

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 464**

51 Int. Cl.:  
**A61K 35/39** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07760776 .0**  
96 Fecha de presentación: **17.04.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2013332**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.01.2009**

54 Título: **Terapia celular: un método y una composición para tratar diabetes**

30 Prioridad:  
**17.04.2006 US 792929 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**27.03.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**27.03.2012**

73 Titular/es:  
**PHILADELPHIA MEDICAL SCIENTIFIC CENTER,  
L.L.C.  
1695 HUNTINGDON ROAD  
HUNTINGDON VALLEY, P 19006, US**

72 Inventor/es:  
**BROYTMAN, Vladislav;  
BROYTMAN, Nikanor y  
SKALETSKIY, Nikolay**

74 Agente/Representante:  
**Curell Aguilá, Mireia**

**ES 2 377 464 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Terapia celular: un método y una composición para tratar diabetes.

5 **Antecedentes de la invención**

## 1. Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a un método de terapia celular y a una composición para el trasplante de las células beta de los islotes aisladas y cultivadas a partir de páncreas de animal para promover la producción natural de insulina entre personas con diabetes.

## 2. Descripción de la técnica relacionada

15 La diabetes tipo 1 afecta a más de un millón de norteamericanos. La diabetes tipo 1 es la forma más grave de la enfermedad, en la que el sistema inmunitario del organismo ataca a las células productoras de insulina requeridas para mantener la glucemia a niveles normales. Se sabe que una glucemia extremadamente baja puede dar como resultado ataques, conocimiento alterado, o inconciencia. En los casos más graves, las complicaciones no son bien controladas por la insulina.

20 Idealmente, la sustitución de células productoras de insulina en el páncreas puede liberar a los diabéticos de las inyecciones de insulina durante toda la vida, y curar efectivamente la enfermedad. El trasplante de estas células de los "islotes" se puede hacer ahora de dos maneras, a través de un trasplante completo de páncreas, o a través de un proceso menos invasivo y menos costoso de inyectar sólo las células de los islotes. Se ha demostrado que el trasplante exitoso de páncreas es efectivo a la hora de mejorar significativamente la calidad de vida de las personas con diabetes, principalmente eliminando la necesidad de insulina exógena y las medidas diarias y frecuentes de la glucemia (Pancreas Transplantation for Patients with Type I Diabetes. Diabetes Care. 25 (Suplemento 1): S111. Enero 2002). Sin embargo, los trasplantes de páncreas requieren una terapia de inmunosupresión para toda la vida, para evitar el rechazo del injerto y la recidiva potencial del proceso autoinmunitario, que puede destruir las células de los islotes pancreáticos.

35 El trasplante de las células beta de los islotes a partir de páncreas de donantes ha demostrado que promueve la producción natural de insulina entre pacientes con diabetes tipo 1 y tipo 2 (véanse Sperling, M.A. Type 1 Diabetes: Etiology and Treatment. Totowa, NJ: Humana Press Inc. 2003. p. 529-552; Insulin Therapy. En: Edelman, S.V. y Henry, R.R. Diagnosis and Management of Type 2 Diabetes. Caddo, OK: Professional Communications, Inc. 2002. p. 121-148). El trasplante de células de los islotes se puede llevar a cabo como un procedimiento percutáneo mínimamente invasivo, en el que las células de los islotes se infunden en el hígado vía la vena porta. Sin embargo, como otros pacientes de trasplantes, los receptores de islotes deben tomar fármacos inmunosupresores para evitar el rechazo de las células extrañas.

40 Se han estudiado los xenoinjertos o xenotransplantes de células de los islotes derivadas de cerdo o de vacuno, y han demostrado que requieren inmunosupresión.

45 Se ha demostrado la capacidad de las células beta precultivadas de páncreas de conejos neonatos para sobrevivir y funcionar activamente en el organismo de un receptor xenogénico en experimentos en ratas con diabetes mellitus inducida experimentalmente. (Skaletsky N.N. y otros. 1994 {4}). Se observó un efecto antidiabético expreso y a largo plazo (duración del experimento – 8 semanas) del trasplante de cultivos de células de los islotes en los casos de la administración en la cavidad abdominal y en el bazo, y también en los casos de la administración en el músculo abdominal transversal. Después de los experimentos, se llevaron a cabo ensayos histológicos que descubrieron en el lugar de introducción de los xenotransplantes células de los islotes con estructura conservada y sin signos de reacción inmunitaria celular. Al mismo tiempo, se detectaron claros signos de regeneración de las propias células beta en los páncreas de los animales receptores. Además de un efecto bien definido reductor del azúcar, durante los experimentos se observó un efecto profiláctico médico bien definido del xenotransplante de cultivos de células de los islotes en la complicación tardía distintiva de la diabetes – la nefropatía - (Skaletskaya G.N. y otros (2005 {4})).

55 El documento RU 2135193 de Skaletsky et al. describe la obtención de células beta de los islotes a partir de páncreas de conejo neonato, y a métodos de trasplante. Las células beta se obtienen mediante migración de fragmentos pancreáticos en un método de cultivo que requiere la adición de suero a un medio de cultivo. Rush et al. (2004 {18}) describen la conservación de islotes pancreáticos humanos en medio libre de suero durante hasta 6 meses. Los islotes beta obtenidos mediante dicho método fueron funcionales en ratones inmunodeprimidos.

60 De este modo, a pesar de los desarrollos actuales, se necesitan células de los islotes procedentes de diferentes fuentes que no requieran inmunosupresión.

65 Todas las referencias citadas aquí se incorporan como referencia en sus totalidades.

**Breve resumen de la invención**

En consecuencia, un aspecto de la invención comprende un método para obtener células beta de los islotes a partir de páncreas de conejos, comprendiendo el método: (a) cosechar dichos páncreas de conejos neonatos y colocar los páncreas en una disolución salina que comprende un antibiótico, a una temperatura de 4-10°C; (b) obtener microfragmentos pancreáticos picados a partir de dichos páncreas; y (c) incubar dichos microfragmentos pancreáticos picados en un medio libre de suero a una primera temperatura de incubación de 36,6°C a 37°C durante 6 a 10 días a 0% a 5% de CO<sub>2</sub> durante un primer período de incubación, y reponer periódicamente el medio libre de suero y eliminar células indeseadas destruidas espontáneamente que comprenden células exocrinas y células sanguíneas y elementos de tejido conjuntivo hasta que al menos 80% de las células que quedan sean células beta de los islotes; (d) e incubar dichos microfragmentos pancreáticos picados en dicho medio libre de suero a una segunda temperatura de incubación de 22°C a 29°C durante 4 a 5 días durante un segundo período de incubación hasta que al menos 78-90% de las células que quedan sean células beta de los islotes, en el que dicho medio libre de suero se repone opcionalmente de forma periódica, y de ese modo obtener células beta de los islotes.

Otro aspecto de la invención comprende una composición que comprende células beta de los islotes obtenidas de páncreas de conejos, en la que las células beta de los islotes se aíslan siguiendo un régimen seleccionado de temperatura de incubación de microfragmentos pancreáticos picados obtenidos de dichos páncreas de conejos cultivados en medio libre de suero según el método descrito anteriormente de la invención, y en la que las células beta de los islotes aisladas se obtienen en una cantidad de recuento celular de 1.500.000 ± 100.000 y tienen una viabilidad de al menos 80%, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado en esta invención puede incluir cualquier sustancia adecuada, tal como líquidos, geles y sólidos que se pueden combinar con la composición y son reconocidos por su seguridad en la administración a un mamífero.

En ciertas formas de realización, la composición comprende al menos 50% de células beta de los islotes.

En ciertas formas de realización, la composición comprende al menos 78% de células beta de los islotes.

Otro aspecto de la invención comprende un uso de la composición como se describe anteriormente para promover la producción natural de insulina, comprendiendo el método: preparar la composición según la reivindicación 6 que comprende las células beta de los islotes aisladas y cultivadas a partir de páncreas de conejo; y administrar la composición según la reivindicación 6 a un sujeto que necesite insulina y por lo tanto promover la producción natural de insulina.

**Descripción detallada de la invención**

El método de cultivo de la invención incluye el uso de un régimen seleccionado de temperatura de incubación para microfragmentos pancreáticos picados obtenidos de un conejo y cultivados en un medio libre de suero. Siguiendo el método de la invención, se obtiene una preparación pura de células beta de los islotes viables y activas, que se pueden transplantar con éxito a un paciente diabético sin el uso de ninguna supresión inmunitaria.

El método de cultivo de la invención proporciona condiciones favorables para las células beta pancreáticas, y crea condiciones desfavorables para células lastre e inmunogénicas (denominadas células pasajeras) tales como, por ejemplo, células exocrinas, endoteliales, dendríticas, y linfocitos. La eliminación de todas estas células pasajeras proporciona una reducción significativa de la inmunogenicidad de las células de los islotes cultivadas. Contrariamente a la creencia común de que el cultivo a largo plazo de células requiere la adición de un suplemento sérico al fluido de cultivo, se ha descubierto que el uso de medios libres de suero en el método de la invención favorece el crecimiento de células beta de los islotes deseadas, y perjudica el crecimiento de células pasajeras indeseadas, y por lo tanto proporciona células beta de los islotes viables y activas en una cantidad comercialmente valiosa, en el que tales células están sustancialmente libres de células pasajeras indeseadas.

Sin estar limitados a una teoría particular, se cree que también tiene lugar el desprendimiento de antígenos de superficie, puesto que ha habido una notable falta de reacción inmunitaria a pesar de la ausencia de cualquier tipo de terapia inmunosupresora ni antes ni después del xenotransplante de células de los islotes clínicas. Puesto que el cultivo tremendamente refinado de células beta preparado mediante el método de la invención no contiene células relacionadas con vasos del donante, no hay ningún rechazo de células beta xenotransplantadas.

Se ha descubierto una combinación sinérgica de células, disoluciones y condiciones. Esto se logra cambiando el entorno, por ejemplo colocando el cultivo en una incubadora de O<sub>2</sub> frente a una incubadora de 5% de CO<sub>2</sub>, variando los intervalos de temperatura y de tiempo en la incubadora a lo largo de un período de 10-14 días. No se usaron manipulaciones genéticas.

Ahora se describirá con detalle la técnica de cultivo y las técnicas de transplante intramuscular del cultivo de células de los islotes. Se recogieron conejos sumergiéndolos en etanol al 40-96%, preferiblemente etanol al 70%, hasta que se registró la muerte, por ejemplo hasta 10 minutos, preferiblemente 7-8 minutos. En condiciones estériles, se retiró el páncreas de la cavidad abdominal de un ratón neonato (el término "neonato", como se usa aquí, incluye conejos

desde el momento del nacimiento hasta conejos de 5 días que no se expusieron a leche materna, preferiblemente conejos neonatos de hasta 12 horas) y se colocó inmediatamente en una cápsula de Petri con disolución salina de Hank fría (por ejemplo, 4-6°C) o disolución fisiológica (NaCl) y antibióticos (por ejemplo, 1000 unidades/ml de penicilina y 10000 mg/ml de estreptomina). Con la ayuda de pinzas oftálmicas, se retiró una cápsula de páncreas.

5 Se eliminaron los vasos y los conductos excretores. Después, el páncreas se cortó mediante tijeras oftálmicas en microfragmentos del tamaño de alrededor de 2-3 mm, y después se transfirieron a un vidrio de reloj especial. Se continuó el procesamiento de 18-20 páncreas de la manera descrita anteriormente. Después, los microfragmentos pancreáticos se cortaron con las tijeras oftálmicas (córnea) en trozos más pequeños, es decir, microfragmentos pancreáticos picados. Los microfragmentos pancreáticos picados obtenidos se lavaron con disolución fría de Hank, y se colocaron en un matraz de cultivo o una botella (por ejemplo, espacio de 75 cm<sup>2</sup>, Corning-Costar) distribuyéndolos sobre una superficie del fondo del matraz. 5-7 minutos más tarde, durante los cuales hay una adhesión de los microfragmentos al plástico, se vertió en el matraz (por ejemplo, 10% de un volumen del matraz) un medio de crecimiento libre de suero 199 (Sigma Aldrich), sin suplemento sérico. El matraz se colocó entonces en una incubadora con aportación de 0-5% de CO<sub>2</sub>, y el tejido pancreático se incubó a 36-37,5°C (la primera temperatura de incubación), preferiblemente 36,6-37°C durante 6-10 días, preferiblemente 7-8 días (el primer período de incubación). Cada 1-2 días, los matraces con las células cultivadas se observaron a través del microscopio invertido, y se eliminaron las células exocrinas destruidas espontáneamente del páncreas, células de la sangre y elementos de tejido conjuntivo; el medio de crecimiento 199 se sustituyó por un medio de crecimiento reciente. Como resultado del primer período de incubación, se formaron racimos de células de los islotes en la parte inferior del matraz, y al menos 78% de ellos (según la coloración específica) fueron células beta pancreáticas.

Para el aclaramiento final de elementos celulares de lastre que inician la respuesta inmunitaria (por ejemplo, pasajeros leucocíticos), los matraces de cultivo se colocaron en una incubadora a una temperatura que oscila desde 22°C hasta 29°C (la segunda temperatura de incubación) durante 4-5 días (el segundo período de incubación). Se ha observado que, a la segunda temperatura de incubación de 24°C, se logran los mejores resultados, y las células beta contienen la cantidad más pequeña de células pasajeras. Después de eso, el cultivo que consiste sólo en 78-90% de células beta de los islotes se puede transplantar a un paciente diabético. Además de las células de los islotes, se encuentran fibroblastos singulares en el cultivo pero su cantidad no excede habitualmente 1-5%. Las células de origen epitelial son habitualmente células que quedan en el cultivo y constituyen el 5-17%, hecho el cual confirma la coloración inmunohistoquímica (con anticuerpos monoclonales contra la proteína citoqueratina 18); pero no son células beta, puesto que estas estructuras celulares no revelan la presencia de insulina.

Se puede colocar una dosis de cultivo de células de islotes que contiene preferiblemente 1.400.000-1.600.000 células en suspensión estéril en disolución salina de Hank (10-15 ml de volumen, todas las células obtenidas son no craneales) en un tubo de plástico marcado de forma apropiada. El cultivo de células de islotes obtenido según el método de la invención (también denominado aquí como Beta Cells of Philadelphia Medical Scientific Center o BCPMSC) tiene la siguiente composición celular:

Recuento celular general:		1.500.000 ± 100.000
Células beta		82 ± 8 (al menos 50%)
Otras células de islotes	+ 30	9 + 2%
Fibroblastos	+ 30	2 + 1%
Células de islotes progenitoras (madre)	+ 30	7 + 3%
El cultivo se lleva a cabo en medio 199 de crecimiento libre de suero		
Período de almacenamiento de BCPMSC:		a 4-10°C durante 72 horas
		a 11-24°C durante 48 horas
		a 30-37°C durante 12 horas

40 La dosis de cultivos de células de islotes se preparó a partir de 80 páncreas de conejos neonatos de 1-2 días.

Duración del cultivo – 14-21 días.

45 Se prefiere una viabilidad celular de 82% o más.

En la incubación de control de las células de islotes cultivadas, la producción basal de insulina ascendió 8400 ± 1200 μU/ml/h, estimulada – 16500 ± 2700 μU/ml/h.

50 El método de cultivo de la invención excluyó la contaminación del cultivo por microorganismos (por ejemplo bacterias, hongos, micoplasma y virus).

Cada dosis se acompañará con un certificado que describe la preparación, teniendo toda la información necesaria en BCPMSC. Criterios para el aislamiento o eliminación de animales enfermos; como se señala, al primer signo de cualquier enfermedad, el animal se pone en cuarentena y nunca se devuelve a la colonia desde la cuarentena.

55

El cultivo obtenido se puede transplantar a un receptor, por ejemplo un paciente con diabetes mellitus (DM). El trasplante (xenoinjerto) o una inyección se puede administrar de diversas maneras, por ejemplo mediante inyección en el hígado (es decir, directamente en el parénquima hepático o a través de la vena porta), en la pulpa del bazo, en la arteria esplénica, en el bolsillo del omento que se ha hecho grande con el uso de técnica de laparoscopia, e intramuscularmente. El método preferido de introducción de cultivo es en el músculo abdominal del recto del recipiente.

#### TÉCNICA DE TRANSPLANTE

Con la aguja de inyección, preferiblemente no menor de 7 cm de longitud y no menor de 1 mm de diámetro, la suspensión de células de islotes se recoge en una jeringuilla y se inyecta en el músculo abdominal del recto después de anestesia local. Preferiblemente, el sitio de una inyección se cerrará mediante venda estéril.

#### PRUEBA DE INMUNOGENICIDAD REDUCIDA DE LOS CULTIVOS DE CÉLULAS DE ISLOTES

Pruebas *in vitro*: diversos experimentos histológicos, incluyendo microscopía visible y electrónica, e inmunohistoquímica, mostrados anteriormente, demostraron que en el cultivo puro no hay los denominados pasajeros leucocitarios (linfocitos, macrófagos, etc.) capaces de iniciar una reacción inmunitaria tras el procedimiento (9-12 meses). Pruebas *in vivo*: el xenotrasplante del cultivo de células de los islotes en ratas con diabetes experimental condujo a la remisión del estado diabético durante al menos 30 días.

Con el fin de estudiar la inmunogenicidad de las células contenidas en el cultivo obtenido mediante el método descrito anteriormente a partir del páncreas de conejos neonatos, se llevaron a cabo experimentos para determinar la fijación de inmunoglobulinas de suero sanguíneo humano en ellas. Las células, incubadas con diversos sueros sanguíneos humanos, se tiñeron mediante anticuerpos monoclonales contra inmunoglobulinas humanas, y se analizaron en un citómetro de flujo. Parece que las células contenidas en el cultivo son capaces de fijar inmunoglobulinas M en su superficie, pero no se descubrió fijación de inmunoglobulina G.

Se recomienda una preparación apropiada del paciente con diabetes para el trasplante del cultivo de células de los islotes. Antes del tratamiento con el trasplante, un paciente diabético ha de lograr un estado glucémico tan bueno como sea posible mediante terapia intensiva con insulina. Los pacientes no deben tener vacunaciones ni terapia con suero durante 4 semanas antes del trasplante celular. La investigación clínica debería incluir asesoramiento del oftalmólogo, del nefrólogo, del neurólogo, del cirujano vascular, del dermatólogo, del diabetólogo, y asesoramiento de otros especialistas con respecto a complicaciones diabéticas secundarias.

Un paciente se puede preparar para el xenotrasplante de células de los islotes de la siguiente manera:

1. Eliminación de cetoacidosis, frecuente hipoglucemia o hiperosmolaridad mediante hospitalización, de manera que el estado clínico del paciente esté tan compensado como sea posible;
2. Compensación máxima del estado diabético, estabilización de la glucemia dentro de niveles normales o casi normales mediante terapia adecuada con insulina bajo un autocontrol férreo de la glucemia;
3. Evitación de vacunaciones o terapia con suero durante 4 semanas antes del trasplante celular.

Se seguirán los siguientes parámetros en pacientes antes y después del xenotrasplante de las células de los islotes, con la frecuencia según lo siguiente:

#### General:

1. Nivel de HBA-1c (hemoglobina glucosilada) cada 3 meses;
2. Nivel de péptido C (basal y estimulado) cada 3 meses;
3. Detección de autoanticuerpos; anti-GAD, anti-insulina, anti-ICA;
4. Colesterol sérico y triglicéridos cada 3 meses;
5. Automonitorización de glucemia en casa (con un diario) varias veces al día;
6. Corrección de las necesidades de insulina (con un diario).

#### Especial:

Retinopatía diabética:

1. Evaluación del campo del fondo retiniano estándar mediante fotografía estereofundoscópica y técnica fluorescente cada 3 meses;

2. Agudeza visual cada 3 meses.

5

Nefropatía diabética:

1. Proteinuria/24 h una vez al mes;

10

2. Microalbuminuria cada 3 meses;

3. Creatinina sérica cada 3 meses;

15

4. Aclaramiento de creatinina cada 3 (6) meses;

5. Tensión arterial una vez a la semana.

Neuropatía diabética:

20

1. EMG cada 3 meses;

2. Estudios de conducción nerviosa del nervio tibial; nervio safeno externo; nervio medio cada 3 (6) meses;

25

3. Escala análoga de dolor una vez al mes;

4. Cambios ortostáticos – una vez al mes;

30

5. Variación EKG-r-r cada 3 meses.

Vasculopatía diabética:

1. Ultrasonido Doppler cada 3 (6) meses;

35

2. Sonda Doppler;

3. Tensión arterial Doppler del tobillo/brazo;

4. Tensión sanguínea segmental Doppler;

40

5. Cambio de la forma de la onda del pletismógrafo.

45 Como ha demostrado la investigación bioquímica y morfológica, los cultivos de células insulares pancreáticas producidos mediante los métodos señalados poseen una elevada actividad secretora y una potencia inmunógena tremendamente reducida (potencia inmunológica). Se adjunta preferiblemente un certificado de calidad a cada porción de células designada para la terapia celular.

INDICACIONES Y CONTRAINDICACIONES PARA XENOTRANSPLANTE DE CULTIVOS DE ISLOTES

50 Indicaciones ejemplares: (a) curso lábil de diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM) con inclinación hacia estado hipoglucémico y/o cetoacidosis, (b) incapacidad para alcanzar una compensación satisfactoria de IDDM por métodos habituales; resistencia a insulina, (c) complicaciones secundarias de diabetes mellitus en pacientes con IDDM y NIDDM (neuropatía, nefropatía, retinopatía, angiopatía de las extremidades inferiores, etc.), excluyendo estudios terminales, y (d) IDDM (insulino dependiente) y NIDDM (no insulino dependiente) sin detección de complicaciones secundarias – con el fin de profilaxis.

55

B. Contraindicaciones: infecciones agudas y enfermedades inflamatorias, o exacerbación de enfermedades crónicas; enfermedades oncológicas.

60 SUPERVISIÓN DE PACIENTES TRAS EL TRANSPLANTE DE CULTIVO DE CÉLULAS DE LOS ISLOTES

Se recomienda la inspección señalada anteriormente después de 3, 6, 9 y 12 meses, dentro del primer año del trasplante.

65 La mayoría de receptores en 1-3 meses después del xenotransplante demuestran los siguientes cambios:

1. Actualmente/antes de XT – la diabetes tipo 1 lábil se estabiliza;
2. La tendencia de los pacientes a la cetosis desaparece;
- 5 3. Mejoran los parámetros de intercambio de hidratos de carbono (se reduce la glucemia media diaria – en 1-2 meses, disminuye el contenido de hemoglobina glucosilada – 3 meses;
4. Disminuye (20-30%) el requisito de insulina exógena;
- 10 5. Mejora los parámetros del metabolismo lipídico;
6. En pacientes con ausencia de secreción residual de insulina por las propias células beta (sin el péptido C no se determina) aparece la producción de insulina del paciente (péptido C).
- 15 7. En pacientes con neuropatía motora sensorial, desaparece el dolor y la parestesia; mejora los parámetros de sensibilidad y conductividad de las fibras de nervios periféricos. En pacientes con neuropatía autónoma, que luchan con el control glucémico, hipotensión postural, gastroparesia, y enteropatía (diarrea), se normalizan los parámetros del pulso y de la tensión arterial, y también se normalizan las funciones del estómago y del intestino.
- 20 8. En pacientes con diabetes tipo 1 con una nefropatía diabética de etapa expresada (clasificación de C. Morgensen), disminuye y desaparece la proteinuria, y se reduce y normaliza la tensión arterial elevada. En pacientes con 3ª etapa de nefropatía diabética, disminuye la microalbuminuria o se hace normal (menor que 30 mg/día).
- 25 9. En pacientes con estados no proliferados y preproliferados de retinopatía diabética, se estabiliza el cuadro clínico de un fondo de ojo, la parte significativa de los receptores mejora: se resuelven las hemorragias, y disminuye la hipóstasis de la retina.
- 30 La estabilización del curso de la diabetes mellitus y la reducción de la necesidad de insulina exógena resultan del funcionamiento adecuado de las células transplantadas de los islotes y una recuperación parcial o función incrementada de las células de los islotes del páncreas del paciente.
- 35 Se cree que el efecto curativo de los cultivos celulares transplantados sobre las complicaciones diabéticas tardías se explica aparentemente por la restauración o fortalecimiento de la secreción tanto por parte de las células beta transplantadas como por parte de las propias células beta del paciente del péptido C, que se produce junto con insulina, y tiene un efecto angioprotector notable.
- 40 Según la hipótesis, el desarrollo de microangiopatía que es la base de todas las complicaciones diabéticas, es debido a la falta de péptido C y algunas otras sustancias similares a hormonas producidas por las células beta, que están ausentes en una mayoría aplastante de pacientes con diabetes tipo 1.
- 45 La inyección del péptido C en pacientes con diabetes mellitus tipo 1 complicada da como resultado el retroceso de complicaciones diabéticas secundarias, tales como nefropatía, retinopatía y neuropatía.
- 50 Las células beta transplantadas de conejos producen péptido C normal, que tiene una influencia fisiológica sobre complicaciones diabéticas tardías.
- La Tabla 1 demuestra un control glucémico mejorado y una caída en la necesidad de insulina tras ICCXT (112 casos bien documentados).

Tabla 1

Índice	Antes de XT	3 Meses Después	6 Meses Después	9 Meses Después	12 Meses Después
Glucemia diaria media, mg/dl	198+41	158+52	129+23	133+30	142+34
HbA1c, %	10,1+2,1	9,1 + 1,2	7,7+1,9	6,9+1,1	7,5+1,9
Dosis de insulina, IU	56+11	38+15	25+12	32+9	40+8

- 55 La Tabla 2 demuestra la necesidad de insulina (UI/día) y el nivel de microalbuminuria (mg/día) tras ICC XT repetido en paciente Ts.S (33 años de edad, 18 años de duración de DM tipo 1).

Tabla 2

XT	Índice	Antes de XT	3 Meses Después	6 Meses Después	9 Meses Después	12 Meses Después
1º	Dosis de insulina	64	33	38	40	48
	Microalbuminuria	936	680	348	330	496
2º	Dosis de insulina	52	38	24	26	38
	Microalbuminuria	660	377	189	199	167
3º	Dosis de insulina	42	38	25	32	40
	Microalbuminuria	330	145	99	112	88
4º	Dosis de insulina	40	34	20	16	16
	Microalbuminuria	66	45	34	40	39

Las ventajas principales del transplante de las células de los islotes en comparación con la terapia habitual de diabetes mellitus del tipo 1 son las siguientes:

5 Debido a transplante llevado a cabo regularmente, todos los receptores muestran una disminución en la progresión de angiopatía diabética, y un retroceso de las etapas iniciales de complicaciones diabéticas tardías (retinopatía, nefropatía, neuropatía, y angiopatía), lo que es imposible de lograr con la ayuda de una terapia habitual (inyección de insulina con el autocontrol de glucemia, y tratamiento tradicional de angiopatía).

10 Esto ocurre mayoritariamente debido a que las células beta transplantadas después de aceptar el transplante (aceptación) comienzan a producir en el cuerpo del receptor un péptido C angioprotector, del cual estaba privado el paciente debido al colapso de sus propias células beta (debido a agresión autoinmunitaria).

15 Se ha demostrado la capacidad de los cultivos de células insulares pancreáticas, recibidos a través del método original a partir de páncreas de conejos neonatos, para sobrevivir y funcionar en un entorno in vivo, en experimentos de xenotransplante de tales cultivos en animales con diabetes mellitus experimental.

20 Como animales experimentales, se usaron ratas macho de la línea Wistar de masa corporal de 180-220 g, alimentadas regularmente.

La diabetes mellitus experimental se provocó mediante aplicación subdérmica de aloxano (dosis de 200 ml por 1 kg de peso corporal), o mediante aplicación subdérmica de estreptozotocina (dosis 60 ml/kg).

25 Durante los experimentos y sondas de control, sólo se usaron ratas con diabetes inducida por aloxano o por estreptozotocina, aquellas cuyo nivel de hipoglucemia en el estómago vacío fue 20 mmoles/l y superior. Los ensayos llevados a cabo inicialmente indicaron que tales animales no tuvieron reversión espontánea de diabetes mellitus experimental.

30 Después del transplante de cultivos P.I.C., 88 de 104 ratas con diabetes mellitus estable o severa inducida por aloxano (casi 85%) presentaron una remisión firme del estado diabético hacia el final del período experimental (20 semanas). En la sangre de los animales receptores se registró una disminución firme de los niveles de glucemia desde niveles casi normales hasta niveles normales. Al mismo tiempo, también se desvanecieron los síntomas clínicos característicos de la diabetes (tales como pérdida de peso, polidipsia, poliuria). El efecto antidiabético del xenotransplante se demostró claramente en ambos casos de aplicación de cultivos en el hígado (a través de la vena porta o directamente en el parénquima hepático) y también en el bazo (los cultivos se introdujeron de forma intrapulparia), y también a través de los músculos abdominales. Incluso después de 8 semanas tras el xenotransplante, se detectó P.I.C. con estructura conservada y con signos de actividad secretora en lugares de implantación en ratas con remisión de diabetes experimental.

40 Durante la serie especial de experimentos, se demostró claramente el papel del cultivo preliminar de P.I.C. *in vitro* en la supervivencia de las células en organismos de receptor xenogénico. Para ese fin, se llevó a cabo un análisis comparativo de los resultados de xenotransplante de cultivos de P.I.C. de páncreas de fetos humanos y xenotransplante de tejido de islotes fetal no cultivado, en ratas con diabetes mellitus experimental. Se detectó que el efecto reductor de azúcar está más expreso y dura más en los casos de transplante de P.I.C. precultivado, en comparación con el transplante de tejido no cultivado de páncreas, que sólo da como resultado una remisión a corto plazo del estado diabético. Así, el resultado inmunomodulador del cultivo in vitro se demostró experimentalmente para incrementar significativamente el término de supervivencia en un organismo de un receptor extraño.

50 Los páncreas de 18 ratas receptoras, sobre las que se había llevado a cabo con éxito un xenotransplante de cultivos de páncreas de conejos neonatos, se sometieron a un examen histológico a las 8 semanas después del transplante. Para ese fin, se fijó un fragmento de páncreas en disolución *buena* y se sumergió en parafina. Las rebanadas (5-7 mm de grosor) se colorearon mediante hematoxilina y eosina, y también mediante aldehído-fucsina, para revelar las células β. Al mismo tiempo, se examinaron los páncreas de 6 animales de control que tuvieron diabetes no tratada inducida por aloxano, así como los páncreas de 6 ratas sanas (a las que no se les aplicó aloxano).

Mientras se examinaban los páncreas de ratas sanas intactas, se encontró aproximadamente 47-76% de células  $\beta$ , como era de esperar, en los islotes de Langerhans. Las ratas con diabetes no tratada inducida por aloxano habían disminuido bruscamente la cantidad de células  $\beta$  en los islotes – de media  $8,3 \pm 1,1\%$ .

5 Se descubrió una cantidad significativamente mayor de células  $\beta$  en los islotes en ratas receptoras. En animales que habían sido sometidos a xenotransplante de cultivos de P.I.C., sus propios páncreas presentaron células  $\beta$  típicas, y su participación entre las células de los “islotes” fue de 10 a 55% (aproximadamente de 7 a 21%) (media  $23,5 + 8,8$ ).

10 Con respecto a estos experimentos, se puede asumir que el efecto antidiabético del xenotransplante de cultivos OK en desarrollos de diabetes experimental en ratas se produce de dos formas generales: a) funcionamiento confirmado de células  $\beta$  transplantadas, además de un efecto reductor de azúcar expreso, también revelando grupos de P.I.C. transplantadas en la pulpa del bazo de animales receptores: b) efecto estimulante del transplante de cultivos de P.I.C. en los aparatos de islotes de páncreas de ratas receptoras, posibilidad la cual se confirma mediante

15 exámenes de datos histológicos que revelan la existencia de frecuencia significativa de islotes con células  $\beta$  normales y mayor participación de ellas en los islotes de páncreas de ratas receptoras que de ratas con diabetes inducida por aloxano no tratada.

20 La investigación experimental con éxito puso las bases para llevar a cabo el transplante clínico de cultivos de páncreas de conejos neonatos a pacientes con diabetes tipo 1.

#### TRANSPLANTE CLÍNICO DE CULTIVOS DE P.I.C. PRODUCIDOS DE PÁNCREAS DE CONEJOS NEONATOS

25 Total de 112 pacientes con diabetes mellitus tipo 1 (IDDUM) estuvieron bajo supervisión dinámica bien documentada.

Del total de 112 pacientes, había 58 hombres y 54 mujeres. La edad de los pacientes en el momento del transplante varió de 15 a 53 – media 35 años de edad.

30 Se sabe que la gravedad de la manifestación de complicaciones diabéticas secundarias depende significativamente de la duración de la enfermedad IDDM. Supuestamente, la destrucción de las propias células  $\beta$  del paciente como resultado de un proceso autoinmunitario ocurre aproximadamente en el 5º año después de la manifestación de la enfermedad. Las complicaciones diabéticas secundarias se manifiestan por sí mismas habitualmente en pacientes con duración de la enfermedad de más de 10 años. Debido a eso, todos los pacientes con IDDM se dividieron en 3

35 grupos en referencia a la duración de la enfermedad: a) 1 a 5 años – 16 personas; b) 6 a 10 años – 43 personas, c) más de 10 años – 53 pacientes. Todos los pacientes se examinaron con el objetivo de determinar el carácter del desarrollo de IDDM y establecer la presencia de complicaciones diabéticas.

40 Para el transplante de un paciente, habitualmente se usaron cultivos recibidos a través de los métodos descritos anteriormente de 50-60 páncreas de conejos neonatos de 1-2 días. La suspensión se suministró habitualmente en el músculo abdominal transversal bajo anestesia local. No se usó ninguna inmunosupresión.

45 El hecho más importante que confirma un efecto antidiabético en el transplante de células de los islotes justo debido al funcionamiento de células beta transplantadas es el hecho de descubrir las en el lugar de la administración del transplante. Si después el transplante intraperitoneal es casi irreal localizar células aplicadas en la cavidad abdominal, entonces es posible tras la administración en el bazo, aunque muy difícil.

50 Se obtuvo una microfotografía de una sección histológica coloreada a través de la pulpa del bazo que demuestra claramente un transplante representado por un grupo de células epiteliales en el centro de la foto. La confirmación de que estas células son ciertamente un transplante se basa parcialmente en los hechos de que las estructuras epiteliales están ausentes en tejido esplénico.

55 En consecuencia, la presencia de células epiteliales en la pulpa lineal aporta evidencia para el “entrante desde el exterior”, en este caso un transplante.

Basándose en los resultados de la investigación experimental científica, se pueden realizar varias conclusiones básicas:

60 1. La estreptozotocina (Stz) realiza un efecto destructivo general sobre las células beta de los islotes del páncreas, pero al mismo tiempo conduce directa o indirectamente a una pérdida de otras células de los islotes.

65 2. Parece que se produce un proceso de regeneración en los islotes de Langerhans afectados, principalmente a causa del descubrimiento de un conjunto de células beta.

3. Los cultivos de células de los islotes producidos a partir de páncreas de conejos neonatos a través del método original consisten generalmente en células beta aclaradas de elementos celulares lastre, y tienen una actividad productora de insulina muy elevada.

5 4. Un xenotransplante intraperitoneal, así como intraesplénico, de cultivos de células de islotes a ratas con diabetes mellitus inducida por estreptozotocina proporciona, en la mayoría de los casos, una remisión estable del estado diabético para una duración de al menos 8 semanas.

10 5. El efecto reductor de azúcar después del trasplante se asegura por el funcionamiento de las células beta transplantadas, también mediante las actividades productoras de insulina en, en cierto grado, el conjunto restaurado de células beta en islotes de páncreas de ratas receptoras. Esto se confirma por los hallazgos a la hora de medir las concentraciones de insulina exógena (de conejo) y propia (de rata) en la sangre de animales experimentales.

15 6. Los exámenes histológicos de los páncreas de ratas experimentales confirmaron la estimulación expresada de procesos regenerativos en islotes de ratas con diabetes mellitus estreptozotocínica tras administrarles el xenotransplante de cultivos de células de los islotes.

20 Es posible que la regeneración de las células beta ocurra no sólo en los márgenes de localización de los islotes de Langerhans, sino también en algunas estructuras fuera del tejido pancreático de los islotes.

La invención se ilustrará con más detalle haciendo referencia a los siguientes Ejemplos, pero se debería interpretar que la presente invención no se considera limitada a los mismos.

## 25 Ejemplos

### Ejemplo 1

30 En la etapa inicial de un trabajo de investigación científico real se usaron como animales experimentales ratas de la línea Wistar de 220-250 gramos de masa corporal recibidas de una guardería especial de animales de laboratorio. A fin de eliminar influencias cíclicas hormonales sobre la alteración de parámetros de metabolismo de hidrato de carbono, se decidió llevar a cabo experimentos sobre machos pubescentes maduros.

35 A fin de obtener resultados objetivos a la hora de llevar a cabo el tratamiento antidiabético en ratas de laboratorio, se diseñó un modelo de diabetes mellitus estable.

40 La enfermedad en los animales se provocó mediante la introducción de la administración intraperitoneal fraccionada de una disolución extempore derivable de estreptozotocina – dosis total de 80 mg por 1 kg de peso corporal. Un total de 90 animales se sometieron al efecto de la estreptozotocina. Más tarde, la mayoría de los animales desarrollaron signos característicos de estado diabético: sed, poliuria, (glucemia excesiva), polifagia (ingesta excesiva de alimentos), caída del pelo, ralentización de la ganancia de masa corporal o su declinación. En ese momento, se registró una hiperglucemia expresada en 58 ratas, es decir, otras 22 retuvieron una glucemia normal o la concentración de glucosa no aumentó de forma significativa. Hacia el período de 4 semanas después de inducir la diabetes, se recogieron 32 animales con un nivel más estable de hiperglucemia. La estabilidad se confirmó por el hecho de que durante casi un mes de observación, la concentración de azúcar en sangre no se redujo más allá de 16 mmoles/l.

50 La elección de glucemia inicial de tal intervalo no es en base a la oportunidad, como se explica por lo siguiente. Como demostraron los experimentos previos, en glucemia de nivel de 16 mmoles y superior, como se registró en no menos de 4 semanas después de administrar la estreptozotocina, tales ratas no demuestran una remisión espontánea en el futuro así como una inversión del estado diabético. Al mismo tiempo, incluso una glucemia muy alta (todavía por debajo de 30 mmoles/l) permite a la mayoría de los animales experimentales con diabetes sobrevivir durante períodos prolongados (2 meses o más), lo que permite llevar a cabo experimentos más bien continuos sin preocupación seria por una muerte a destiempo de tales animales. Estas suposiciones se confirmaron por la observación con respecto al grupo de control (sin tratamiento) de ratas diabéticas. Más abajo se encuentran los hallazgos sobre el efecto de xenotransplante intraperitoneal de cultivos de células de los islotes de conejos neonatos durante el transcurso de diabetes estreptozotocínica en 8 ratas con diabetes mellitus estreptozotocínica consistente.

60 A cada uno de los animales receptores, en el marco de narcosis intraperitoneal con hexenal, se les administró 700.000-800.000 células de los islotes de páncreas de conejos neonatos mediante administración a través de punción en la pared abdominal por una aguja de diámetro grande.

65 A continuación se encuentran los hallazgos referidos al cambio en la gravedad del estado diabético en cada uno de 8 animales experimentales de este grupo. Los animales se dividieron en 3 grupos de 8 ratas cada uno.

## ES 2 377 464 T3

1<sup>er</sup> grupo: 8 ratas con hiperglucemia, a las que se les administró un xenotransplante de cultivos de células de los islotes en la cavidad abdominal;

5 2<sup>o</sup> grupo: 8 ratas con hiperglucemia, a las que se les administró xenotransplante de cultivos de células de islotes en la pulpa del bazo;

3<sup>er</sup> grupo: 8 ratas con hiperglucemia, que no se sometieron a ningún tratamiento (control).

10 Tabla 3. Cambio de glucemia y masa corporal tras la aplicación de estreptozotocina (Stz) y transplante intraperitoneal subsiguiente (Tx) de cultivos de células de los islotes de páncreas de conejos neonatos en rata #1.

Índices	Antes de Stz	4 semanas después de Stz	Antes de Tx	Semanas							
				1	2	3	4	5	6	7	8
Glucemia mM/l	6,7	20,0	24,1	12,2	12,0	12,4	12,5	12,2	11,9	14,8	14,9
Masa corporal, g	220	175	170	180	200	230		250	290	330	340

Tabla 4. Cambio de glucemia y masa corporal tras la aplicación de estreptozotocina (Stz) y transplante intraperitoneal subsiguiente (Tx) de cultivos de células de los islotes de páncreas de conejos neonatos en rata #2.

Índice	Antes de Stz	4 semanas después de Stz	Antes de Tx	Semanas							
				1	2	3	4	5	6	7	8
Glucemia mM/l	6,4	18,7	16,6	13,0	6,8	6,7	7,4	6,4	5,5	7,0	6,0
Masa corporal, g	200	180	170	180	210	230	240	250	270	290	320

15 Tabla 5. Cambio de glucemia y masa corporal tras la aplicación de estreptozotocina (Stz) y transplante intraperitoneal subsiguiente (Tx) de cultivos de células de los islotes de páncreas de conejos neonatos en rata #3.

Índice	Antes de Stz	4 semanas después de Stz	Antes de Tx	Semanas							
				1	2	3	4	5	6	7	8
Glucemia mM/l	5,4	26,8	29,0	16,1	22,2	16,5	12,5	14,1	17,7	16,5	15,9
Masa corporal, g	200	180	160	160	170	200	210	220	240	250	290

Tabla 6. Cambio de glucemia y masa corporal tras la aplicación de estreptozotocina (Stz) y transplante intraperitoneal subsiguiente (Tx) de cultivos de células de los islotes de páncreas de conejos neonatos en rata #4.

Índice	Antes de Stz	4 semanas después de Stz	Antes de Tx	Semanas							
				1	2	3	4	5	6	7	8
Glucemia mM/l	6,0	19,7	21,2	12,2	13,0	14,1	9,2	7,9	9,0	9,2	8,3
Masa corporal, g	240	210	200	190	210	250	260	270	310	320	350

20 Tabla 7. Cambio de glucemia y masa corporal tras la aplicación de estreptozotocina (Stz) y transplante intraperitoneal subsiguiente (Tx) de cultivos de células de los islotes de páncreas de conejos neonatos en rata #5.

Índice	Antes de Stz	4 semanas después de Stz	Antes de Tx	Semanas							
				1	2	3	4	5	6	7	8
Glucemia mM/l	4,9	18,9	17,9	15,5	15,9	14,0	15,9	15,0	15,2	16,8	14,6
Masa corporal, g	200	180	170	180	200	220	240	250	270	280	300

Tabla 8. Cambio de glucemia y masa corporal tras la aplicación de estreptozotocina (Stz) y transplante intraperitoneal subsiguiente (Tx) de cultivos de células de los islotes de páncreas de conejos neonatos en rata #6.

Índice	Antes de Stz	4 semanas después de Stz	Antes de Tx	Semanas							
				1	2	3	4	5	6	7	8
Glucemia mM/l	5,9	22,3	21,9	14,2	11,1	7,8	7,0	8,4	8,1	7,8	7,4
Masa corporal, g	240	210	210	200	240	240	260	290	320	350	360

5 Tabla 9. Cambio de glucemia y masa corporal tras la aplicación de estreptozotocina (Stz) y transplante intraperitoneal subsiguiente (Tx) de cultivos de células de los islotes de páncreas de conejos neonatos en rata #7.

Índice	Antes de Stz	4 semanas después de Stz	Antes de Tx	Semanas							
				1	2	3	4	5	6	7	8
Glucemia mM/l	5,9	18,0	17,1	11,5	7,9	8,1	6,4	5,4	6,1	5,1	6,4
Masa corporal, g	200	180	170	180	200	220	240	250	270	280	300

Tabla 10. Cambio de glucemia y masa corporal tras la aplicación de estreptozotocina (Stz) y transplante intraperitoneal subsiguiente (Tx) de cultivos de células de los islotes de páncreas de conejos neonatos en rata #8.

Índice	Antes de Stz	4 semanas después de Stz	Antes de Tx	Semanas							
				1	2	3	4	5	6	7	8
Glucemia mM/l	6,3	24,0	25,6	17,7	18,8	20,0	21,8	18,6	17,8	18,8	20,9
Masa corporal, g	250	190	170	190	200	220	250	260	270	290	300

10 **Ejemplo 2**

Ocho (8) ratas con diabetes mellitus estreptozotocínica estable se sometieron a xenotransplante intraesplénico de cultivos de células de los islotes. La administración de cultivos de células de los islotes de páncreas de conejos neonatos se condujo en el marco de una narcosis con hexenal. Después de abrir la pared abdominal y realizar una herida quirúrgica en el bazo, se introdujo directamente una suspensión celular en la pulpa del órgano a través de la jeringuilla de 1,2 mm de diámetro. El lugar de la inyección se presionó con un tampón de gasa, ralentizando al hacerlo la hemorragia parenquimatosa y sellándola mediante gotas de pegamento médico especial. La herida de la pared abdominal se cosió capa por capa. Más abajo se dan los resultados generales de tales transplantes, la dinámica exacta de índices de glucemia y masa corporal de animales receptores.

20 Tabla 11. Cambio de glucemia y masa corporal tras la aplicación de estreptozotocina (Stz) y transplante intraesplénico subsiguiente (Tx) de cultivos de células de los islotes de páncreas de conejos neonatos en rata #17.

Índice	Antes de Stz	4 semanas después de Stz	Antes de Tx	Semanas							
				1	2	3	4	5	6	7	8
Glucemia mM/l	5,3	16,7	17,1	16,8	12,2	10,2	10,0	11,2	9,9	8,1	6,6
Masa corporal, g	220	200	200	190	200	240	250	280	320	340	360

25 Tabla 12. Cambio de glucemia y masa corporal tras la aplicación de estreptozotocina (Stz) y transplante intraesplénico subsiguiente (Tx) de cultivos de células de los islotes de páncreas de conejos neonatos en rata #18.

Índice	Antes de Stz	4 semanas después de Stz	Antes de Tx	Semanas							
				1	2	3	4	5	6	7	8
Glucemia mM/l	6,6	24,0	22,1	19,5	18,0	12,6	7,4	6,5	5,7	7,0	10,2
Masa corporal, g	220	180	170	170	180	200	240	290	320	330	360

Tabla 13. Cambio de glucemia y masa corporal tras la aplicación de estreptozotocina (Stz) y trasplante intraesplénico subsiguiente (Tx) de cultivos de células de los islotes de páncreas de conejos neonatos en rata #19.

Índice	Antes de Stz	4 semanas después de Stz	Antes de Tx	Semanas							
				1	2	3	4	5	6	7	8
Glucemia mM/l	5,3	21,2	21,2	17,6	14,4	10,5	11,2	11,4	9,1	10,5	7,4
Masa corporal, g	250	220	210	190	200	210	250	270	300	310	350

5 Tabla 14. Cambio de glucemia y masa corporal tras la aplicación de estreptozotocina (Stz) y trasplante intraesplénico subsiguiente (Tx) de cultivos de células de los islotes de páncreas de conejos neonatos en rata #20.

Índice	Antes de Stz	4 semanas después de Stz	Antes de Tx	Semanas							
				1	2	3	4	5	6	7	8
Glucemia mM/l	6,7	24,5	26,9	14,2	12,8	13,0	8,8	8,4	9,0	7,4	9,8
Masa corporal, g	210	170	170	180	180	200	220	240	270	290	330

Tabla 15. Cambio de glucemia y masa corporal tras la aplicación de estreptozotocina (Stz) y trasplante intraesplénico subsiguiente (Tx) de cultivos de células de los islotes de páncreas de conejos neonatos en rata #21.

Índice	Antes de Stz	4 semanas después de Stz	Antes de Tx	Semanas							
				1	2	3	4	5	6	7	8
Glucemia mM/l	6,0	22,0	21,9	15,5	15,9	14,0	13,5	15,1	13,8	17,0	15,5
Masa corporal, g	250	180	170	170	180	200	220	230	230	240	270

10 Tabla 16. Cambio de glucemia y masa corporal tras la aplicación de estreptozotocina (Stz) y trasplante intraesplénico subsiguiente (Tx) de cultivos de células de los islotes de páncreas de conejos neonatos en rata #22.

Índice	Antes de Stz	4 semanas después de Stz	Antes de Tx	Semanas							
				1	2	3	4	5	6	7	8
Glucemia mM/l	7,1	31,4	28,8	24,2	25,9	22,7	17,0	17,9	18,1	16,7	15,8
Masa corporal, g	220	170	170	160	160	180	200	220	230	250	270

Tabla 17. Cambio de glucemia y masa corporal tras la aplicación de estreptozotocina (Stz) y trasplante intraesplénico subsiguiente (Tx) de cultivos de células de los islotes de páncreas de conejos neonatos en rata #23.

Índice	Antes de Stz	4 semanas después de Stz	Antes de Tx	Semanas							
				1	2	3	4	5	6	7	8
Glucemia mM/l	5,6	16,0	15,5	11,5	9,7	6,6	7,5	5,6	6,6	5,9	5,7
Masa corporal, g	240	260	270	290	300	320	350	370	370	400	410

15 Tabla 18. Cambio de glucemia y masa corporal tras la aplicación de estreptozotocina (Stz) y trasplante intraesplénico subsiguiente (Tx) de cultivos de células de los islotes de páncreas de conejos neonatos en rata #24.

Índice	Antes de Stz	4 semanas después de Stz	Antes de Tx	Semanas							
				1	2	3	4	5	6	7	8
Glucemia mM/l	6,4	21,0	22,6	17,1	15,8	14,2	21,8	18,6	17,8	19,1	19,7
Masa corporal, g	250	230	220	210	200	220	230	240	270	280	360

Los datos se confirmaron posteriormente mediante observaciones con respecto al grupo de control (diabetes sin tratamiento) de ratas diabéticas.

**Ejemplo 3**

5 Se dividieron 26 animales en 3 grupos de 8 ratas cada uno: primer grupo – 8 ratas con hiperglucemia sometidas a xenotransplante de cultivo de células de los islotes a través de administración intraperitoneal. Segundo grupo – 8 ratas con hiperglucemia, que se sometieron a xenotransplante mediante administración intraesplénica. Tercer grupo: 10 ratas con hiperglucemia, que no se trataron en absoluto (control). El mayor número de tales animales se explica por la proyección de su posible muerte durante el transcurso del experimento.

10 A continuación se proporcionan los datos sobre el efecto del xenotransplante intraperitoneal de cultivo de células de los islotes de conejos neonatos durante el curso de diabetes estreptozotocínica en 8 ratas con diabetes mellitus estreptozotocínica expresada.

15 A cada animal receptor, en el marco de una narcosis intraperitoneal con hexenal, se le introdujeron 700.000-800.000 células de los islotes del páncreas de conejos neonatos mediante punción del peritoneo y liberación en la cavidad abdominal.

20 Más abajo se dan los hallazgos sobre las alteraciones de la gravedad del estado diabético en cada una de las 8 ratas de este grupo. A diferencia de las ratas con diabetes estreptozotocínica estable a las que se les administró transplante intraperitoneal o intraesplénico de cultivos de células de los islotes de conejos neonatos, las ratas con la misma gravedad de estado diabético que no se sometieron a ningún tratamiento (control) tuvieron un nivel de glucemia que permaneció establemente elevado durante todo el período de este experimento. Además, ninguna rata receptora murió, pero en el grupo de control, en el marco de un estado diabético severo, murieron 2 animales, lo que constituye 1/5 de los animales del grupo.

25 Más abajo se dan los hallazgos sobre las alteraciones del nivel de glucemia y masa corporal en ratas con diabetes mellitus experimental no tratada.

30 Tabla 19. Cambio de glucemia y masa corporal tras la aplicación de estreptozotocina en rata #9 no sometida a transplante (control)

Índice	Antes de Stz	4 semanas después de Stz	Semanas							
			1	2	3	4	5	6	7	8
Glucemia mM/l	6,4	25,8	23,9	23,4	26,6	24,7	23,3	24,4	22,6	24,3
Masa corporal, g	250	230	210	200	200	180	170	170	180	180

35 Tabla 20. Cambio de glucemia y masa corporal tras administrar estreptozotocina en rata #10 no sometida a transplante

Índice	Antes de Stz	4 semanas después de Stz	Semanas							
			1	2	3	4	5	6	7	8
Glucemia mM/l	7,1	28,7	27,9	>33	29,9	28,4	>33	31,2	e.l.*	
Masa corporal, g	200	180	170	160	160	150	150	130		

\*e.l. – proceso hacia la muerte

Tabla 21. Cambio en glucemia y masa corporal tras administrar estreptozotocina en rata #11 no sometida a transplante (control)

Índice	Antes de Stz	4 semanas después de Stz	Semanas							
			1	2	3	4	5	6	7	8
Glucemia mM/l	6,4	26,8	24,9	23,4	26,6	25,7	27,3	24,9	25,5	23,7
Masa corporal, g	220	220	210	200	190	180	170	180	180	180

Tabla 22. Cambio en glucemia y masa corporal tras administrar estreptozotocina en rata #12 no sometida a transplante (control)

Índice	Antes de Stz	4 semanas después de Stz	Semanas							
			1	2	3	4	5	6	7	8
Glucemia mM/l	6,4	22,8	21,3	23,4	27,6	24,1	25,3	24,7	22,5	23,7
Masa corporal, g	220	200	210	210	190	180	190	200	210	210

5

Tabla 23. Cambio en glucemia y masa corporal tras administrar estreptozotocina en rata #13 no sometida a transplante (control)

Índice	Antes de Stz	4 semanas después de Stz	Semanas							
			1	2	3	4	5	6	7	8
Glucemia mM/l	6,4	21,8	23,0	23,7	24,6	23,6	28,3	24,8	25,0	23,8
Masa corporal, g	220	240	230	220	210	200	190	180	190	200

Tabla 24. Cambio en glucemia y masa corporal tras administrar estreptozotocina en rata #14 no sometida a transplante (control)

Índice	Antes de Stz	4 semanas después de Stz	Semanas							
			1	2	3	4	5	6	7	8
Glucemia mM/l	4,9	26,6	24,5	25,6	27,7	23,6	25,9	25,0	27,2	28,8
Masa corporal, g	200	200	210	200	180	170	180	170	160	160

10

Tabla 25. Cambio en glucemia y masa corporal tras administrar estreptozotocina en rata #15 no sometida a transplante (control)

Índice	Antes de Stz	4 semanas después de Stz	Semanas							
			1	2	3	4	5	6	7	8
Glucemia mM/l	6,9	19,4	19,5	19,6	20,0	18,7	18,7	19,7	19,7	20,3
Masa corporal, g	200	220	210	200	210	210	210	220	220	230

Tabla 26. Cambio en glucemia y masa corporal tras administrar estreptozotocina en rata #16 no sometida a transplante (control)

Índice	Antes de Stz	4 semanas después de Stz	Semanas							
			1	2	3	4	5	6	7	8
Glucemia mM/l	6,7	25,1	25,5	27,6	27,6	25,6	22,9	25,0	22,2	24,1
Masa corporal g	230	220	210	200	190	200	190	180	180	180

15

Tabla 27. Cambio en glucemia y masa corporal tras administrar estreptozotocina en rata #25 no sometida a transplante (control)

Índice	Antes de Stz	4 semanas después de Stz	Semanas							
			1	2	3	4	5	6	7	8
Glucemia mM/l	6,4	27,3	24,5	22,6	27,7	26,1	27,9	e.i.		
Masa corporal, g	210	220	200	190	190	180	180			

Tabla 28. Cambio en glucemia y masa corporal tras administrar estreptozotocina en rata #26 no sometida a transplante (control)

Índice	Antes de Stz	4 semanas después de Stz	Semanas							
			1	2	3	4	5	6	7	8
Glucemia mM/l	5,8	17,7	17,3	18,3	22,9	21,3	19,9	18,3	19,7	17,7
Masa corporal, g	230	250	260	260	250	270	280	280	280	300

#### 5 Ejemplo 4

##### CULTIVOS DE CÉLULAS DE LOS ISLOTES

Se obtuvieron cultivos de células de los islotes según nuestra técnica diseñada a partir de páncreas de conejos neonatos de 1-2 días. Para cada transplante, se usó un cultivo que contiene aproximadamente 200.000-300.000 células beta. Inmediatamente antes del transplante, el cultivo se limpió de suero embrionario de medio de crecimiento añadido previamente, y se recogió en tubos de ensayo de plástico estériles, cada uno de 5 ml de volumen. La fracción adherida de un cultivo se eliminó con la ayuda de un raspador celular especial (firma Corning-Costar). La fracción que flota se separó centrifugando el caldo de cultivo que cubrió la parte inferior del fondo en el que estaba situada la fracción adherida. El volumen final de suspensión celular correspondió al número de operaciones de xenotransplante programadas para el día, y cada mililitro de suspensión debería contener aproximadamente 100.000 células de los islotes (generalmente células beta).

#### 20 Ejemplo 5

##### INSULINOTERAPIA

Para la inyección subcutánea, se usó insulina de acción específica Aktrapid HM, que se administró dos veces al día: 9:00 y 19:00. La dosis se seleccionó individualmente. El criterio de éxito de la insulinoterapia aplicada fue una disminución de hiperglucemia de hasta 10 mmoles/l e inferior.

#### 30 Ejemplo 6

##### ADMINISTRACIÓN DE CULTIVOS DE CÉLULAS DE LOS ISLOTES

La suspensión celular se administró mediante una jeringuilla a través de una aguja de inyección de diámetro grande, punzando la pared abdominal sin anestesia. Para evitar lesiones a los órganos internos y vasos de la rata, la rata se colocó boca arriba, asegurando de ese modo el antidesplazamiento de órganos abdominales y la formación de espacio libre. Después de punzar el peritoneo, se inyectó el transplante celular en este espacio libre.

La operación de la cavidad es necesaria para la administración intraesplénica, de forma que se usó para la narcosis mediante inyección intraperitoneal una disolución de hexenal preparada ex tempore basada en una relación de 50-60 mg por 1 kg de peso corporal. El transplante en la pulpa del bazo se llevó a cabo según lo siguiente: una incisión media a lo largo de la línea blanca abdominal abrió la cavidad abdominal. Se extrajo el bazo en una herida quirúrgica, rodeándola con gasas estériles. La suspensión celular recogida el día anterior se extrajo en la jeringuilla (volumen de 2 ml) y, a través de una aguja de inyección (diámetro de 0,5 mm), se administró en la pulpa del bazo y en la zona subcapsular. Para evitar una hemorragia, la marca de la inyección se cerró mediante pegamento médico MK-6.

#### 45 Ejemplo 7

##### EXAMEN/INVESTIGACIÓN DE LABORATORIO

La glucemia capilar se determinó en animales experimentales usando Glucometr Smart Scan, 2-3 veces a la semana. La insulina sérica se detectó mediante un método inmunoenzimático, usando kits para insulina de conejo (humana) y kits a medida para la detección específica de insulina de rata.

#### 55 Ejemplo 8

##### INVESTIGACIÓN HISTOLÓGICA

Para estudiar la dinámica de alteraciones morfológicas que ocurren en los islotes bajo la influencia de diversos tipos de tratamiento de diabetes mellitus experimental, se fijaron los páncreas de animales eutanasiados en los tiempos

específicos durante el experimento en una mezcla Buena recientemente obtenida. Después de los procedimientos histológicos específicos (lavado del fijador, deshidratación, etc.), los fragmentos de tejido pancreático se sellaron en parafina. Después, secciones microscópicas obtenidas mediante microtomo (5-7 mm de grosor) se desparafinaron y se colorearon con hematoxilina y eosina, así como mediante aldehído-fucsina, con el fin de aislar las células beta.

Para la detección del destino de las células beta transplantadas en la pulpa esplénica de ratas diabéticas, durante tiempos específicos después del trasplante, se pudieron cortar bazos de animales muertos y sus fragmentos, que, juzgando el esquema de la operación y algunas señales externas, supuestamente contienen trasplante, e inmediatamente se fijaron en la mezcla Buena. Después, como se describe anteriormente, se prepararon secciones en parafina y se colorearon de manera específica.

**Ejemplo 9**

**RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN: CARACTERÍSTICAS DEL CULTIVO**

Los cultivos de células de los islotes obtenidos para el trasplante subsiguiente se adecuaron a los criterios funcionales adecuados. Como tal, el estudio en el microscopio invertido demostró que, hacia el período de cultivo de 2 semanas, el cultivo logrado no contenía células de tejido exocrino de páncreas, y que no había elementos celulares lastre, incluyendo "pasajeros" leucocíticos iniciadores del rechazo de las células de los islotes tras su xenotrasplante. Este dato, y la experiencia previa del tratamiento de trasplante de diabetes mellitus experimental, nos asegura que no hay necesidad de administrar ningún tipo de inmunosupresión. Los ensayos de control de contenido de insulina en el caldo de cultivo demostraron que las células beta existentes tienen una actividad productora de insulina elevada (Tabla 29).

Tabla 29. Índices de secreción de insulina basal y estimulada (25 mmoles/l de glucosa) (concentración mkUNIDAD/ml) en cultivo de células de los islotes producido a partir de páncreas de conejos neonatos:

Muestra nº	Basal	Estimulada
1	2360	3330
2	11080	13450
3	7800	8760
4	5580	7650
5	7530	9900
6	8800	12300
7	5090	6850

**Ejemplo 10**

**RESULTADOS DE LA TERAPIA CON INSULINA**

Como se señaló en trabajos previos, la selección de dosis efectivas de insulina en el tratamiento de ratas con diabetes mellitus experimentalmente inducida con estreptozotocina es un trabajo difícil, largo (algunas veces prácticamente interminable) y desagradecido. La resistencia a insulina se revela a menudo en eso. Sin embargo, en la mayoría de los animales del 1<sup>er</sup> grupo de ensayo (5 de 8) se tuvo éxito por medio de dosis elevadas de insulina para reducir la hiperglucemia hasta niveles menores que 10 mmoles/l y mantener tal compensación de la alteración del metabolismo de hidratos de carbono durante el período de 8 semanas (Tabla 30).

Tabla 30. Cambios en la glucemia en ratas con diabetes mellitus inducida experimentalmente (1<sup>er</sup> grupo) bajo la influencia de terapia diaria con insulina.

Nº de rata	Duración de la insulino terapia (días)									
	0	7	13	21	28	35	41	46	53	60
9	17,7	15,5	12,1	10,8	11,9	10,0	7,9	8,5	6,7	6,4
10	28,7	29,0	26,7	22,4	27,8	23,3	22,8	24,9	15,5	18,4
11	18,6	18,9	15,9	11,0	9,7	12,3	11,5	8,6	10,6	9,7
12	16,1	12,0	11,1	8,7	6,7	5,4	6,6	8,1	6,3	6,3
13	29,7	26,7	22,8	13,4	14,5	16,9	18,5	14,6	20,3	18,8
14	24,4	22,2	18,0	22,1	18,3	19,1	17,7	14,8	18,8	14,3
15	19,0	18,7	14,3	11,2	8,6	9,9	10,8	8,6	9,9	7,7
16	24,2	18,8	13,8	9,9	12,0	10,2	9,7	6,7	8,6	8,9
Dosis media (unidad) de insulina	0	4	8	12	16	14,1	12,8	17,6	11,9	13,3

Aunque se tuvo éxito reduciendo el nivel de glucemia en las ratas #10, 13 y 14, la falta de reacción adecuada en respuesta a la introducción de dosis inmensas de insulina (hasta 20-30 unidades por día) no nos permitió descubrir la tendencia a la normalización de la glucemia y admitir la presencia en estos animales de una elevada resistencia a insulina individual; y sería improbable la posibilidad de una regeneración significativa del propio aparato de los islotes, todo lo más de manera que, tras detener la administración de insulina, todas las ratas del 1<sup>er</sup> grupo tuvieron una recaída rápida de hiperglucemia próxima al nivel inicial.

**Ejemplo 11**

10 RESULTADOS DE XENOTRANSPLANTE DE CULTIVOS DE CÉLULAS DE LOS ISLOTES

Se observó un efecto antidiabético expreso de xenotransplante de cultivos de células de los islotes tanto en los casos de inyección de transplante en el peritoneo (2<sup>o</sup> grupo de ratas experimentales), como en su introducción en la pulpa del bazo (3<sup>er</sup> grupo). Se observa efecto en la disminución de la manifestación clínica del estado diabético, y también en el agotamiento expreso del nivel de hiperglucemia. Como muestran los datos presentados en las tablas, el carácter de agotamiento de glucemia en el transcurso de ambos métodos de administración de xenotransplante es en cierto grado diferente entre sí. Estas diferencias comprenden efecto reductor del azúcar, su gravedad, y su persistencia (estabilidad).

20 Tabla 31. Cambios de glucemia en ratas con diabetes mellitus experimental después de xenotransplante intraperitoneal de cultivos de células de los islotes (2<sup>o</sup> grupo)

Nº de rata	Antes del transplante	Días después del transplante							
		2	7	10	13	15	17	20	22
1	24,1	18,7	12,2	15,5	12,0	11,9	14,5	12,4	14,8
2	16,6	15,0	13,0	8,8	6,8	9,0	7,7	6,7	9,1
3	29,0	27,9	16,1	17,7	22,2	18,4	15,5	14,1	16,5
4	21,2	18,8	12,2	13,0	13,0	11,0	12,2	10,5	8,9
5	17,9	14,8	15,5	16,8	15,9	16,0	15,9	14,0	13,7
6	21,9	19,1	14,2	12,8	11,1	8,5	9,0	7,8	7,1
7	17,1	16,6	11,4	9,8	7,0	7,9	6,4	8,1	8,6
8	25,6	21,1	17,7	17,1	18,8	20,7	18,6	21,2	20,0
M	21,7	19,0	14,1	13,9	13,3	12,9	12,3	11,9	12,3

Tabla 32. Cambios de glucemia en ratas con diabetes mellitus experimental después de xenotransplante intraperitoneal de cultivos de células de los islotes (2<sup>o</sup> grupo) - continuación

Nº de rata	24	Días después del transplante							
		26	28	30	32	35	37	40	42
1	13,2	13,9	12,5	14,4	16,8	12,2	15,5	12,0	11,9
2	7,8	7,0	7,4	6,7	5,5	6,4	6,4	5,9	5,5
3	17,2	14,8	12,5	14,7	15,6	14,1	16,5	16,1	17,7
4	10	10,1	9,2	10,5	8,4	7,9	11,1	8,7	9,0
5	13,9	14	15,9	12,4	14,7	15,0	14,3	13,8	15,2
6	8,1	8,0	7,0	6,7	7,1	8,4	9,0	7,8	8,1
7	8,7	7,4	6,4	5,1	6,5	5,6	4,9	5,8	6,1
8	18,8	20,6	21,8	22,2	19,2	18,6	21,2	20,0	17,8
M	11,9	12,0	11,6	11,6	11,7	11,0	12,4	11,3	11,4

25 Tabla 33. Cambios de glucemia en ratas con diabetes mellitus experimental después de xenotransplante intraperitoneal de cultivos de células de los islotes (2<sup>o</sup> grupo)

Nº de rata	44	Días después del transplante						
		46	49	51	53	55	57	60
1	12,5	14,4	16,8	18,2	17,5	16,7	15,6	14,9
2	6,7	5,5	7,0	7,4	6,7	6,8	6,0	5,7
3	15,5	14,1	16,5	16,8	15,9	17,7	15,9	16,0
4	10,0	11,0	9,2	10,5	8,9	7,9	8,3	9,4
5	14,8	15,5	16,8	15,9	16,0	14,6	15,7	17,0
6	8,5	8,0	7,8	7,1	6,7	7,4	6,4	5,1
7	7,1	6,6	5,1	6,8	7,0	7,9	6,4	5,1
8	17,7	17,1	18,8	21,9	19,1	21,0	20,9	17,8
M	11,6	11,5	12,3	13,1	12,2	12,5	11,9	11,4

30 Después de analizar los resultados obtenidos de la medición de la glucemia en ratas con diabetes mellitus experimental en las que se llevó a cabo un xenotransplante intraperitoneal de cultivos de células de los islotes, es posible sacar una conclusión de lograr un efecto antidiabético expreso en la mayoría de los animales receptores.

Como tal, las ratas #2, 4, 6 y 7 tuvieron una remisión de la enfermedad, manifestado en la estabilización de la glucemia a un nivel normal o casi normal.

- 5 Las ratas #1 y 2 demostraron una disminución no tan intensa en el nivel de glucemia, aunque datos estadísticos muy fiables. En tales casos, sólo se puede hablar de una remisión fraccionada del estado hipoglucémico, todo lo más tal que la rata #1 durante las últimas semanas de observación reveló una tendencia de crecimiento de hiperglucemia previamente moderada.
- 10 En otros animales (ratas #5 y 8), la caída de la glucemia no fue tan significativa ni tan estable, hecho lo cual pone en evidencia un fallo de estos dos trasplantes de cultivos de células de los islotes.

Tabla 34. Cambios de glucemia en ratas con diabetes mellitus experimental tras el xenotransplante intraesplénico de cultivos de células de los islotes (3<sup>er</sup> grupo)

Nº de rata	Antes del trasplante	Días después del trasplante							
		2	7	10	13	15	17	20	22
17	17,1	15,5	16,8	13,5	12,2	9,9	12,4	10,2	9,4
18	22,1	21,0	19,5	17,8	18,0	15,6	17,1	12,6	12,1
19	21,2	21,9	17,6	18,7	16,2	14,4	11,8	12,2	10,5
20	26,9	21,8	14,2	13,0	12,8	11,8	12,2	10,5	13,0
21	21,9	14,8	15,5	14,1	15,9	13,6	15,5	14,0	13,3
22	28,8	29,1	24,2	30,8	25,9	21,8	25,2	27,1	22,7
23	15,5	13,6	11,5	8,8	9,0	9,7	7,4	8,0	6,6
24	22,6	23,1	17,1	14,7	15,8	12,2	15,5	12,0	14,2
M	19,3	20,1	17,1	16,2	15,2	13,6	14,0	13,3	12,5

15 Tabla 35. Cambios de glucemia en ratas con diabetes mellitus experimental tras el xenotransplante intraesplénico de cultivos de células de los islotes (3<sup>er</sup> grupo) - continuación

Nº de rata	24	Días después del trasplante							
		26	28	30	32	35	37	40	42
17	10,2	10,9	10,0	9,4	8,7	11,2	10,5	9,8	9,9
18	11,8	8,7	7,4	6,4	5,1	6,5	6,6	7,9	5,7
19	17,7	16,8	11,2	14,0	10,6	11,4	10,6	11,1	9,1
20	8,4	9,0	8,8	8,7	7,5	8,4	9,0	9,7	9,0
21	15,9	12,4	13,5	12,4	14,0	15,1	13,4	13,8	12,8
22	18,1	18,0	17,0	18,1	18,4	17,9	18,1	17,8	18,1
23	9,7	7,4	7,5	6,5	5,4	5,6	5,4	5,8	6,6
24	18,8	20,6	21,8	22,2	19,2	18,6	21,2	20,0	17,8
M	13,8	12,1	12,2	12,2	11,1	11,8	11,9	12,0	11,1

Tabla 35. Continuación

Nº de rata	44	Días después del trasplante							
		46	49	51	53	55	57	60	
17	11,5	10,4	8,1	8,2	8,7	6,7	6,6	4,9	
18	6,7	5,5	7,0	7,4	9,2	10,5	8,9	7,9	
19	10,5	9,4	10,5	8,8	9,9	7,4	8,9	9,1	
20	9,1	6,7	7,4	7,1	11,0	7,8	9,8	7,5	
21	14,8	15,7	17,0	15,9	13,6	14,0	15,5	16,8	
22	17,5	17,8	16,7	16,8	16,0	15,7	14,9	15,8	
23	8,7	6,0	5,9	8,3	7,6	6,7	4,6	5,7	
24	21,5	21,1	19,1	21,0	18,8	21,0	18,9	19,7	
M	12,5	10,3	11,5	11,7	11,9	11,2	11,0	10,9	

- 20 Después del xenotransplante del cultivo de las células de los islotes en la pulpa de un bazo, se observó digresión expresada de hiperglucemia en la mayoría de los animales (7 de 8). En eso, la normalización práctica de la glucemia se produjo en 5 ratas con diabetes mellitus experimental (#17-20, 23). También, en un receptor adicional (rata #21), el nivel de glucemia se agotó significativamente, pero su nivel permaneció en un nivel hiperglucémico medio, y en la segunda mitad del período de observación se notó un incremento gradual de la glucemia, que se puede evaluar incluso como una recaída definida de hiperglucemia elevada. En dos de los animales del grupo (#22 y 24) no se logró un efecto antidiabético amplio, aunque la rata #22 alcanzó una disminución estadísticamente fiable de glucemia, pero no se puede clasificar como remisión de diabetes.
- 25

- 30 Como se señaló previamente, se espera divergencia en los cambios de glucemia en comparación entre métodos de trasplante intraperitoneales e intraesplénicos, pero no parecen ser muy fundamentales. Con el fin de una

simplicidad de comparación, se combinaron los indicadores de glucemia en el 2º y el 3º grupo de animales en dinámica en una tabla (#34).

5 Tabla 36. Dinámica de cambio en glucemia (media) en ratas del 2º grupo (xenotransplante intraperitoneal) y en el 3º grupo (transplante intraesplénico) en ratas receptoras

Grupo nº	Antes del transplante	Días después del transplante							
		2	7	10	13	15	17	20	22
2º	21,7	19,0	14,1	13,9	13,3	12,9	12,3	11,9	12,3
3º	19,3	20,1	17,1	16,2	15,2	13,6	14,0	13,3	12,5
Grupo nº	Días después del transplante								
	24	26	28	30	32	35	37	40	42
2º	11,9	12,0	11,6	11,6	11,7	11,0	12,4	11,3	11,4
3º	13,8	12,1	12,2	12,2	11,1	11,8	11,9	12,0	11,1
2º	11,6	11,5	12,3	13,1	12,2	12,5	11,9	11,4	
3º	12,5	10,3	11,5	11,7	11,9	11,2	11,0	10,9	

10 Después de terminar la parte fisiológica de la investigación, los animales que participaron en este experimento se eutanasiaron de forma indolora. En eso, se tomaron muestras de sangre de los animales experimentales, y el suero procesado se ensayó para determinar la insulina (también de conejo, y de rata). Más abajo se muestran los resultados del análisis inmunoenzimático (inmunoensayo de enzimas) de muestras de suero sanguíneo de ratas receptoras, análisis los cuales se llevaron a cabo utilizando diversos kits especiales (Tabla 35).

Tabla 37. Contenido de insulina exógena (conejo) y propia en suero sanguíneo de ratas sometidas a transplante de cultivos de células de los islotes de páncreas de conejos neonatos

Nº de rata	Insulina de conejo	Insulina de rata	Insulina total
1	16	7	23
2	16	52	68
3	45	11	56
4	23	50	73
5*	-	-	-
6	57	53	110
7	21	48	69
8	9	20	29
17	23	60	83
18*	-	-	-
19	17	134	151
20*	-	-	-
21	4	24	28
22	6	27	33
23	5	74	79
24	0	7	7

\* resultado no verificable debido a la intensa hemólisis (lisis de la masa eritrocítica) del suero.

15 Además, se analizaron muestras de sangre obtenidas después de terminar los experimentos a partir de ratas con diabetes estreptozotocínica, que habían sido sometidas a terapia con insulina. En esto, se examinó el suero para determinar el contenido de insulina humana y de rata (tabla 36) con la utilización de kits correspondientes para análisis inmunoenzimático.

20 Tabla 38. Contenido de insulina humana y de rata en suero sanguíneo de ratas sometidas a terapia insulínica (1º grupo)

Rata nº	Insulina humana	Insulina de rata	Insulina total
9	194	17	211
10*	-	-	-
11	258	24	282
12	79	23	102
13	144	0	144
14	331	4	335
15*	-	-	-
16	261	0	261

\* no se obtuvo un resultado verificable debido a hemólisis intensa

25 No es simple interpretar los resultados obtenidos. La complejidad del análisis está condicionada, en primer lugar, por el hecho de que, demostrado en las tablas, los datos reflejan, en particular, una función productora de insulina de células beta de conejo xenotransplantadas y células beta propias (rata) (Tabla 8), o de insulina humana inyectada e

insulina de rata propia (Tabla 9), sólo en el momento de terminar el experimento de múltiples días. Ciertamente, sería bueno tener datos sobre la dinámica del contenido de tipos variados de insulina en términos variados durante los experimentos. Pero la dificultad extrema de obtener sangre no hemolizada a partir de animales pequeños de laboratorio en cantidades adecuadas para la preparación del volumen necesario de suero sin provocar un trauma grave a los animales, no permite implementarlo sin el riesgo de perder tales animales de laboratorio valiosos. De este modo, estaríamos actuando en base a los datos que están disponibles.

Parece que en la mayoría de los casos (11 de 13) se detectó insulina de conejo en sangre de ratas receptoras, lo que es una prueba indiscutible de la presencia en la sangre de los animales de células beta xenotransplantadas de conejo que segregan, en la sangre del “nuevo propietario”, una insulina relevante a un donante. Esta concentración fluctúa significativamente desde 4 hasta 57 pmoles/l.

El segmento de ratas receptoras en las que se detectó la insulina de su propia especie es incluso mayor (12 de 13). Las fluctuaciones de su contenido son muy grandes – desde 7 hasta 134 pmoles/l. Distintivo de la interpretación de la presencia de insulina xenogénica en animales sometidos a xenotransplante de células de los islotes, es imposible dar una estimación de un solo valor a la detección de una o las otras concentraciones de insulina segregada por células beta de ratas de laboratorio con diabetes experimental. Es posible evaluar más o menos objetivamente los datos obtenidos, cuando se considera la proporción de varios datos cuantitativos interrelacionados, a saber: interconexión de nivel de glucemia y de insulinemia total, relación de insulina de rata y de conejo (en ratas receptoras) o insulina humana (en ratas sometidas a inyección de su preparación), y también a intentar correlacionar la dinámica de la glucemia desde el comienzo al final de la observación con insulinemia diferente (en especie de origen (específica)).

Se llevó a cabo un análisis en orden selectivo, pero caracterizante para patrones consistentes comunes, y se repasaron diversas correlaciones de indicadores de glucemia y concentración de insulina en suero sanguíneo de animales de laboratorio. De cada grupo, se seleccionaron 3 ratas con resultados más representativos de los exámenes de laboratorio, y se tabularon todos los datos en una tabla (Tabla #37).

Tabla 39. Indicadores de glucemia e insulinemia en algunas ratas del 2º, 3º y 1º grupo de ratas experimentales con diabetes mellitus experimental

Nº de rata	Glucemia inicial mmol/l	Glucemia final mmol/l	Insulina de conejo (humana) pmol/l	Insulina de rata pmol/l	Insulina total pmol/l
2	16,6	5,7	16	52	68
4	21,2	9,4	23	50	73
8	25,6	17,8	9	20	29
17	17,1	4,9	23	60	83
19	21,2	9,1	17	134	151
24	22,6	19,7	0	7	7
9	17,7	6,4	194	17	211
14	24,4	14,3	331	4	335
16	24,2	8,9	261	0	261

Se realizó el análisis de los resultados extraídos en el 2º grupo experimental (xenotransplante de cultivos de células de los islotes en peritoneo). En ambos casos con éxito (ratas #2 y #4), la remisión del estado diabético fue acompañada por una disminución significativa de la glucemia – de 16,6 y 21,2 mmoles/l a 5,7 y 9,4 mmoles/l, respectivamente. En eso, al final de la observación de 2 meses se observa la normalización de niveles de insulinemia (respectivamente hasta 68 y 73 pmoles/l) principalmente a causa de la restauración de las actividades productoras de insulina de las propias células beta de ratas receptoras (52 y 50 pmoles/l, respectivamente), aunque parece ser relativamente suficiente la participación de la insulina segregada por células beta xenotransplantadas de conejos neonatos (16 y 23 pmoles/l, respectivamente). El tercer animal de ese grupo (rata #8), con un nivel inicialmente mayor de hiperglucemia (25,6 pmoles/l), demostró el funcionamiento de las células beta transplantadas (concentración de insulina de conejo 9 pmoles/l) junto con las propias células beta (concentración de insulina de rata – 20 pmoles/l). La producción de insulina total (básicamente a causa de los propios esfuerzos de los islotes del páncreas del receptor) aseguró una caída estadísticamente significativa en la hiperglucemia (hasta 17,8 pmoles/l); sin embargo, esto no fue suficiente para lograr la remisión del estado diabético.

En el 3º grupo experimental (xenotransplante interesplénico de células de los islotes), se escogieron como ejemplos a las ratas #17 y #19, y tuvieron una glucemia inicial y final muy similar a aquellos en ratas #2 y 4 del 2º grupo. Sin embargo, si los datos sobre glucemia e insulinemia en las ratas #2 y 17 parecen ser muy próximos (respectivamente: glucemia inicial 16,6 y 17,1 mmoles/l, glucemia final – 5,7 y 4,9 mmoles/l, insulina de rata – 52 y 60 pmoles/l), entonces en las ratas #4 y #19 con igual glucemia inicial (21,2 y 21,2 mmoles/l) y similar glucemia final (9,4 y 9,1 mmoles/l), la insulinemia total pareció ser muy distinta (más de 2 veces – respectivamente 73 y 151 pmoles/l). En tal, esta distinción fue debida en general a diferencias en la concentración de insulina de rata (respectivamente 50 y 134 pmoles/l).

- 5 En ratas del primer grupo, debido a insulino terapia superintensa, fue posible lograr un contenido normal o casi normal de glucosa en la sangre. Aparentemente, debido a la restauración del metabolismo perturbado aplicable, aparecieron condiciones para la restauración parcial del conjunto de las propias células beta de los animales experimentales. Sin embargo, el grado de regeneración lograda parece ser deficiente para esta cantidad de células beta regeneradas para producir cantidades de insulina suficientes para afectar significativamente el desarrollo de diabetes mellitus experimental.
- 10 En algunas ratas que se sometieron a xenotransplante de cultivos de células de los islotes y que demostraron remisión del estado diabético, sólo se observó una regeneración parcial de las células beta (Figura 6). Sin embargo, el efecto antidiabético fue proporcionado, probablemente, por la actividad productora de insulina de células beta de conejos neonatos transplantadas con éxito en ratas receptoras. Esto está indicado por los hallazgos de investigación del contenido de insulina xenógena (de conejo) y de insulina propia (de rata) en sangre (tabla 8).
- 15 La investigación de los páncreas de ratas con diabetes mellitus experimental, en los que se observó un efecto antidiabético significativo después del xenotransplante de cultivos de células de los islotes de conejos neonatos, reveló una regeneración de las células beta. En tal, el proceso restaurador señalado se observó, como regla, exactamente en los islotes de Langerhans, precisamente en los lugares de su localización.
- 20 La coloración especial de tejido de páncreas de ratas receptoras sometidas a un xenotransplante con éxito de los cultivos de células de los islotes demostró que la regeneración de las estructuras de los islotes de Langerhans había ocurrido, generalmente, a causa de las células beta. Al mismo tiempo, se observa la aparición de células beta de un solo punto (coloreadas mediante aldehído-fucsina) fuera de la localización de los islotes, lo que puede indicar indirectamente la posibilidad de generación de células beta fuera de las estructuras de los islotes, probablemente el epitelio de los conductos.
- 25 En consecuencia, basándose en resultados de experimentos científicos realizados, es posible realizar varias conclusiones generales: la estreptozotocina provoca un efecto destructor general sobre las células beta de las células de los islotes pancreáticas, pero al mismo tiempo, directa o indirectamente, conduce a la pérdida de otras células.
- 30 Parece que el proceso regenerativo en islotes de Langerhans afectados ocurre, principalmente, debido a la restauración del conjunto de células beta.
- 35 La insulino terapia intensa no es capaz sólo debido a normalización del estado glucémico de proporcionar un proceso de rehabilitación decentemente expreso en islotes pancreáticos de ratas con diabetes mellitus estreptozotocínica.
- 40 Los cultivos de células de los islotes producidos a partir de páncreas de conejos neonatos que utilizan un método original consisten, principalmente, en células beta purificadas de elementos celulares lastre, y tienen una actividad productora de insulina muy elevada.
- 45 El xenotransplante tanto intraperitoneal como intraesplénico de cultivos de células de los islotes en ratas con diabetes mellitus estreptozotocínica experimental, en la mayoría de los casos, asegura una remisión estable del estado diabético durante al menos 8 semanas.
- 50 El efecto reductor de azúcar después del trasplante se asegura tanto por el funcionamiento de células beta transplantadas como por la actividad productora de insulina del conjunto hasta cierto grado restaurado de células beta en islotes de páncreas de ratas receptoras. Esto está apoyado por hallazgos en las fluctuaciones de las concentraciones de insulina exógena (de conejos) y propia (de ratas) en sangre de animales experimentales.
- 55 Los exámenes histológicos de páncreas de ratas experimentales confirmaron el papel insignificante de la insulino terapia intensiva y la estimulación expresada de procesos regenerativos en islotes de ratas con diabetes mellitus estreptozotocínica tras el trasplante de cultivos de células de los islotes.
- 60 Posiblemente, la regeneración de células beta se produce no sólo en las fronteras de la localización de los islotes de Langerhans, sino también en ciertas estructuras del tejido pancreático fuera de los islotes.
- 65 Es difícil dar una interpretación a estos resultados. Sólo se puede avanzar una versión de trabajo – la presencia de sensibilidad reducida de receptores de insulina en la rata #19 frente a su propia insulina. La disminución insignificante de hiperglucemia en la rata #24 se puede explicar por la falta, aparentemente, de células beta xenotransplantadas (insulina de conejo – 0) inestables (o rechazadas debido a incompatibilidad inmunológica, o carentes de su actividad productora de insulina como resultado del fenómeno de apoptosis) y la débil actividad hormonal de las propias células beta del animal (insulina de rata – 7 pmoles/l).
- Exactamente la sensibilidad reducida señalada anteriormente de los receptores de insulina (pero exactamente con respecto a introducidos desde el exterior (insulina humana sintetizada) puede explicar niveles muy elevados de insulinemia (respectivamente 194, 331 y 261 pmoles/l) en ratas del 1<sup>er</sup> grupo (#9, 14 y 16) que han sido sometidas a

insulinoterapia diaria. En eso, la concentración de la propia insulina en estos animales fue baja (en ratas 9 y 14) o incluso no se detectó en absoluto (rata #16).

5 Es una posibilidad que la presencia en la sangre de grandes cantidades de insulina exógena evitó una actividad más significativa de las propias células beta de los islotes de páncreas de ratas del 1<sup>er</sup> grupo.

10 La concentración elevada de insulina exógena, debido a la regla de la retroalimentación, facilitó la atrofia peculiar del aparato de los islotes, "la atrofia por desuso". Sin excluir que en el fondo de la terapia de insulina superintensiva, cuyo régimen no puede competir con la secreción normal de insulina por páncreas endocrino sano, las ratas demostraron episodios hipoglucémicos expresos, que fueron reprimidos por la ingesta excesiva de alimentos (la alimentación era ilimitada), que en sí mismo aumentó los requisitos de insulina administrada. Naturalmente, debemos considerar el impacto prodiabético de todo el grupo de hormonas cuya concentración está incrementada bruscamente en el proceso de desarrollo del estado hipoglucémico, y un impacto de variedad de situaciones inductoras de estrés, tales como extracción de sangre, intervenciones quirúrgicas, etc.

15 En contraste con la terapia de insulina intensiva, más exactamente terapia hiperinsulínica, el efecto antidiabético del xenotransplante de cultivos de células de los islotes pasa por la secreción en la sangre de los animales receptores de cantidades de insulina que es segregada por células beta transplantadas más o menos adecuadas al nivel de glucemia. Además, la secreción de insulina se produce en la cavidad abdominal o en el bazo, dando como resultado que la hormona alcance el sistema de la vena porta, que se puede considerar como prácticamente fisiológico, es decir, el camino natural para el organismo.

20 Las investigaciones experimentales con éxito, que demostraron un efecto antidiabético elevado del injerto de célula de los islotes obtenida de páncreas de conejos neonatos, permitió usar tales cultivos en la práctica clínica.

25 **Ejemplo 12**

XENOTRANSPLANTES INTRAMUSCULARES DE CULTIVOS DE CÉLULAS DE LOS ISLOTES

30 Un total de 112 pacientes con diabetes mellitus de tipo 1 estuvieron bajo observación dinámica bien documentada. De 112 pacientes, había 58 hombres, y 54 mujeres. La edad de los pacientes en el momento del transplante fue de 16 a 53 – media de 33,5 años de edad.

35 Se sabe que la gravedad de la manifestación de las complicaciones diabéticas secundarias depende significativamente de la duración de la enfermedad. Supuestamente, la distribución de las propias células beta del paciente como resultado de un proceso autoinmunitario se produce aproximadamente en el 5<sup>o</sup> año tras la manifestación de la enfermedad. Las complicaciones diabéticas secundarias se manifiestan ellas mismas habitualmente en pacientes con una duración de la enfermedad de más de 10 años. Debido a eso, todos los pacientes se dividieron en 3 grupos en referencia a la duración de la enfermedad: a.) 1 a 5 años – 16 personas; b.) 6 a 10 años – 43 personas; c.) más de 10 años – 53 pacientes. Todos los pacientes se han examinado para determinar el carácter de desarrollo de diabetes mellitus y establecer la presencia de complicaciones diabéticas.

40 Habitualmente, los cultivos de las células de los islotes recibidos a través de los métodos descritos anteriormente de 50-60 páncreas de conejos neonatos de 1-2 días se usaron para la dosis de transplante para un paciente.

45 Cada dosis del cultivo contuvo 1,5-2,0 ml de células beta. Recogidos inmediatamente antes del transplante, los cultivos de las células de los islotes se inyectaron a través de la jeringuilla en el músculo recto mayor del abdomen bajo anestesia local. No se usó supresión inmunitaria.

50 Más abajo se encuentra la descripción de la técnica de transplante de cultivos de células de los islotes.

Una dosis de cultivos de células de los islotes representa una suspensión estéril en disolución salina de Hank (volumen de 10-15 ml) colocada en un tubo de plástico marcado de forma apropiada. Usando una aguja de inyección de no menos de 7 cm de longitud y más de 1 mm de diámetro, la suspensión de células de los islotes se recogen en una jeringuilla de 20 ml de volumen.

55 En el lado derecho del ombligo de los pacientes, en la zona de proyección del músculo recto mayor del abdomen, utilizando una jeringuilla separada y la aguja de inyección correspondiente, se llevó a cabo la anestesia local por infiltración de la pared abdominal frontal (mediante novocaína u otro anestésico).

60 Tras la anestesia, se usó la aguja de inyección para llevar a cabo una punción del espacio sub-aponeurósico del músculo recto mayor del abdomen, y la suspensión de los cultivos de las células de los islotes. El lugar de la inyección se cierra mediante una venda estéril.

65 Además de la administración tradicional de los cultivos de las células de los islotes en el músculo transversal abdominal, un método más complejo pero más fisiológico de transplante ha encontrado su aplicación – el transplante

a través de la vena porta, cuyo acceso está actualizado mediante sondaje de la vena umbilical obliterada. Hay algunos aspectos a considerar (casi 20 de tales trasplantes se analizaron completamente), ya que debido a este método de administración, se logra una acción de trasplante reductora de azúcar más rápida y más expresada, así como una reducción significativa de los requisitos de insulina exógena (Shumakov et al., 1993 {16}). Sin embargo, el grado de efecto terapéutico del trasplante intraportal de cultivos de células de los islotes de páncreas de conejos neonatos sobre complicaciones diabéticas secundarias es prácticamente indistinguible de los efectos del trasplante intramuscular. Debido a las complejidades técnicas específicas y posibles riesgos quirúrgicos de este método, se ha abandonado, y casi todos los trasplantes se realizan utilizando un método simple y seguro de inyección de la suspensión celular en la aponeurosis del músculo transversal abdominal.

Al mismo tiempo, mientras se llevan a cabo series de trasplantes intraportales, se examinó la capacidad de las células beta contenidas en los cultivos de las células de los islotes de conejos neonatos para responder a los estímulos correspondientes mediante secreción in vivo, es decir, en un organismo de un paciente con diabetes tipo 1. Cinco pacientes masculinos se sometieron a esta investigación; su edad varió de 25 a 45 años, historia de la enfermedad – de 12 a 25 años. Junto con la guía control del aparato de televisión de pantalla de rayos X, a través de la vena subclavicular izquierda, el catéter se colocó en la vena hepática derecha. Se llevó a cabo instantáneamente la extracción de sangre (5 ml) de las venas hepática y porta (a través del catéter trans-umbilical que se había colocado durante el trasplante previo del cultivo de células de los islotes. Después de eso, con el fin de estimular localmente los cultivos de células de los islotes transplantados intraportalmente de páncreas de conejos neonatos, se inyectó en la vena porta alrededor de 20 ml de disolución de glucosa al 20%, en analogía con una tasa de 1 gramo de glucosa por 1 kilogramo de peso corporal del paciente, que se había usado en el ensayo de carga intravenoso. La extracción de sangre de las venas porta y hepática se realizó en 1 min., en 5 min., en 15 min., en 30 min., y en 60 minutos después de la administración de glucosa. Un examen de la sangre para determinar el contenido de insulina mostró, antes de la estimulación que ya había una diferencia entre las concentraciones de insulina en la vena porta y en la vena hepática (respectivamente  $4,9 \pm 0,6$  y  $6,1 \pm 1,0$  mkUNIDAD/ml). En 1 minuto después de la administración de glucosa, se observó que la concentración de insulina aumentó 1,5 veces en la vena hepática (de  $6,1 \pm 1,0$  a  $9,1 \pm 1,3$  mkUNIDAD/ml;  $p < 0,05$ ), que es el doble tan grande como su concentración en la vena porta ( $4,2 \pm 0,5$  mkUNIDAD/ml). Hacia el 5º minuto después de la estimulación, la concentración de insulina en la vena hepática volvió al nivel inicial, y a partir del minuto 15º disminuyó significativamente, lo que indica, presumiblemente, un agotamiento tras la estimulación de la función productora de insulina de los cultivos de células de los islotes de conejos neonatos implantados en el sistema portal del hígado.

Estos resultados demuestran una capacidad sustancial productora de insulina (en respuesta a la estimulación por glucosa) de células beta de cultivos de células de los islotes xenotransplantados en el hígado del receptor, y su posible capacidad para funcionar en el principio de “reacción por retroalimentación”.

La prueba del funcionamiento de células beta transplantadas de páncreas de conejos neonatos se demostró mediante este método original (único) debido a que es todavía imposible detectar la producción de insulina mediante trasplante basándose en la secreción del péptido C, debido a la falta de existencia en el mundo de kits para la identificación inmunorradiológica o por inmunofermentación de péptido C de conejos.

### Ejemplo 13

#### RESULTADOS GENERALES DE XENOTRASPANTE DE CULTIVOS DE CÉLULAS INSULARES PANCREÁTICAS A RATAS CON DIABETES MELLITUS EXPERIMENTAL

La capacidad de los cultivos de células insulares pancreáticas, recibidos a través del método original de páncreas de conejos neonatos, para sobrevivir y funcionar en un entorno in vivo se ha demostrado en experimentos de xenotrasplante de tales cultivos a animales con diabetes mellitus experimental.

Como animales experimentales, se usaron ratas macho de la línea Wistar de masa corporal de 180-220 g, alimentadas regularmente. La diabetes mellitus experimental se provocó mediante aplicación subdérmica de aloxano (dosis de 200 mg por 1 kg de peso corporal) o mediante aplicación subdérmica de estreptozotocina (dosis de 60 mg/kg). Durante los experimentos y sondas de control, sólo se usaron ratas con diabetes inducida por aloxano o por estreptozotocina, cuyos niveles de glucemia en el estómago vacío fue 20 mmol/l y superior. Los ensayos realizados previamente indicaron que tales animales no tienen inversión espontánea de diabetes mellitus experimental.

Después del trasplante de cultivos de células de los islotes pancreáticas, 88 de 104 ratas con diabetes mellitus estable o grave inducida por aloxano (casi 85%) presentaron una remisión firme del estado diabético hasta el final del período experimental (20 semanas). En la sangre de los animales receptores se registró una disminución firme de los niveles de glucemia de hasta casi los normales. Al mismo tiempo, también se desvanecieron los síntomas clínicos característicos de la diabetes (tales como pérdida de peso, polidipsia, poliuria). El efecto antidiabético del xenotrasplante se demostró claramente tanto en casos de aplicación de cultivos en el hígado (a través de la vena porta, o directamente en el parénquima hepático) como también en el bazo (los cultivos se introdujeron en la intrapulpa), y también a través de los músculos abdominales. Incluso después de 8 semanas después del

xenotransplante, se detectaron células pancreáticas de los islotes con estructura conservada y con signos de actividad secretora en lugares de la implantación en ratas, con remisión de la diabetes experimental.

5 Durante la serie especial de experimentos, el papel del cultivo preliminar de las células pancreáticas de los islotes *in vitro* se demostró claramente en la supervivencia de células en organismos de receptores xenogénicos. Para ese fin, se llevaron a cabo análisis comparativos de los resultados del xenotransplante de cultivos de células pancreáticas de los islotes de páncreas de fetos humanos y de xenotransplante de tejido de islotes fetal no cultivado a ratas con diabetes mellitus experimental. Se detectó que el efecto reductor del azúcar está más expreso y dura más en los  
10 casos de transplante de células pancreáticas de los islotes precultivadas, en comparación con el transplante de tejido de páncreas no cultivado, lo que da como resultado una remisión de período corto del estado diabético. Así, el resultado inmunomodulador del cultivo *in vitro* se demostró experimentalmente para aumentar significativamente la duración de la supervivencia en un organismo de un receptor extraño.

15 Los páncreas de 18 ratas receptoras, en las que se llevó a cabo un xenotransplante con éxito de cultivos de páncreas de conejos neonatos, se sometieron a examen histológico en 8 semanas después del transplante. Para ese fin, se fijó un fragmento de páncreas en *disolución de Buena*, y se sumergió en parafina. Las rebanadas (5-7 mm de grosor) se colorearon mediante hematoxilina y eosina, y también mediante aldehído-fucsina, para revelar las células  $\beta$ . Al mismo tiempo, se examinaron con cuidado los páncreas de 6 animales de control que tenían diabetes inducida por aloxano no tratada, así como los páncreas de 6 ratas sanas (a las que no se les aplicó aloxano).

20 Mientras se examinó los páncreas de ratas intactas sanas, alrededor de 45 a 76% de células beta, como era de esperar, se encontraron en los islotes de "Langerhans". Las ratas con diabetes inducida por aloxano sin tratar tuvieron una cantidad bruscamente reducida de células  $\beta$  en los islotes – de media 8,3 +- 1,1%.

25 En las ratas receptores se descubrió una cantidad significativamente mayor de células beta. Los animales que habían sido sometidos a xenotransplante de cultivos de células pancreáticas de los islotes, sus propios páncreas presentaron células  $\beta$  típicas, y su reparto entre células "insulares" fue de 10 a 55% (alrededor de 7 a 21%) (media 23,5 ± 8,8%).

30 Con respecto a estos experimentos, se supone que se produce un efecto antidiabético del xenotransplante de cultivos de OK en los desarrollos de diabetes experimentales en ratas de 2 formas generales: a.) funcionamiento de células  $\beta$  transplantadas, confirmado, además de un efecto reductor de azúcar expreso, también revelando grupos de células de los islotes pancreáticas transplantadas en la pulpa del bazo de animales receptores; b.) efecto  
35 estimulante del transplante de cultivos de células pancreáticas de los islotes en los aparatos de los islotes de páncreas de ratas receptoras, que posiblemente está confirmado por los datos de exámenes histológicos que revelan la existencia significativamente frecuente de islotes con células  $\beta$  normales y una distribución mayor de ellas en los islotes de páncreas de ratas receptoras que de ratas con diabetes inducida por aloxano sin tratar. La investigación experimental con éxito sentó las bases para llevar a cabo el transplante génico de células de islotes de páncreas de conejos neonatos en pacientes con diabetes tipo 1.

40 **Ejemplo 14**

45 **TRANSPLANTE CLÍNICO DE CULTIVOS DE CÉLULAS PANCREÁTICAS DE LOS ISLOTES PRODUCIDAS A PARTIR DE PÁNCREAS DE CONEJOS NEONATOS**

Un total de 112 pacientes con diabetes mellitus tipo 1 (diabetes mellitus insulino dependiente – IDDM) estuvo bajo supervisión dinámica bien documentada. Del total de 112 pacientes, 58 fueron hombres, y 54 fueron mujeres. La edad de los pacientes en el momento del transplante varió de 16 a 53 – media 35 años de edad.

50 Se sabe que la gravedad de la manifestación de las complicaciones diabéticas secundarias depende significativamente de la duración de la diabetes mellitus insulino dependiente. Supuestamente, la destrucción de las propias células  $\beta$  del paciente como resultado del proceso autoinmunitario ocurre aproximadamente en el 5º año después de la manifestación de la enfermedad. Las propias complicaciones diabéticas secundarias se manifiestan habitualmente en pacientes con una duración de la enfermedad de más de 10 años. Debido a eso, todos los  
55 pacientes con diabetes mellitus insulino dependiente se dividieron en 3 grupos en referencia a la duración de la enfermedad: a.) 1 a 5 años – 16 personas; b.) 6 a 10 años – 43 personas, c.) más de 10 años – 53 pacientes. Todos los pacientes se examinaron con el objetivo de determinar el carácter del desarrollo de la diabetes mellitus insulino dependiente, y confirmar la presencia de complicaciones diabéticas.

60 Habitualmente, para el transplante a un paciente, se usaron cultivos de OK recibidos a través de los métodos descritos anteriormente, de 50-60 páncreas de conejos neonatos de 1-2 días. La suspensión se suministró habitualmente en el músculo abdominal transversal bajo anestesia local. No se usó supresión inmunitaria.

Más abajo se dan los resultados del xenotransplante de cultivos de células pancreáticas de los islotes en el curso del desarrollo de diabetes mellitus insulino dependiente, sobre la expresión de sus complicaciones en pacientes de diferente duración de la enfermedad.

5 *TRANSPLANTE DE CULTIVOS DE CÉLULAS PANCREÁTICAS DE LOS ISLOTES DE CONEJOS NEONATOS A PACIENTES CON DIABETES MELLITUS INSULINO DEPENDIENTE DE 1 A 5 AÑOS*

5 de 16 pacientes de este grupo tuvo diabetes mellitus insulino dependiente con un carácter muy lábil. 2 de ellos tuvieron condiciones hipoglucémicas espontáneas (sin razones provocadoras conocidas) frecuentes (varias a la semana), que provocaron numerosos intentos de tratamiento del paciente hospitalizado, pero todos los intentos para estabilizar el curso de la enfermedad o para determinar la dosificación de insulina no fueron beneficiosos. 3 pacientes tuvieron diabetes mellitus insulino dependiente lábil, con posibilidad de desarrollar cetosis difícilmente eliminable; los intentos para alcanzar la compensación metabólica sólo produjeron un efecto a corto plazo.

15 Tres pacientes (2 de ellos con diabetes mellitus lábil) revelaron síntomas de neuropatía motora sensorial – parestesia y dolor por distensión en los músculos gemelos. Después del xenotransplante intramuscular de cultivos de células pancreáticas de los islotes, la mayoría de los pacientes notó una reducción en los niveles medios diarios de glucemia habitualmente elevados, durante 2-4 semanas. La retención de su valor en el intervalo que corresponde a una buena compensación del metabolismo de hidratos de carbono (media 7,8 a 9,9 mmoles/kg) se observó adicionalmente durante al menos 12 meses de supervisión después del transplante. En esto, en todos los 5 pacientes con IDDM lábil, el curso de la enfermedad adquirió naturaleza estable: desapareció la predisposición a las condiciones hipoglucémicas y a la cetosis. La mejora del control glucogénico después del transplante de cultivos de células pancreáticas de los islotes de conejos neonatos confirma la información sobre la determinación de hemoglobina glucosilada en la sangre de los receptores (reducción de 12,4% a 9,6%, 8,3 y 10,1% antes del transplante con relación a 6, 9 y 12 meses después del transplante. La elevación de la compensación de la diabetes mellitus insulino dependiente y la tendencia clara a la reducción del nivel diario medio de glucemia nos permitió hacia el final del 1<sup>er</sup> mes reducir en cierto modo la dosis de insulina administrada (media 12%), que permaneció en cierto modo reducida en 3, 6, 9 y 12 meses después del transplante – relativamente para 31,5%, 36,2%, 25,5%, y 18,4%. En esto, los requisitos de 3 pacientes de insulina exógena disminuyó entre el 4<sup>o</sup> mes y los meses después del transplante en más de 50% (de 54% a 86%), y al mismo tiempo, para 2 pacientes, la dosis de insulina administrada hacia el mes 1-3 después del período de transplante se incrementó en cierto modo temporalmente (durante un período de 2-4 semanas) para 13% y 12%.

35 Debido a que en los pacientes con historia de la diabetes mellitus insulino dependiente de menos de 5 años existe la posibilidad de la presencia de las propias células  $\beta$ , sería de esperar la evaluación de la secreción residual del péptido C antes del transplante (los análisis se llevaron a cabo automáticamente con la ayuda del método de inmunofluorescencia, cuyos parámetros habituales del contenido de péptido C en suero sanguíneo es 0,5-3,5 ng/ml). Parece que, antes del transplante, sólo 3 de 6 pacientes (19%) no tuvieron secreción de péptido C ni basal (en el estómago vacío) ni estimulado (mediante desayuno estándar). La duración de su historia de diabetes mellitus insulino dependiente fue mayor que 3 años. El nivel medio de péptido C basal y estimulado en pacientes con duración de la enfermedad de 1 a 5 años (incluyendo exponentes cero en 4 de ellos) es relativamente de 0,12 y 0,36 ng/ml. Después del transplante, en 2 de 3 “receptores negativos al péptido C”, se registró una concentración – primero estimulada, después (hacia el 3<sup>er</sup> mes – una secreción basal de péptido C, que indicó una restauración de la secreción de insulina por las propias células  $\beta$  del paciente. Los “receptores positivos al péptido C” demostraron un incremento sustancial del contenido de péptido C en suero sanguíneo, que en 5 pacientes alcanzó incluso el factor normal. Es importante señalar que hacia el final del primer año de observación no hubo una tendencia expresa al agotamiento del péptido C en la sangre de los receptores. Tales fueron los cambios observados durante los 12 meses después del primer transplante a pacientes con diabetes mellitus insulino dependiente con historia de duración de la enfermedad de 1 a 5 años.

50 Nueve pacientes de este grupo con un intervalo medio de  $13,3 \pm 1,8$  meses se sometieron a trasplantes intramusculares repetidos de cultivos de células pancreáticas de los islotes de conejos neonatos: 1 paciente – tres veces, 3 pacientes – dos veces, y 5 pacientes – una vez. Ninguno de estos pacientes presentó signos locales o generales de rechazo/desenganche del transplante, ni ninguna reacción alérgica.

55 Ocho de 9 pacientes, que habían sido sometidos a transplante repetido, revelaron efecto terapéutico de un valor no menor que en el transplante inicial. En 3 de 4 pacientes, que se sometieron a xenotransplante de cultivos de células pancreáticas de los islotes, se observó un incremento de tres veces (es decir, + 2 veces repetidas) el efecto clínico, tal como un incremento en la masa muscular y una mejora significativa del tono vital. En esto, se mantuvo el curso estable de la diabetes mellitus insulino dependiente, y los síntomas de las complicaciones diabéticas secundarias estaban ausentes. El único paciente en este grupo que soportó 4 trasplantes (hacia el final de este experimento, la historia de su enfermedad no fue mayor que 9 años) durante los 5,5 años de observación no demostró signos de desestabilización del curso de la enfermedad (antes del 1<sup>er</sup> transplante era muy lábil), y tampoco signos de angiopatía diabética. Parece que el efecto acumulado de los trasplantes repetidos está gobernado por el incremento en la actividad secretora del propio aparato insular de los receptores, confirmado por el incremento de la concentración de péptido C humano tanto basal como estimulado con cada transplante.

*TRANSPLANTE DE CULTIVOS DE CÉLULAS INSULARES PANCREÁTICAS DE CONEJOS NEONATOS A PACIENTES CON HISTORIA DE ENFERMEDAD DE 6 A 10 AÑOS*

5 Un total de 43 pacientes con diabetes mellitus insulino dependiente, con duración de la enfermedad de 6 a 10 años, estuvo bajo supervisión (duración media 7,8 años); 24 hombres y 19 mujeres. La edad de los pacientes en el momento del primer trasplante estaba en el intervalo de 15 a 43 años (media 28,3). 12 pacientes tuvieron un carácter lábil tremendamente expreso de la enfermedad, que no se había estabilizado durante varios intentos de tratamiento del paciente hospitalizado. 16 pacientes tuvieron síntomas secundarios de complicaciones de diabetes mellitus insulino dependiente; 9 de ellos tuvieron neuropatía sensoriomotora solamente, y desarrollaron nefropatía (etapa 3 de Mogensen), 2 pacientes tuvieron neuropatía autónoma (predisposición a taquicardia), y 2 receptores desarrollaron retinopatía no proliferante.

15 En 1-2 meses después del xenotrasplante, los 12 pacientes con el estatus de diabetes mellitus insulino dependiente lábil anterior cambiaron a un estado más controlado y más manejable. Habitualmente, también se produjo la estabilización de los índices de metabolismo de hidratos de carbono. Como tal, antes del trasplante, la glucemia media diaria de los receptores fluctuó entre 9,6 y 14,1 mmol/l, pero en 1 mes después del trasplante la glucemia diaria fue 6,6 a 11,2 (media 8,6 mmol/l). La reducción máxima de este índice se notó hacia el período del 3<sup>er</sup> mes (7,8 mmol/l), pero hacia el final del período de 1 año todavía siguió siendo satisfactoria – a un nivel de 8,8 mmol/l).

25 La mejora en la compensación del metabolismo de hidratos de carbono se confirmó mediante el cambio de cantidad de hemoglobina glucosilada en la sangre de los pacientes desde 12% antes del trasplante (media) su nivel a los 3 meses ya era 10,8%, a los 6 meses 9,4%, a los 9 meses aumentó en cierta medida (hasta 10,9%), pero al final del año se redujo nuevamente a 9,8%.

30 También, en la mayoría de los pacientes en este grupo una disminución forzada de la dosis de insulina administrada diariamente en comparación con el nivel antes del trasplante: en 3 meses después del trasplante disminuyó de media 15,22%, en 6 meses – 30,1%, en 9 meses – 27,0%, en 12 meses – 25,1%.

35 A pesar de la historia de diabetes mellitus insulino dependiente significativa en este grupo de pacientes (de 6 a 10 años – de media 7,8), sólo aproximadamente 75% (32 pacientes) antes del trasplante no tuvieron secreción de insulina propia (péptido C completamente ausente). Debido a que otros pacientes en este grupo tuvieron un nivel basal de péptido C que varió de 0,05 a 0,2 ng/ml, y un nivel estimulado – de 0,1 a 0,3 ng/ml, su concentración media en el grupo antes del trasplante fue, en el estómago vacío, 0,07, y, después de la estimulación, 0,08 ng/ml. Después del trasplante, se produjo un incremento constante de la concentración de péptido C en la sangre – en 3 meses, el nivel basal fue de media el mismo 0,07, y el nivel estimulado ya fue 0,11 ng/ml; en 6 meses, aumentó más de 3 veces – relativamente hasta 0,38 y 0,43 ng/ml, pero hacia el 9<sup>o</sup> mes disminuyó hasta 0,09 y 0,13 ng/ml.

40 Durante el período después del trasplante, hubo signos de curso más positivo de complicaciones secundarias en estos receptores del grupo. Los síntomas tanto de neuropatía sensoriomotora como autónoma comenzaron a debilitarse ya hacia el final de 1-1,5 meses después del xenotrasplante, y casi dejaron de molestar a los pacientes hacia el 3<sup>er</sup> mes. También, en ambos pacientes con nefropatía diabética, la proteinuria desapareció completamente hacia el 2<sup>o</sup>-4<sup>o</sup> mes después del trasplante, y no volvió a aparecer durante casi un año después del trasplante. Los 45 pacientes con retinopatía diabética no registraron incremento en cambios patológicos en el fondo del ojo.

50 Se llevaron a cabo trasplantes repetidos (en 7-13 meses después del 1<sup>er</sup> trasplante) en 14 pacientes: 1 vez en 5 pacientes, dos veces en 5 pacientes, tres veces en 4 pacientes, y 4 trasplantes repetidos en 1 paciente. En la mayoría de los casos, los trasplantes repetidos de células insulares pancreáticas, como mínimo, contribuyeron a la conservación de cambios positivos en el estado de los pacientes que se habían producido después del 1<sup>er</sup> trasplante. Específicamente de señalar será el resultado de 5 trasplantes sucesivos (intervalo de 7-9 meses) en paciente con neuropatía sensoriomotora grave, que condujo a un hombre de 48 años (con historia de diabetes mellitus insulino dependiente de 8 años) a minusvalía grave (incapacidad/imposibilidad para trabajar) debido a dolor grave en las extremidades y atrofia muscular expresa, especialmente en las extremidades inferiores. Después del 1<sup>er</sup> 55 trasplante, el dolor en las extremidades disminuyó, y entonces, después del 2<sup>o</sup> trasplante, se desvaneció completamente, y entonces comenzaron a regenerarse el tono y el volumen muscular. Como resultado del trasplante realizado, durante los 4,5 años de observación, el volumen muscular del paciente se expandió 23 kg, su tono muscular se normalizó, así como la conductancia del impulso nervioso a través de los nervios motores. También, la diabetes adquirió un curso estable; la dosis de insulina introducida disminuyó 50%. Es posible que la 60 reducción de insulina exógena se estimuló significativamente por el renacimiento significativo de las propias células  $\beta$  del paciente, ya que el contenido de péptido C humano en la sangre del receptor – 0,1 ng/ml (estómago vacío) y 0,1 ng/ml (estimulado) previo a eso se hizo relativamente 0,36 y 0,55 ng/ml hacia el final del período de 4 años de la observación después del trasplante.

65 *TRANSPLANTE DE CULTIVO DE CÉLULAS INSULARES PANCREÁTICAS DE CONEJOS NEONATOS A PACIENTES CON HISTORIA DE ENFERMEDAD DE MÁS DE 10 AÑOS*

Este grupo consistió en 53 personas – 32 mujeres y 21 hombres. La edad de los pacientes en el momento del primer trasplante varió de 21 a 53 – media 33,4. La duración de la enfermedad varió de 11 a 27 años (media 14,8).

5 9 pacientes tuvieron una diabetes de curso lábil verdadero: las condiciones hipoglucémicas espontáneas se alternaron a menudo con episodios de cetoacidosis.

Se descubrieron complicaciones diabéticas secundarias en 38 pacientes: 11 tuvieron sólo neuropatía sensitiva; 1 paciente tuvo neuropatía sensitiva y catarata diabética, 5 pacientes – neuropatía sensitiva, nefropatía inicial (en Mogensen) y retinopatía diabética no proliferante; 8 pacientes – nefropatía emergente y retinopatía no proliferante; 6 pacientes – nefropatía expresa y retinopatía preproliferante; 2 pacientes – nefropatía emergente y retinopatía proliferante; 2 pacientes – nefropatía expresa y retinopatía proliferante; 2 pacientes – neuropatía sensitiva y autónoma, nefropatía expresa y retinopatía preproliferante, y 1 paciente – neuropatía sensitiva y autónoma, etapa urémica de nefropatía diabética, y retinopatía proliferante.

15 Como tal, la retinopatía diabética se reveló en 24 pacientes, incluyendo 20 con neuropatía sensitiva y 3 con neuropatía autónoma. La nefropatía diabética se reveló en 24 pacientes, incluyendo nefropatía emergente en 15 pacientes, expresa – en 8 pacientes, y etapa urémica en 1 paciente. La retinopatía diabética se reveló en 26 pacientes, incluyendo etapa no proliferante – en 13 pacientes; etapa preproliferante – en 8 pacientes, y etapa proliferante – en 5 pacientes.

Con el objeto de disminuir el peligro de desarrollo de condiciones hipoglucémicas, a los pacientes con etapas expresas de retinopatía y nefropatía diabéticas se les transplantó una dosis de cultivos de células de los islotes pancreáticas recibidos de no más de 40 páncreas de conejos neonatos. Todos los receptores con un curso de IDDM inicialmente lábil tuvieron una estabilización relativamente rápida (durante 1-3 meses) del nivel de glucemia, y se escogió un régimen más adecuado de insulinoterapia.

25 Hubo una reducción sustancial del nivel medio de glucemia diaria en pacientes de este grupo: de 12,8 mmoles/l antes del trasplante a 9,8 mmoles/l en 3 meses después del trasplante, y 10,1 mmoles/l en 9 meses después del trasplante. En correspondencia con los cambios en la glucemia, también se redujo la concentración de hemoglobina glucosilada en la sangre de los receptores desde 13,1 hasta 10,0%.

Un incremento significativo del grado de compensación de IDDM fue acompañado por una disminución de los requisitos de insulina exógena por parte de los receptores. Hacia el 3<sup>er</sup> mes después del xenotrasplante, la dosis de insulina administrada se redujo para pacientes de este grupo, de media 12,5%, en 6 meses – 26,6%, en 9 meses – 25,0%, en 12 meses – sólo 9,8%, lo que demostró ese requisito de insulina exógena hasta el nivel previo al trasplante. La reducción máxima se observó en el paciente C (mujer) (26 años de edad, duración de mDM – 20 años; complicaciones secundarias – neuropatía sensitiva, nefropatía expresa, retinopatía preproliferante). Ya en 2 semanas después del trasplante intramuscular de cultivos de células pancreáticas de los islotes recibidos de 40 páncreas de conejos neonatos, la reducción en la necesidad de insulina administrada fue tal que cayó de 36 hasta 24 unidades/día, en 6 semanas hasta 16 unidades/día, en 10 semanas hasta 4 unidades/día (es decir, una reducción de 90%). Al mismo tiempo en el fondo de la condición estable, el nivel de glucemia media diaria no superó 9 mmoles/l. El contenido de HbA1c en 4 meses después del trasplante se redujo hasta 8,7%, y no superó 9% durante el período de al menos 1,5 años. Al mismo tiempo, también apareció una reducción sustancial de la expresividad de complicaciones diabéticas secundarias.

4 pacientes, a pesar de su largo historial de IDDM (de 10,2 a 13,5 años, media 11,1 años), revelaron una secreción residual de péptido C (de media 0,05 ng/ml en el estómago vacío, no estimulado. Sin embargo, después del trasplante hacia el 3<sup>er</sup> mes, la cantidad de pacientes positivos a péptido C se duplicó – y estos 8 pacientes (duración media de diabetes – 12,6 años) la concentración de péptido C en el estómago vacío fue de media 0,09 ng/ml, y la estimulada – 0,12 ng/ml.

El efecto/influencia del trasplante sobre el grado de la manifestación de complicaciones diabéticas depende en la mayoría de los casos de sus tipos y etapas clínicas (avance). Así, todos los pacientes con neuropatía sensitiva tuvieron una mejora sustancial del curso de esta complicación ya después del primer trasplante de cultivos de células pancreáticas de los islotes, pero 2 de 3 pacientes con neuropatía autónoma sólo tuvieron un efecto positivo en el segundo trasplante.

12 de 15 pacientes con etapa inicial de nefropatía diabética tuvieron una desaparición firme de microproteinuria y eliminación de la tendencia a hipertensión arterial. El efecto positivo después del trasplante se observó en pacientes con nefropatía expresa casi en el 63% de los pacientes – en 5 de 8 pacientes. Al mismo tiempo, la extracción de proteína con orina se redujo significativamente: la macroproteinuria se cambió a microproteinuria (menos de 0,3 g/día) y una tendencia a la reducción y normalización de la tensión arterial elevada, lo que permitió reducir significativamente las dosis de remedios hipotensores, o incluso terminar su administración. 2 de 3 receptores distintos durante el período de observación (relativamente 2 y 2,5 años) no tuvieron signos de nefropatía diabética progresiva.

Al mismo tiempo, un paciente con la etapa final de nefropatía diabética sólo tuvo un efecto positivo de corto alcance: durante 4-5 semanas después del xenotransplante de cultivos de células pancreáticas de los islotes su nivel moderadamente elevado de creatinina en sangre y de urea se acercó al límite superior de los índices normales, después de lo cual tuvo lugar una progresión lenta pero firme de insuficiencia renal crónica.

Se sometieron 10 receptores con etapas inicial y expresa de nefropatía diabética a trasplantes repetidos de cultivos de células pancreáticas de los islotes, y 4 de los pacientes con nefropatía expresa se convirtieron en receptores 3 veces durante el período de 3-4 años. 9 de 10 pacientes sometidos al retransplante no tuvieron progresión adicional de los problemas de la función hepática.

Un paciente con catarata diabética (22 años de edad, mDM) duración – 11 años) hacia el 5º mes después del trasplante fue examinado por oculistas que ya no observaron manchas de enturbiamiento de la lente cristalina, y evaluaron ese cambio en la imagen clínica como “resorción de la catarata”.

En 10 de 13 pacientes (es decir, con retinopatía no proliferante) no hubo progresión de cambios patológicos observados durante todo el período de observación (de 1 a 6 años), con mejora de la imagen del fondo de ojo; en 5 receptores (ausencia de desprendimiento de retina, disminución de la cantidad de microaneurismas). Sin embargo, en 3 pacientes con retinopatía no proliferante hubo un incremento en la cantidad de aneurismas y se produjeron hemorragias regionales.

De 8 pacientes observados con retinopatía preproliferante, en 3 casos después de 2-4 años tras el único xenotransplante de cultivos de células pancreáticas de los islotes, se observó un proceso proliferativo. Al mismo tiempo, 3 pacientes del mismo grupo (63%), quienes antes del trasplante habían tenido un procedimiento de coagulación por láser, no necesitaron un tratamiento repetido con láser durante todo el período de observación después del trasplante – de 1 a 6 años. En esto, 3 pacientes de este grupo tuvieron relativamente 1, 2 y 3 trasplantes repetidos con un intervalo de 9 meses a 1,5 años.

Después del xenotransplante de cultivos de P.I.C., 2 de 5 pacientes con etapa proliferativa de retinopatía diabética tuvieron una estabilización relativamente prolongada (duración 1 y 1,5 años) de imagen clínica del fondo de ojo con incremento moderado de las funciones visuales (probablemente debido a resorción activa de hemorragias), y se observó una progresión adicional del proceso proliferante, aquí un paciente (mujer) tuvo hemorragia repetida en el cuerpo vítreo, con empeoramiento sustancial de las funciones visuales.

El uso del trasplante de células de los islotes cultivadas producidas a partir de páncreas de conejos neonatos parece ser muy efectivo en la práctica diabética de niños. Los resultados posteriores de xenotransplante de cultivos de células de los islotes en niños con diabetes mellitus tipo 1 se volvieron a investigar mediante la observación de 20 pacientes antes del trasplante y en 5 años después del primer trasplante (Volkov, 2005 {1}). El grupo comparativo (control sin trasplante) consistió en 20 niños seleccionados en principio “control de ocurrencia” con una permisividad de edad, sexo, duración de la enfermedad, nivel de compensación, requisito de insulina y desarrollo de complicaciones.

El análisis de catamnesis demostró que el xenotransplante de cultivos de células de los islotes tuvo un efecto positivo sobre las necesidades de insulina. De este modo, ya hacia el 3º mes después del trasplante, la dosis de insulina administrada disminuyó en la mitad de los receptores, en comparación con el nivel inicial, y hacia el final del 1º año – 43% de pacientes tuvieron una menor necesidad de insulina. No hubo tales cambios en el grupo de comparación. Se observó un efecto de respuesta frente a la dosis: la mayor disminución de las necesidades de insulina se observó después de la administración del cultivo que contiene aproximadamente 5 ml de células beta. En eso, en el período después del trasplante la compensación más persistente y expresa del metabolismo de hidratos de carbono, que se confirma mediante la dinámica de la glucemia media diaria en comparación con el grupo de control. Ya en el 3º mes después del xenotransplante, el nivel de glucemia diario se redujo de  $10,78 \pm 0,55$  mmoles/l a  $8,6 \pm 0,4$  mmoles/m frente a  $9,15 \pm 0,72$  mmoles/l (inicialmente  $10,65 \pm 0,79$  mmoles/l). En el período de 1 año después del trasplante, estas distinciones se hicieron más significativas: en el grupo de observación la glucemia media diaria es  $8,5 \pm 0,39$  mmoles/l frente a  $10,14 \pm 0,6$  mmoles/l en el grupo de control. Permanecieron tendencias similares en los casos de trasplantes repetidos.

El efecto terapéutico de trasplante de cultivo de células de los islotes sobre el curso de las complicaciones diabéticas demostró ser extremadamente importante. Las observaciones clínicas a largo plazo demostraron que, en comparación con el grupo de control, hubo apariciones menos frecuentes de nefropatía diabética, retinopatía, y trastornos del crecimiento (como manifestación del síndrome de Moriak) en niños con diabetes mellitus tipo 1 después del tratamiento con el trasplante. De este modo, disminución en la aparición de retinopatía de 25% a 11% (incremento en este indicador de 23% a 25% en el grupo de control). La pérdida de albúmina con orina disminuyó significativamente – de 207,4 a 78,7 mg/día en pacientes con nefropatía diabética después del xenotransplante, mientras que en el grupo de comparación este indicador siguió creciendo – desde 220,67 hasta 273,1 mg/día.

Tal complicación como el síndrome de Moriak es uno de los rasgos de la diabetología de niños y adolescentes, incluyendo en su estructura los trastornos de crecimiento. El uso de preparaciones anabólicas para el tratamiento de la patología señalada conduce a un efecto a corto plazo, al avance del cerramiento de las zonas de crecimiento, y a la reducción de la altura corporal final (crecimiento). En el curso del trasplante xenogénico de cultivo de células de islotes, se reveló una rapidez del crecimiento pero sin cambio en la velocidad en el cerramiento de las zonas de crecimiento. Como tal, la proporciones de pacientes que tienen una altura menor que 5% (enanismo auténtico) disminuyó de 18% a 14% durante el 1<sup>er</sup> año de observación. En la catamnesis de 5 años, no se encontró ningún paciente con una altura inferior al 5 percentil entre los niños del grupo de observación. En el grupo de comparación, el porcentaje de niños por debajo del tamaño aumentó de 20% a 22% durante el 1<sup>er</sup> año de observación. En la observación de 5 años, el porcentaje de pacientes con una altura por debajo de 5 *percentil* se redujo hasta 10% debido a la aplicación de una insulino terapia intensiva.

La investigación inmunológica demostró que el trasplante xenogénico de cultivos de células de los islotes no provoca activación sustancial y a largo plazo de proceso autoinmunitario, que es muy importante en la aplicación de este tipo de terapia en pacientes con función productora de insulina parcialmente conservada. Una observación cuidadosa de pacientes del grupo de observación (con examen hospitalario anual) no reveló contaminación de infecciones zoonóticas, ni siquiera una.

#### *EFFECTO DE XENOTRANSPLANTE DE CULTIVOS DE CÉLULAS DE LOS ISLOTES DE PÁNCREAS DE CONEJOS NEONATOS SOBRE INMUNOINDICADORES EN PACIENTES CON DIBETES MELLITUS TIPO 1*

La investigación inmunológica compleja en 20 pacientes con diabetes tipo 1 se llevó a cabo después de terminar el trasplante intramuscular primario de cultivos de células de los islotes de páncreas de conejos neonatos, y, en 12 pacientes con diabetes tipo 1, después de xenotransplantes repetidos de cultivos de células de los islotes. Se usaron 17 ensayos estándar de inmunidad celular y humoral en la investigación inmunológica, sistemas de fagocitos y complemento, incluyendo el título de anticuerpos que se fijan al complemento frente a células de los islotes de páncreas de conejos neonatos.

Se demostró que, en pacientes con diabetes tipo antes del trasplante de los cultivos de células de los islotes, se observó activación del nexo de inmunidad de células T, así como la presencia de un desequilibrio de la subpoblación inmunorreguladora de linfocitos T, y activación de factores de protección no específicos. Después del trasplante, 8 receptores (es decir, 40%) tras el trasplante primario de cultivos de OK mostraron un bajo título de KFA de anticuerpos frente al antígeno total OK e insulina, y 10 pacientes (SO%) mostró un incremento moderado del recuento de linfocitos B en el 2<sup>o</sup>-3<sup>er</sup> mes, con su reducción sucesiva.

A la hora de determinar las subpoblaciones de linfocitos T en la dinámica después del xenotransplante, hay una tendencia a la normalización del contenido de linfocitos T hacia el 7<sup>o</sup>-10<sup>o</sup> día. La cantidad de células CD4 continuó descendiendo, y la cantidad de células CD3 continuó aumentando. Hacia el 14<sup>o</sup>-20<sup>o</sup> día, el número de células T auxiliares midió una cantidad normal. Hacia el 2<sup>o</sup>-3<sup>er</sup> mes después del trasplante, la normalización continuada de los índices de inmunidad celular se conjugó con el logro de una buena compensación de la enfermedad.

Los exámenes del estado inmunitario en pacientes sometidos a trasplantes repetidos de cultivos de células de los islotes de conejos neonatos no revelaron signos de respuesta inmunitaria al xenotransplante. Los índices cuantitativo y funcional de inmunidad fueron comparables con aquellos en xenotransplantes primarios.

#### *XENOTRANSPLANTE DE CULTIVOS DE CÉLULAS DE LOS ISLOTES DE PÁNCREAS DE CONEJOS NEONATOS A PACIENTES CON DIABETES MELLITUS INSULINODEPENDIENTE RECIENTEMENTE DIAGNOSTICADA*

Los pacientes con diabetes mellitus tipo 1 con historia de enfermedad de más de 5 años habitualmente se convierten en receptores de cultivo de OK; carecen prácticamente de actividad productora de insulina de su propio aparato de los islotes del páncreas, y en la mayoría de los casos las complicaciones diabéticas secundarias están avanzadas en diferentes etapas.

Sin embargo, se lograron resultados esperanzadores también tras el implante intramuscular de cultivos de células de los islotes de páncreas de conejos neonatos a pacientes con diabetes mellitus tipo 1 recientemente diagnosticada.

10 personas jóvenes (edad media  $18 \pm 0,2$  años) con historia media de diabetes diagnosticada ( $6 \pm 0,2$  meses). Se observaron resultados positivos en el control de glucemia en todos los pacientes durante los 6-8 meses tras el trasplante xenogénico (glucemia en ayunas  $5,2 \pm 0,2$  mmoles/l, tras la ingesta de alimentos  $- 7,0 \pm 0,15$  mmoles/l, glucosuria diaria  $- 0,25 \pm 0,03$  gramos, HbA1  $- 5,8 \pm 0,2$  mmoles/l La dosis diaria de insulina exógena se redujo de  $0,62 \pm 0,11$  a  $0,28 \pm 0,02$  unidades a 1 kilogramo de peso corporal. 7 pacientes (es decir, 70% de casos) durante el período después del trasplante tuvieron una remisión parcial, y 2 pacientes (es decir, 20% de los casos) una remisión completa del estado diabético (inducido por trasplante "luna de miel" de diabetes mellitus tipo 1), que continuó durante 4-8 meses. En eso, incrementado en niveles de período antes del trasplante de glucagones y hormona de crecimiento en sangre de receptores normalizada (concentración de glucagones disminuyó de  $112,0 \pm$

2,1 a  $69,7 \pm 1,2$  ng/ml,  $p < 0,05$ ; hormona del crecimiento – de  $8,9 \pm 0,04$  a  $5,6 \pm 0,02$  ng/ml,  $p < 0,05$ ) con normalización sucesiva de perfil diario de hormona del crecimiento. La concentración de péptido C humano en suero de pacientes aumentó de  $0,3 \pm 0,01$  a  $1,26 \pm 0,02$  ng/ml;  $p < 5$ ; que atestigua a una disminución significativa de secreción de la propia insulina en receptores bajo la influencia del trasplante realizado de células de los islotes xenogénicas. En eso, los pacientes presentaron normalización de los índices de la inmunidad celular y humoral, que se habían alterado patológicamente antes del trasplante (tabla 40).

Tabla 40. Índices de estado inmunitario en pacientes con IDDM recientemente diagnosticada después del xenotrasplante de cultivos de células de los islotes

Meses Tx	OKT3 %	OKT4 %	OKT8 %	OKB7 %	OKIa %	IgA mg %	IgM mg %	IgG mg %	
Rec n=10	0	$80 \pm 5^*$	$50 \pm 3^*$	$30 \pm 3$	$18 \pm 2^*$	$14 \pm 2^*$	$250 \pm 13^{**}$	$221 \pm 18^{**}$	$15008 \pm 22^*$
	1	$80 \pm 3^*$	$51 \pm 2^*$	$29 \pm 4$	$16 \pm 3$	$12 \pm 2$	$212 \pm 9^*$	$212 \pm 10^*$	$1472 \pm 14^{**}$
	3	$66 \pm 2$	$36 \pm 4$	$30 \pm 4$	$11 \pm 3$	$8 \pm 3$	$174 \pm 12$	$169 \pm 10$	$937 \pm 13$
	8	$76 \pm 4^*$	$48 \pm 2^*$	$26 \pm 3$	$14 \pm 3$	$12 \pm 2^*$	$217 \pm 13$	$224 \pm 19$	$1461 \pm 12^{**}$
Control	Sanos	$68 \pm 4$	$38 \pm 5$	$30 \pm 4$	$10 \pm 2$	$7 \pm 2$	$162 \pm 16$	$151 \pm 8$	$910 \pm 12$

OKT3 - células T; OKT4 - T auxiliares; OKT8 - T supresoras; OKB7 - linfocitos B, OK 1 a - anti-HLA-DR; Ig - inmunoglobulinas; \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$  - en comparación con control

Se observaron los siguientes cambios generales después del xenotrasplante de cultivos de células de los islotes a pacientes con diabetes mellitus tipo 1:

- Estabilización del curso de formas lábiles de la enfermedad, que da como resultado una selección exitosa de la insulino terapia adecuada, y para incrementar significativamente el grado de compensación del metabolismo alterado de hidratos de carbono;
- Disminución de las necesidades de insulina exógena para 20-30% en 2/3 de pacientes;
- La progresión de complicaciones diabéticas tardías suspenden neuropatía, nefropatía, retinopatía); involución de las etapas iniciales en más de 80% de casos.

Es lógico dar explicaciones con respecto a los posibles mecanismos del efecto antidiabético del trasplante de cultivos de células de los islotes de conejos neonatos. A pesar de la amplia adaptación en la práctica de la educación de pacientes con diabetes mellitus tipo 1 a la metodología de autocontrol de glucemia y de técnica de selección de dosis adecuadas de insulina administrada, en algunos pacientes se observó un curso lábil severo de la enfermedad. Un comienzo de espontaneidad frecuente (es decir que se produce sin razones visibles) de condiciones hipoglucémicas a menudo se intercambian mediante el desarrollo de cetosis; y todos los intentos para alcanzar la compensación metabólica en estos pacientes hospitalarios dan sólo un alivio a corto plazo. Sin embargo, en 2-3 meses después del xenotrasplante de cultivo de células de los islotes, prácticamente en todos los casos el curso de diabetes mellitus lábil adquiere un carácter más controlable y manejable. Al mismo tiempo, se produce habitualmente la estabilización de los índices del metabolismo de hidratos de carbono y la erradicación de la disposición a la cetosis.

Aparentemente, la estabilización de las formas lábiles de diabetes mellitus y la realización de la compensación del metabolismo de hidratos de carbono están condicionados, en primer lugar, por la secreción de insulina mediante células beta transplantadas. Durante el período después del trasplante, la dosis administrada de insulina exógena (habitualmente reducida en comparación con el nivel previo al tratamiento) ordena el requisito básico seguro en esta hormona. A su vez, la insulina segregada por células beta transplantadas va a la sangre del receptor más probablemente en correlación con fluctuaciones del nivel de glucemia, haciéndolo así facilitando un curso más estable de la enfermedad. Debido a que la concentración significativa del péptido C humano está localizada en 1-2 meses después del xenotrasplante en parte de recipientes con falta de signos de funcionamiento de las propias células beta (negativo a péptido C), podemos suponer que el aparato de los islotes parcialmente restaurado del paciente anda en el proceso de regulación del metabolismo de hidratos de carbono. Debido a eso, en pacientes con curso lábil previo de diabetes, el estado hipoglucémico se hace menos expresivo, y muy a menudo desaparece completamente a que las células beta transplantadas y restauradas paran de extraer insulina en situaciones en las que la glucemia se aproxima al nivel próximo al normal. Parece que la estabilización del nivel de glucemia después del trasplante de cultivo de células de los islotes está condicionado por la restauración, en cierto grado, del mecanismo de retroalimentación entre el nivel de glucemia y la secreción de insulina, retroalimentación la cual está ausente en pacientes con diabetes mellitus tipo 1 debido a la muerte celular provocada por el proceso autoinmunitario en islotes del páncreas.

También es posible que cierto papel en la estabilización de IDDM y en la disminución de los requisitos del receptor por insulina exógena se pueda atribuir a la normalización de receptores de insulina en tejidos periféricos tras el trasplante de cultivos de células de los islotes.

Debido a que no hubo reducción significativa de los requisitos de insulina exógena en una proporción considerable de receptores con efecto positivo de trasplante de células de los islotes sobre angiopatía diabética, parece que la reducción de la dosis de insulina administrada no se puede considerar como un signo principal, y especialmente el único, de efectividad del tratamiento del trasplante. Si proponemos lograr una independencia completa de la insulina como un fin en sí mismo, este enfoque puede estar cargado de riesgo de desarrollo de situaciones clínicas peligrosas para el paciente. Como demuestra la experiencia, una administración de una sola etapa de porciones significativamente agrandadas de cultivos xenogénicos de células de los islotes que consiste prácticamente sólo en células beta puede provocar el desarrollo de un estado hipoglucémico grave; pero los trasplantes repetidos frecuentes (cada 1-1,5 meses) de porciones "normales" en el hígado (a través de un catéter permanente en la vena porta) puede conducir, al final, a una sobredosis difícilmente predecible de la cantidad de células beta transplantadas.

La producción inadecuada de insulina por células beta que se produce principalmente debido a su incapacidad para segregar insulina en estricto principio de retroalimentación, puede conducir al desarrollo de condiciones hipoglucémicas serias, incluso con la retirada de inyecciones de insulina. Como resultado, el agotamiento de depósitos glucógenos en recipientes y la génesis de glucosa por medio de neogénesis de glucosa conducen a la acumulación de cuerpos cetónicos y a cetoacidosis.

La permanencia y vuelta de complicaciones diabéticas tardías debe ser considerada como prácticamente más significativa, de mayor importancia de pronóstico, y como más lograda en realidad, resultado del trasplante de cultivos de células de los islotes.

De especial importancia es un efecto de xenotrasplante de cultivos de células de los islotes en específico para la alteración de vasos – angiopatía – por diabetes mellitus puesto que, a saber, son la razón principal de la pérdida de peso (retinopatía diabética).

*MECANISMO DE EFECTO DE TRANSPLANTE DE CÉLULAS DE LOS ISLOTES EN COMPLICACIONES DIABÉTICAS TARDÍAS*

Se sabe que la formación de angiopatías diabéticas es muy posible incluso en casos de compensación ideal de metabolismo de hidratos de carbono (normoglucemia, glucosuria, concentración normal de hemoglobina glucosilada) logrado con la ayuda de insulino terapia intensiva. Al mismo tiempo, después del trasplante de los cultivos de células de los islotes, a pesar de la retención de la concentración elevada de hemoglobina glucosilada en sangre de un número significativo de pacientes, en la mayoría de los casos podemos observar una ralentización del progreso y retroceso parcial de complicaciones diabéticas tardías. Es por esto que no se puede explicar el efecto positivo del trasplante de las células de los islotes, a saber, mejorando los índices del metabolismo de hidratos de carbono.

En pacientes con diabetes mellitus insulino dependiente complicada con retinopatía, la gravedad de los cambios en el fondo del ojo crece a medida que disminuye la secreción de la insulina por el páncreas del propio paciente. La excreción de insulina endógena se juzgó, ciertamente, en la concentración de péptido C segregado en la sangre del paciente en cantidades de insulina equimolares. Se sugiere que la progresión de retinopatía estaba gobernada no sólo por la reducción en la secreción de insulina, sino también por la disminución en la concentración del péptido C. Después de que el trasplante alógeno o xenógeno de cultivos de células de los islotes en receptores con insulino dependencia provocó la muerte de células beta del propio páncreas, las células beta transplantadas comenzaron a emitir en la sangre del paciente péptido C (seguro, simultáneamente con insulina) del que había sido privado durante varios años, cuando, por la incapacidad de la denominada terapia de sustitución, estaba inyectándose solamente preparaciones de insulina. Además, en la mayoría de los pacientes en el período después del trasplante, tiene lugar una regeneración parcial del conjunto de las células beta del propio receptor (Skaletsky N.N., y otros, 1994 {6}), que, naturalmente, comenzaron a segregar insulina y péptido C. Como resultado, se corrige el déficit que dura años del péptido C en el cuerpo, y ese déficit puede haber sido responsable del desarrollo de una alteración específica tardía de vasos y nervios.

La suposición del papel fisiológico del péptido C se enfrenta con la opinión ampliamente aceptada de que el papel principal del péptido C es puramente estructural, conectando, y presentando en facilitación de moléculas de plegamiento de proinsulina de tal manera que se forman enlaces de disulfuro entre restos de aminoácidos de las cadenas A y B de moléculas de insulina; y que el péptido C no posee potencial biológico, y como tal es una molécula lastre en el contexto fisiológico.

La suposición se basa en investigadores suecos (Wahren J et al., 1991 {15}). Demostraron que el péptido C provoca un efecto estimulante en la utilización de glucosa por el organismo del paciente diabético insulino dependiente, aunque no se excluye la influencia inhibitoria sobre la producción de glucosa por el hígado. Una administración prolongada (4 semanas) de péptido C a pacientes con diabetes mellitus tipo 1 aseguró un mejor control glucémico (juzgado a partir de la concentración de glucosa en sangre en ayunas y en el contexto de hemoglobina glucosilada. En comparación con pacientes tratados sólo con insulina. Muy importante es el dato que muestra que la administración del péptido C humano tiene una influencia positiva sobre complicaciones tardías de diabetes mellitus

insulinodependiente. Como tal, en pacientes con nefropatía diabética, su función renal mejora, una mejora que se demuestra en la reducción de la excreción de albúmina y reducción en la filtración glomerular; en pacientes con retinopatía diabética, la permeabilidad de la berrera hematorretiniana se mueve hacia delante. Los pacientes con neuropatía autónoma tienen una ralentización de la frecuencia cardíaca en la inspiración y espiración. Además, bajo la influencia de la administración de péptido C, mejora el flujo sanguíneo al hacer trabajar los músculos esqueléticos de pacientes con diabetes mellitus. El mecanismo de tal efecto angio- y neuroprotector del péptido C es incierto. A medida que se obtiene un efecto fisiológico del péptido C a través de la promoción de la función de la membrana celular, entonces, aparentemente, pertenece a la activación de Na+K+-ATF (ácido adenosin trifosfórico) – conectado con membranas de diferentes células.

En conclusión, merece la pena señalar que el trasplante de células de los islotes en diabetes mellitus de tipo 1 es un método muy importante pero auxiliar de la terapia de diabetes mellitus tipo 1. Se debe integrar un tratamiento antidiabético. Para el éxito, es necesaria una correcta combinación de dieta razonable, ejercicio físico graduado, terapia reductora de azúcar adecuada. La aplicación del trasplante de órganos de páncreas o el injerto de islotes detallados del páncreas, están justificados completamente a la hora de proporcionar una ayuda médica a pacientes con nefropatía diabética en su etapa terminal cuando se necesita un trasplante de un riñón alógeno. En las etapas prematuras de alteración del riñón, y también en casos de nefropatía diabética, retinopatía (excepto etapas terminales), puede ser muy efectivo el uso de xenotrasplante de células de islotes cultivadas generadas a partir de páncreas de conejos neonatos.

La aplicación correctamente de trasplante de células de los islotes cultivadas en el tratamiento complejo (integrado) de diabetes mellitus tipo 1 puede afectar sustancialmente al pronóstico de la enfermedad crítica. La profilaxis y la deceleración de las complicaciones diabéticas secundarias, logradas con la ayuda del trasplante repetido habitual, pueden hacer un efecto no sólo médico sino socioeconómico significativo mediante prevención o eliminando incapacidades en pacientes diabéticos y elevando su esperanza de vida y longevidad.

Para revelar las células beta, se usó un método clásico de coloración de células en Mallori y mediante aldehído-fucsina. Para una detección más específica de células que contienen insulina (células beta), se usó finalmente un método inmunofluorescente de análisis morfológico. Más abajo está la descripción de los componentes básicos y las fases de este método.

*COLORACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE CULTIVOS DE CÉLULAS DE LOS ISLOTES DE PÁNCREAS DE CONEJOS NEONATOS*

Para la identificación de células beta se usan cultivos recibidos durante la incubación de microfragmentos pancreáticos en cápsulas de Petri de cultivo de plástico (Corning-Costar). La suspensión de células cultivadas y racimos celulares se lavó tres veces de medio de crecimiento con la ayuda de disolución tibia de tampón de fosfato (PBS). Después, los cultivos se fijaron con disolución al 0,5% de formalina durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después, los cultivos se perfundieron con disolución de PBS con suero fetal añadido (vaca) hasta que la concentración alcanza 1%, y se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente para el bloqueo de la sorción no específica de anticuerpos. Después de un aclarado de 3 veces con disolución de PBS, se dejan sobre los cultivos anticuerpos monoclonales de ratón contra insulina (Sigma), diluidos en disolución de PBS con 5% de suero de ternera fetal. Después de eso, las cápsulas de Petri con los cultivos ensayados se incubaron durante 120 minutos a temperatura ambiente. Después, la limpieza de 3 veces en PBS, y se deja sobre los cultivos un 2º anticuerpo (anticuerpos anti-ratón marcados con FITC), mediante exposición durante 45 minutos. Después de eso, los cultivos se aclaran tres veces en PBS. Después, se deposita sobre los cultivos una disolución del 60% de glicerina y PBS, y se ponen bajo un vidrio de tapa. Las preparaciones listas se examinan con el microscopio fluorescente y se fotografían mediante una cámara digital.

La serie realizada de análisis inmunohistoquímico de células de islotes cultivadas a partir de páncreas de conejos neonatos demostraron que el porcentaje de células que contienen insulina en los cultivos comprende de 78% a 90% (media – 82,2%). El porcentaje se calculó contando las células en su análisis en contraste de fase, y después con el análisis comparativo en el microscopio luminiscente. Además de las células de los islotes, en el cultivo se encuentran fibroblastos singulares, pero su proporción habitualmente no supera 1-5%. Las células de origen epitelial son células que quedan habitualmente en el cultivo y constituyen 5-17%, hecho el cual es confirmado por la coloración inmunohistoquímica (con anticuerpos monoclonales contra la proteína citoqueratina 18); pero no son células beta, ya que estas estructuras celulares no revelan la presencia de insulina. Probablemente, son sólo otros tipos de células de los islotes cuya presencia en el cultivo se debe de considerar muy fisiológica puesto que son (células alfa, células delta, célula pp) entornos naturales para las células beta, quienes en condiciones normales comprenden en cierto grado una estructura morfofisiológica autónoma – los islotes de Langerhans.

Además de estudiar la composición celular del cultivo, se determinó una cantidad total de células en él. A título de recuento metódico en más de 20 cultivos, el cálculo el cual se llevó a cabo en el momento del análisis en microscopio invertido (Nikon, Japón), se tuvo éxito a la hora de determinar que los cultivos recibieron 20 páncreas de conejos de 1-2 días que contienen 451600 a 568900 células de los islotes (media – 521.500). Una dosis de cultivo de células de los islotes representa una fusión de 4 cultivos de células de los islotes recibidos de 80 páncreas de

conejos de 1-2 días. Entre las células de los islotes que contienen en tal dosis está, de media, no menos de 2.000.000, al menos 80% de las cuales son células beta.

5 Los cultivos, producidos mediante el método descrito anteriormente, no son una preparación celular con características cuantitativas estrictamente determinadas, tal como un porcentaje preciso de células beta en cada cultivo. Esto no es una preparación como resultado de la síntesis química estrictamente regulada o manipulaciones mediante ingeniería genética. Las preparaciones celulares usadas para el trasplante, representan una función de cultivos de crecimiento paralelos de células de los islotes, que, naturalmente son distintos entre sí en cierto grado. El análisis de la composición celular, a saber principalmente dando una idea de la proporción de células beta en el cultivo, demostró que constituye el 80-94%, mientras que la viabilidad de estas células es de 77% a 85%. Para la preparación biológica, esta variación en las cifras es, en nuestra opinión, no significativa. Al incrementar la cantidad de cultivos usados para un trasplante, se puede reducir esta variación.

15 Inmediatamente antes de un trasplante clínico planificado (transporte) de cultivo de células de los islotes, hay una selección de cultivos con énfasis en la duración de su cultivo, resultados de observación microscópica, y análisis expreso de esterilidad y viabilidad. La reunión de los cultivos para el trasplante se lleva a cabo en condiciones de caja laminar, asegurando el suministro de aire estéril que circula constantemente. Los cultivos seleccionados – a 4 cultivos para una dosis de trasplante se reúne con la ayuda de un rascador celular especial (rascador celular, Corning-Costar). La suspensión celular reunida se centrifuga en tubos de ensayo de plástico de 50 mililitros (800 rotaciones por minuto durante 10 minutos). Después, el sedimento celular se transfiere a un tubo de ensayo de 15 mm de plástico y se suspende en una disolución salina de Hank. El tubo de ensayo marcado con la preparación celular se coloca entonces en un tubo de ensayo de 50 mililitros y se cierra fuertemente con una tapa fijándola adicionalmente con una película especial (Parafilm).

25 Aunque la invención se ha descrito con detalle y con referencia a sus ejemplos específicos, será manifiesto para el experto en la materia que se pueden realizar cambios o modificaciones allí sin separarse del espíritu ni alcance de la misma.

#### Bibliografía/Literatura

- 30 1. Volkov I.E., Skaletskyy N.N., Schenev S.V. /Preliminary results of xenogeneic transplantation of cultures of islet cells of pancreas of rabbit to children with insulin-dependent diabetes mellitus.H Bulletin of Experimental Biology & Medicine. - 1998. -Nº 3. VolumeN 126. P. 105 - 108
- 35 2. Gavrilova N.A., Skeltsky N.N. / Effect of xenotransplantation of pancreatic islet cells on pathogenic mechanisms of development and course of diabetic retinopathy. // Reporter of Transplantology & Artificial Organs. - 2004. - Nº 1 - P. 30-36.
- 40 3. Skaletskaya G.N., Kirsanova L.A., Skaletskyy N.N., *et al.* / Change of course of experimental diabetic nephropathy under influence of xenotransplantation of islet cells cultures. Materials of the III All-Russian Conference on Transplantology & Artificial Organs. // Reporter on Transplantology & Artificial Organs. - 2005. - Nº 3. - P. 47.
- 45 4. Skaletskyy N.N., Kirsanova L.A., Blyumkin V.N. / Producing cultures of islet cells of pancreases and its transplantation. // Issues of Transplantology & Artificial Organs - M., 1994. - P. 73-80.
- 50 7. Skaletskyy N.N., Shumakov V.I. / Transplantation of islet cells in treatment of diabetes mellitus // Transplantation of fetalissues and cells. / Bulletin of Experimental Biology & Medicine. - 1998. - T. 126. - Supl. 1. - P. 109-114.
- 55 8. Shumakov V.I., Blyumkin V.N., Skaletskyy N.N., *et al.* Transplantation of pancreatic islet cells. - M. Canon , 1995. - P. 384.
9. Shumakov V.I., Skaletskyy N.N. / Regulation of carbohydrate metabolism and correction of impairment of carbohydrate metabolism at diabetes Mellitus. // Essay on physiological problems of transplantology and use of artificial organs / Under edition of Academician V.I. Shumakov. - Tula: Repronix Ltd., 1998. - P. 93-118.
- 60 10. Shumakov V.L, Skaletskyy N.N. Transplantation of islet and other endocrine cells. // Transplantology (under edition of Academician V.I. Shumakov). -M: Medicine, 1995. - P. 317-331.
- 65 12. Gill R.G., The Immunology of Pancreatic Islet Transplantation. – en libro “Type 1 Diabetes”, Oxford University Press, 1996. - P. 118-133
13. Shapiro A.M.J., Lakey J.R.T., Paty B.W., *et al.* / Strategic opportunities in clinical islet transplantation // Transplantation. - 2005. - Vol. 79. - P. 1304-1307.

14. Shapiro A.M.J., Lakey J.R.T., Ryan E.A., *et al.* / Islet transplantation in seven patients with type I diabetes mellitus using a glucocorticoid-free regimen // *New England J. of Medicine.* - 2000. V. 343. - P. 230-238.
- 5 15. Wahren J., Johansson B.-L., Wallberg-Henriksson H. / Does C-peptide have a physiological role? // *Diabetologia.* - 1994. - 37, supl. 2. - P. 99-107.
16. Shumakov V.I., Skaletskyy N.N., Evseev Yu.N. *et al.* / Intraportal xenotransplantation of islet cell cultures in diabetic patients // *Biomaterial Living System Interactions.* -1993. Vol. 1. - N4. - P. 179-184.
- 10 17. George S. Eizenbarth, Kevin J. Lafferty. *Type I Diabetes - Molecular, Cellular & Clinical Immunology.* - Oxford University press.
- 15 18. Rush B.T., Fraga D.W., kotb M.Y., Sabek O.M., Lo A., Graber L.W., Halim A., Graber A.O./ Preservation of human pancreatic islets in vivo Function after 6-month culture in serum-free media // *Transplantation.* -2004. -77. -P. 1147-1154.

**REIVINDICACIONES**

1. Método para obtener células beta de los islotes a partir de páncreas de conejos, comprendiendo el método:

5 cosechar dichos páncreas de conejos neonatos y colocar los páncreas en una disolución salina que comprende un antibiótico a una temperatura de 4-10°C;

eliminar los vasos y conductos excretores de los páncreas cosechados;

10 obtener microfragmentos pancreáticos picados a partir de dichos páncreas; e

15 incubar dichos microfragmentos pancreáticos picados en un medio libre de suero a una primera temperatura de incubación 36,6°C a 37°C durante 6 a 10 días a 0% a 5% de CO<sub>2</sub> durante un primer período de incubación, y periódicamente sustituir el medio libre de suero y eliminar las células indeseadas destruidas espontáneamente que comprenden células exocrinas y células de la sangre y elementos de tejido conjuntivo hasta que al menos 80% de las células que quedan son células beta de los islotes; e

20 incubar dichos fragmentos pancreáticos picados en dicho medio libre de suero a una segunda temperatura de incubación 22°C a 29°C durante 4 a 5 días durante un segundo período de incubación hasta que al menos 78-90% de las células que quedan son células beta de los islotes, en el que dicho medio libre de suero se sustituye opcionalmente de forma periódica, obteniendo de ese modo células beta de los islotes.

2. Método según la reivindicación 1, en el que la segunda temperatura de incubación es 24°C.

25 3. Composición que comprende células beta de los islotes obtenidas de páncreas de conejos mediante el método según la reivindicación 1, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 4. Composición según la reivindicación 3, en la que la composición comprende al menos 50% de células beta de los islotes.

5. Composición según la reivindicación 3, en la que la composición comprende al menos 78% de células beta de los islotes.

35 6. Composición según la reivindicación 3, para el tratamiento de diabetes para promover la producción natural de insulina.

7. Composición según la reivindicación 6, para inyección intramuscular.

40 8. Composición según la reivindicación 7, para inyección intramuscular en el músculo abdominal recto.

9. Composición según la reivindicación 6, para uso sin ninguna supresión inmunitaria.