluminiscencia (Abbot laboratories) y hemoglobina glicosilada por ITD method (Abbot laboratorios).

En el seguimiento, la glucemia se registró dos veces al día previo a la comida matinal y nocturna con un sistema de monitoreo de glucemia (precision QID® Abbot laboratories Argentina), insulina plasmática cada 3 meses (los animales no recibieron insulina desde 36 hs.antes del estudio) y hemoglobina glicosilada cada 4 meses durante 15 meses.

Las dosis diarias de insulina fueron calculadas para obtener glucemias menores de 180 mg/dl.

Análisis estadísticos

Los resultados se expresaron como media \pm SD. Los análisis estadísticos se realizaron mediante la prueba de two tailed paired t test con una significación de $p \leq 0,05$.

Resultados:

Como se observa en la tabla 1, se evidenció una significativa disminución de las necesidades de insulina ($p \leq 0.01$).

La disminución varió de un 20 % a un 80 %.

Luego de 6-12 meses del implante, la insulina plasmática aumentó significativamente ($p \leq 0.05$).

La hemoglobina glicosilada observó un significativo descenso ($p \leq 0.01$).

Los dueños de todos los perros expresaron que observaban a sus mascotas mas alertas y activas.

El único efecto adverso observado en los perros 1 y 2 inmediatamente luego del implante y 15 días después en el perro 3, fue una distensión abdominal con ileo paralítico que revirtieron espontáneamente a las 48 hs.

Conclusión:

El trasplante de islotes humanos se encuentra restringido por la escasez de órganos.

El xenotrasplante de islotes porcinos microencapsulados, se presenta como una posibilidad para solucionar este problema.

En nuestro trabajo, en fase preclínica, hemos trasplantado islotes porcinos microencapsulados en alginato-polilisina, a perros espontáneamente diabéticos teniendo como hipótesis que los islotes actuarían como fábricas inteligentes de insulina, mejorando el control metabólico de la enfermedad.

En los cinco perros se registró un descenso en las necesidades de insulina durante el primer mes del trasplante, que se acentúa a partir del mes 6 al 12.

La determinación de la insulina plasmática confirma la producción de la hormona desde las células implantadas.

Dado que el método no puede detectar insulina canina, nuestra hipótesis es que el progresivo aumento en la concentración de la insulina a partir del sexto mes, se debió a la neogénesis de islotes producida desde el tejido exócrino dado que el grado de purificación osciló entre el 60 y el 80 %. Este dato puede tener una importante implicancia clínica si el tejido acinar facilita la neogénesis y aumenta el tiempo de insulino independencia o bien de control metabólico.

Hering (26), sugiere que una de las causas que limita la supervivencia del trasplante es la falla de la neogénesis de islotes por una inadecuada masa de precursores de islotes en el implante.

Relacionado al trasplante de islotes microencapsulados, diferentes resultados han sido publicados. Sun y col. (27) pudieron revertir la diabetes en monos durante 804 días a diferencia de Weber y col. (28) quienes refieren en ratas diabéticas una cura post trasplante de solo 15 días.

Sin embargo, los autores mencionados, no comentan la evolución de los animales que revirtieron parcialmente su enfermedad.

Los cambios en nuestros perros trasplantados, con mejoría en su control metabólico (hemoglobina glicosilada) y reducción en los requerimientos de insulina, luego del trasplante, nos llevan a proponer al xenotrasplante de islotes porcinos microencapsulados como una vía para alcanzar la mejoría de la enfermedad sin el riesgo asociado de la inmunosupresión.

Este tratamiento bien podría realizarse en forma complementaria a la insulino terapia, para aquellos pacientes que con la hormona no puede lograr un adecuado control de la enfermedad.

Este implante podría realizarse cada 6 -12 meses en relación al tiempo de duración de los islotes.

Si bien estos resultados son preliminares, permiten una visión diferente del xenotrasplante de islotes microencapsulados para mejorar el control de la diabetes tipo I.

Agradecimientos:

Al Dr. Milei por ceder los laboratorios del Instituto de Investigaciones Cardiológicas, al Dr. Grana por colaborar con la evaluación estadística, al Dr. Castillo por seleccionar los animales diabéticos para el estudio y colaborar con el seguimiento de los mismos , al Dr. Siciliano por la colaboración en el proceso de microencapsulación y al Sr.Marcelo Hafner por la impresión de los ejemplares.

Bibliografía:

- 1) Sereday M, Martí M. Epidemiología de la diabetes en Latinoamérica en Diabetes Mellitus, M. Ruiz, Tercera edición. Ed. Akadia, cap.2, 2004.
- 2) Gagliardino JJ. Aspectos socioeconómicos de la Diabetes Mellitus, en Diabetes Mellitus, M. Ruiz, Tercera Edición. Ed. Akadia, cap.43, 2004.
- 3) International Islet Transplant Registry (Newsletter 9), 2001; 8:10.
- 4) Hering B, Ricordi C. Islet transplantation for patients with type I diabetes. *Graft* 1992; 2: 12-27.
- 5) Ricordi C, Lacy P, Finke E. Automated method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes* 1988; 37: 413-420.
- 6) Shapiro A, Lakey J, Ryan E. Islet transplantation in seven patients with type I Diabetes Mellitus using a corticoid free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000; 343: 230-238.
- 7) Brendel M, Hering B, Schultz A. International islet transplant registry. XIX International Congress of the Transplantation Society, abstract 0336, Miami 2002.
- 8) Hering B. Achieving and maintaining insulin independence in human islet transplant recipients. *Transplantation* 2005; 79:1296-1297.
- 9) Ricordi C, Inverardi L, Kenyon N, Goss J, Bertuzzi F, Alejandro R. Requiriments for success in clinical islet transplantation. *Transplantation* 2005; 79: 1298-1300.
- 10) Serup P, Madsen O, Mandrup Poulsen T. Islet and stem cell transplantation for treating diabetes. *BMJ* 2001; 322: 29-32.

- 11) Groth C, Korsgren O, Tibell A. Transplantation of porcine fetal pancreas to diabetic patients. *Lancet* 1994; 344:1402-1404.
- 12) Ricordi C, Murase N, Rastellini C. Indefinite survival of rat islet allografts following infusion of donor bone marrow without cytoablation. *Cell Transplant* 1996; 5: 53-55.
- 13) Mc Curry C, Kooyman D, Alvarado C. Human complement regulatory proteins protect swine to primate cardiac xenografts from humoral injury. *Nat Med* 1995; 1: 423-427.
- 14) Abalovich A, Fretchel G. Pancreas bioartificial. *Revista de la Asociación Latinoamericana de diabetes* 2000; 8:176-182.
- 15) Hering BJ, Kandaswamy R, Harmon JV : Insulin independence after single donor islet transplantation in type 1 diabetes with hOKT3-1 (ala-ala), sirolimus and tacrolimus therapy. *Am J Transplant* 2001; Suppl 1: 180.
- 16) Cardona K, Korbitt G, Milas Z, Lyon J, Cano J, Jiang W, Bello H, Hacquoil B, Strobert E, Gangappa S, Weber C, Pearson T, Rajotte R, Larsen C: Long term survival of neonatal porcine islets in nonhuman primates by targeting costimulation pathways *Nat med* 2006: 12:304-306.
- 17) Weber C, Hagler M, Konieczny B, Chrysochoos J, Rajotte R, Lowry R. Encapsulates islet iso-allo and xenografts in diabetic nod mice. *Transplant Proc* 1995; 27: 3308-3311.

- 18) Lanza R, Kuhlreiber W, Ecker D, Marsh J, Chick W. Transplantation of porcine and bovine islets into mice without immunosuppression using uncoated alginate microspheres. *Transplant Proc* 1995; 27: 3321.
- 19) Calafiore R, Basta G, Luca G, Calvitti M, Guido L, Brunetti P. Grafts of microencapsulated pancreatic islet cells for the therapy of diabetes mellitus in non immunosuppressed animals. *Biotechnol Appl Biochem* 2004; 39: 159-164.
- 20) Elliot R, Escobar L, Garkavenko O, Croxson M, Schroeder A, Mc Gregor M, Ferguson G, Beckman N y Ferguson S. No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of encapsulated porcine islet xenografts. *Cell transplantation* 2000 ; 9: 895-901.
- 21) Catchpole B, Ristic JM, Fleeman LM, Davison LJ. Canine diabetes mellitus: can old dogs teach us new tricks? *Diabetologia*. 2005;48:1948-56.
- 22) Abalovich A, Mignone I, Susemihl C, Ricci C, Migliore S, Rodriguez R, Brignone C, Brignone J : Preparation of pig pure islets without using density Gradients. *Transplant Proc* 1995; 27(6) 3353.
- 23) Weber CJ, Safley S, Hagler M, Kapp J: Evaluation of graft-host response for various tissue sources and animal models . *Ann N Y Acad Sci* 1999; 875: 233-54.
- 24) Wolters G, Fritschy W, Gerrits D, Van Schilfgaarde R. A versatile alginate droplet generator applicable for microencapsulation of pancreatic islets. *J Applied Biomat* 1992 ; 3: 281-286.
- 25) Lim F, Sun AM. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* 1980; 210: 908-910.
- 26) Hering B Achieving and maintaining insulin independence in human islet transplant recipients. *Transplantation* 2005;79: 1296-1297.

- 27) Sun Y, Ma X, Zhou D, Vacek I, Sun A. Normalization of diabetes in spontaneously diabetic cynomolgus monkeys by xenografts of microencapsulated porcine islets without immunosuppression. *J Clin Invest* 1996; 98:1417-1422.
- 28) . Safley SA, Kapp LM, Tucker-Burden C, Hering B, Kapp JA, Weber CJ: Inhibition of cellular immune response to encapsulated porcine islet xenografts by simultaneous blockade of two different costimulatory pathways *Transplantation* 2005;79:409-418

Apéndice:

Tabla I. Variación en los requerimientos de insulina, hemoglobina glicosilada e insulina plasmática luego del xenotrasplante de los cinco perros diabéticos.

Perro	Peso (kg)	Insulina dosis pre-tx(a)	Insulina dosis post-tx mes 1	Insulina dosis post-tx mes 6-12	HbA1 pre-tx(b)	HbA1 post-tx (mes 8)	Plasma insulina pre-tx(c)	Plasma insulina post-tx (mes 9)
1	20	16 IU	13IU	11IU	6.8%	5.3%	□0.2 µU/ml	4.83 µU/ml
2	5	5IU	1IU	1IU	8%	6.8%	□0.2 µU/ml	6.60 µU/ml
3	6	5IU	4.5IU	3.5IU	6.3%	5.8%	□0.2 µU/ml	1.5 µU/ml
4	19	20IU	18IU	16IU	7.3%	6.7%	□0.2 µU/ml	2 µU/ml
5	6	6IU	5.5IU	4IU	6.8%	6.1%	□0.2 µU/ml	1.8 µU/ml
X ±		10.4		7.1±6.2	7.04	6.14± 0.63		3.35±2.26
SD		±7.09		comp to a	± 0.64	comp to b	0.2 ± 0	comp to c
p				p□0.01		p□0.01		p□0.05

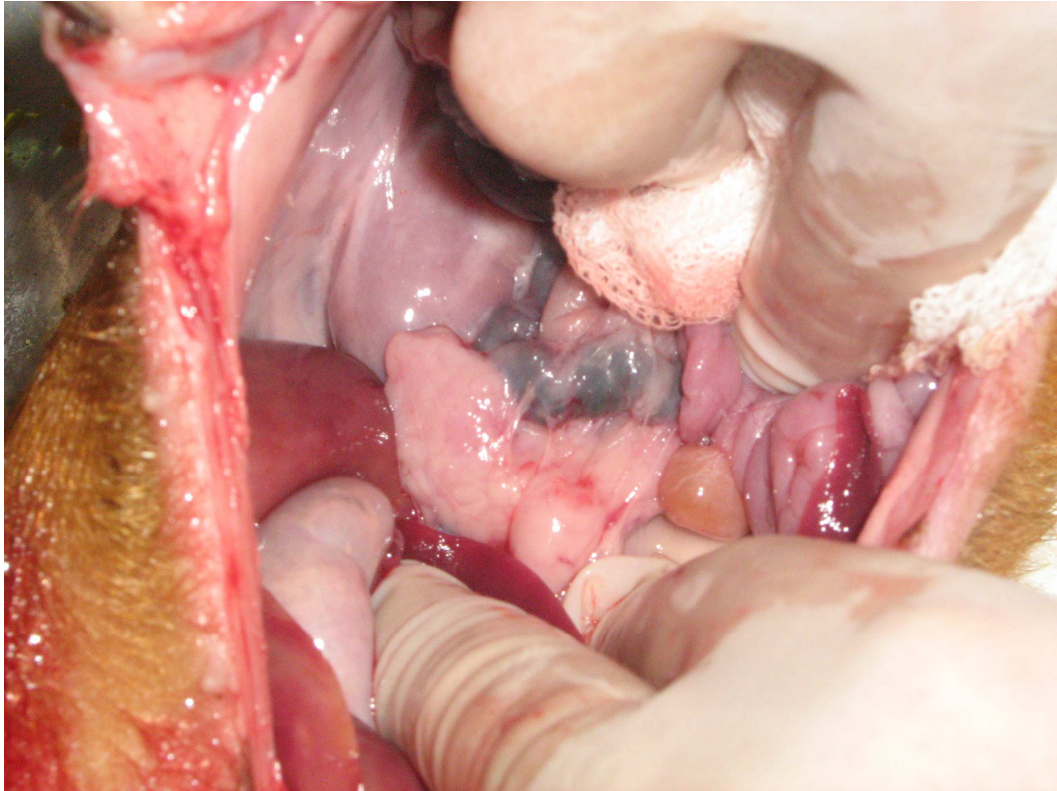


Foto I : páncreas porcino.



Foto II : aislamiento de islotes.

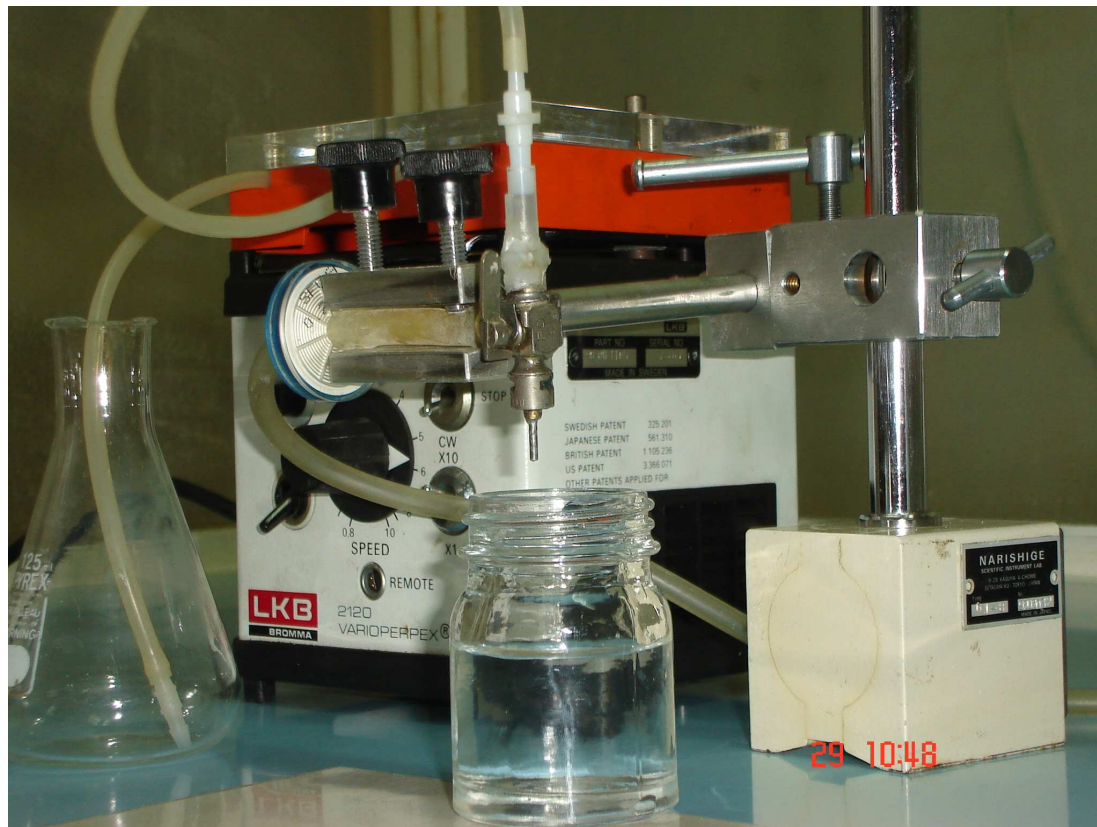


Foto III : sistema de microencapsulación (air jet sistem).

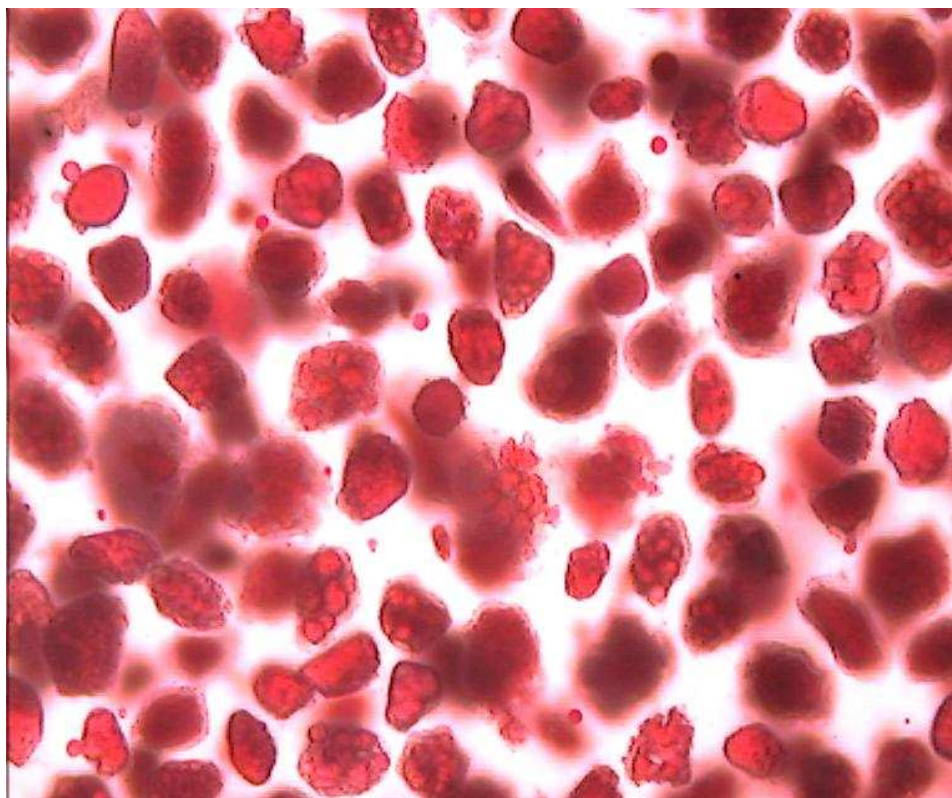


Foto IV : islotes porcinos aislados.

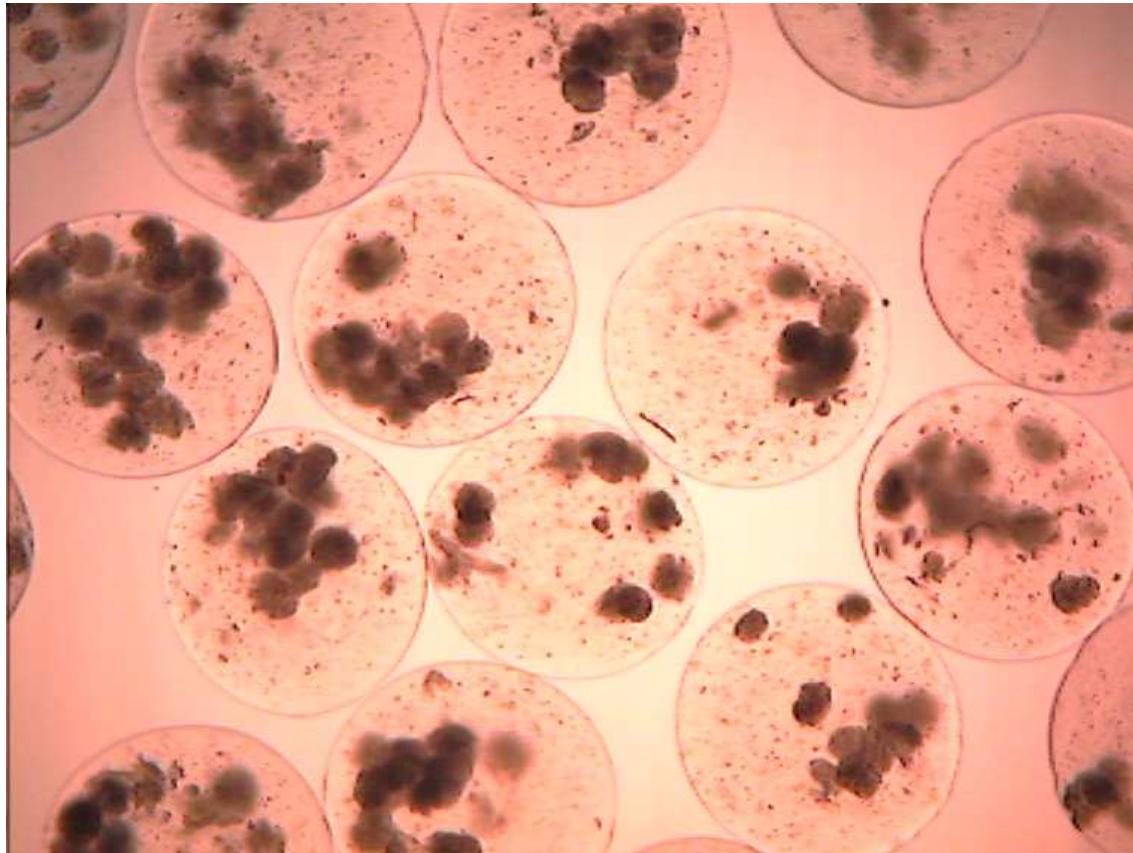


Foto V: islotes microencapsulados.