

Implante de islotes de Langerhans en pacientes diabéticos: resultados preliminares

Prof. Heberto Alcázar Montenegro

Presidente del Instituto de Investigaciones Científicas Hans Selye, A.C.

M.en C. Noé Alvarado Vásquez

Investigador del Instituto de Investigaciones Científicas Hans Selye A.C. Y del Departamento de Farmacología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

Biol. Gwendal Drouin Ferre

Instituto de Investigaciones Científicas Hans Selye, A.C.

Dra. Susana Alcázar Leyva

Vicepresidente del Instituto de Investigaciones Científicas Hans Selye, A.C.

Se presentan los resultados obtenidos en los primeros 20 pacientes diabéticos tratados con un implante realizado por vía intramuscular de islotes de Langerhans de oveja, en donde se utilizó ácido ribonucleico de transferencia (RNAtHAM) de origen fúngico como inductor de la síntesis de interferón endógeno y como promotor de la tolerancia inmunológica; así mismo, fue aplicado a estos pacientes el pirofosfato de tiamina también conocido como cocarboxilasa estable en solución (X-2). Los resultados clínicos y de laboratorio obtenidos demuestran que la utilización de esta metodología es una opción adecuada para el paciente diabético. En breve se darán a conocer los resultados detallados de 60 pacientes diabéticos tratados con el mismo método. Por último, cabe mencionar que estos trabajos son el resultado de más de 40 años de investigación científica continua del profesor Heberto Alcázar Montenegro.

Introducción

La diabetes *mellitus* insulino dependiente (DMID) y no insulino dependiente (DMNID) es un padecimiento crónico degenerativo, en el que las células se encuentran incapacitadas para metabolizar u oxidar de manera adecuada a la glucosa hasta CO₂ y H₂O, por el bloqueo existente en el ciclo de Krebs y en la cadena de transporte electrónico acoplada a la fosfori-

lación oxidativa y el ciclo de las pentosas. Esto tiene como consecuencia que el paso de los electrones por la cadena de transporte electrónico no se realice impidiendo la síntesis del ATP. Como resultado se tiene una deficiente producción de energía y un aumento en la formación de radicales libres de oxígeno, los cuales dañan a las proteínas, lípidos, carbohidratos, así como al ADN mitocondrial.

de los islotes de Langerhans en pacientes diabéticos se observa lo siguiente: desaparición de la sintomatología clásica de la DM (astenia, adinamia, polidipsia, poliuria y polifagia) y disminución de la concentración de la glucosa sanguínea (tabla 2) lo que indicaría una mejor utilización de la glucosa por el paciente diabético. Los resultados obtenidos demuestran el efecto de implante hasta por 30 días; sin embargo, se cuenta con resultados previos que demuestran su acción hasta por seis meses. Estos hechos indican que el implante es degradado gradualmente y que es importante verificar los resultados obtenidos con un mayor número de pacientes, así como por un periodo más prolongado.

Conclusión

El implante de islotes de Langerhans utilizado en esta investigación se muestra como un tratamiento adecuado para la diabetes mellitus siempre y cuando se utilice el RNAt HAM para evitar el rechazo, ya que el promover la síntesis de IFN favorece el desarrollo de la tolerancia inmunológica sin ocasionar efectos secundarios graves y permite la preservación del tejido implantado y con ello la liberación gradual de insulina, lo cual se ve favorecido si se utiliza además la cocarboxilasa estable en solución (X-2, del Laboratorio de Investigaciones Filosóficas y Científicas, S. A. de C.V.) para coadyuvar con el metabolismo energético de los pacientes diabéticos. 14-16

REFERENCIAS

- Wallace CD: Función normal y patología del ADN mitocondrial. *Investigación y Ciencia*. Octubre 1997;12:20.
- Cerami A, Viassara H y Brownice M: Glucosa y envejecimiento. *Investigación y Ciencia*. 1987;130:52-59.
- Lacy PE, Scharp WD: Islet transplantation in treatment diabetes. *Ann Rev Med* 1986;37:33-40.
- Bonilla NM, Martínez JM, Alcázar H, Alcázar S, Benítez MT, Favreau PL: Implante homólogo heterotópico de islotes de Langerhans en ratas con DMID. Congreso Internacional Pancreatic Beta-Cell and Islet Research 1998, S'Agaró, Girona, España del 13 al 14 de septiembre de 1998.
- Alvarado VN, Santiago CJR, Alcázar LS, Benítez RMT, Castellanos C, Zamudio CP: Inducción de la producción de interferón endógeno en humanos e inhibición de la replicación in vitro de adenovirus tipo B, virus herpes simple tipo 1 y virus sincitial respiratorio utilizando un ARN de transferencia. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*. 1997;10:100-106.
- Alvarado VN, Alcázar LS, Benítez RMT, Zamudio CP: Incremento en la concentración de IFN gama TNF alfa en el plasma de sujetos sanos a los que se administró un RNAt de origen fúngico. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 1998;11:12-16.
- Alvarado VN, Alcázar LS, Benítez RMT, Alcázar MH, Zamudio CP: Los inductores de la síntesis de interferón endógeno ¿una posible opción terapéutica? *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 1999;12:53-57.
- Alvarado VN, Santiago J, Alcázar MU, Alcázar LS, Manjares ZME, Benítez RMT, Meneses FM, Zamudio CP: Efectos biológicos en células Hep-2, en la multiplicación del adenovirus tipo 6 y en la concentración de interferón en plasma humano en presencia de un RNA de transferencia fúngico. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 1999;12:6-10.
- Alcázar-Montenegro H, Alcázar-Lcyva S: Implante de hipofisis en pacientes hipofisectomizados. *Inv Med Int* 1988;15:135-39.
- Sebary DW, Lacy PE, Santiago JV: Insulin independence after islet transplantation into type 1 diabetic patient. *Diabetes* 1990;39:515.
- Olack B, Swansen C, McLearn M, Longwith J, Sebary D, Lacy PE: Islet purification using Euro-Ficoll gradients. *Transplant Proc* 1991;23(1):774-76.
- Marchetti P, Scharp DW, Longwith J, Swanson C, Otack B, Gerasimidi-Vazaqu A y col: Prevention of contamination of isolated porcine islets of Langerhans. *Transplantation* 1992;53(6):1364-66.
- Lacy PE, Davie JM: Transplantation of pancreatic islets. *Ann Rev Immunol* 1984;2:183-98.
- Alcázar MH, Alcázar LS, Rivera LRM, Moreno HJ: Pirofosfato de tiamina (cocarboxilasa) estable en solución como tratamiento de la diabetes. *Inv Med Int* 1989;16:83-91.
- Alcázar MU, Alcázar LS: Pirofosfato de tiamina como terapia preventiva y regenerativa del proceso de envejecimiento de los diabéticos. *Inv Med Int* 1991;17:195-199.
- Alcázar MH, Alcázar LS, Cámez MA, Benítez RMT: Actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenada en pacientes diabéticos tratados con pirofosfato de tiamina o cocarboxilasa. *Inv Med Int* 1992;19:69-74.

Comentario: el profesor Heberto Alcázar-Montenegro ha recibido los siguientes premios por las investigaciones científicas realizadas sobre la diabetes mellitus: a) Por el trabajo "Pirofosfato de tiamina como terapia preventiva y regenerativa del proceso de envejecimiento de los diabéticos", recibió el Primer Premio Nacional Gerontológico, otorgado por la sociedad de Geriatria y Gerontología de México A.C. en el XIV Congreso de Internacional de Gerontología, en 1989; b) Por el trabajo "Actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en pacientes diabéticos tratados con pirofosfato de tiamina o cocarboxilasa". Recibió el primer lugar en el área de química clínica, otorgado por la Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica, A.C., en 1992; e) Por el trabajo "Investigaciones sobre la Biología del Envejecimiento", recibió el Primer Lugar en la categoría de trabajos libres en el XI Congreso de Geriatria y Gerontología de México, A.C., en 1999.

Agradecimientos

A los doctores: Alma Leticia Tejeda-Alvarez, Gaspar Cano-Pérez, Armando Gámez-Murrieta, Erasto Ruiz-Mendoza y Zaid Macías-Trejo por las valoraciones clínicas realizadas a los pacientes estudiados en este trabajo.

(ADNmt). Este último evento es relevante por su relación con el origen de la diabetes mellitus (DM).¹

Desde 1981, Anthony Cerami propone que el exceso de glucosa existente en el plasma del paciente diabético altera las proteínas de larga vida por medio de la glucosilación no enzimática (GNE). En las proteínas, como el colágeno, se forman puentes intermoleculares (*cross-linking*) que ocasionan endurecimiento del tejido conjuntiva y del miocardio.² Otras proteínas susceptibles de ser modificadas son: las plasmáticas, de membrana, citosólicas y estructurales. Las principales consecuencias son las complicaciones crónicas de la DM como: retinopatía, neuropatía, nefropatía y aterosclerosis acelerada. Entre los distintos tratamientos utilizados para el control de los niveles de glucosa en el diabético están los hipoglucemiantes, insulina recombinante, etc., que han permitido obtener resultados parciales.

El trasplante de las células beta del páncreas ya se había propuesto como una posible terapia para el control de la DMID. Se han realizado estos experimentos en modelos animales y humanos, trasplantando células beta obtenidas de personas recientemente fallecidas a pacientes diabéticos, lográndose resultados prometedores; sin embargo, este tipo de implantes se han realizado sólo en diabéticos con trasplante renal, con el fin de aprovechar la terapia inmunodepresora.³

En este trabajo, los autores han demostrado la viabilidad de la técnica en ensayos biológicos, en donde se aplicaron islotes de Langerhans a ratas macho Wistar inducidas a la diabetes y se observó una regulación de la concentración de glucosa en sangre.⁴ Por lo anterior, el objetivo fue valorar la respuesta clínica y de laboratorio de pacientes diabéticos con DMID y DMNID a quienes se les realizó un implante de una preparación de islotes de Langerhans de oveja por vía parenteral, previa aplicación de ácido ribonucleico de transferencia modificado (RNA^t HAM) como inductor de la síntesis de interferón y como promotor de la tolerancia inmunológica.⁵⁻⁹ Inmediatamente después de realizado el implante, se aplicó una coenzima: el pirofosfato de tiamina o cocarboxilasa estable en solución: X-2.¹⁴

TABLA 1
Sexo, tipo de diabetes y edad de los pacientes

Paciente	Sexo	Tipo de diabetes	Edad (años)
1	M	II	67
2	M	II	31
3	F	II	29
4	M	II	57
5	M	II	50
6	M	II	68
7	M	II	49
8	F	I	64
9	M	II	82
10	M	II	60
11	M	II	39
12	M	II	79
13	F	II	66
14	M	II	65
15	M	II	77
16	M	II	69
17	F	II	67
18	F	II	55
19	F	II	35
20	M	II	49

Promedio 57.9±15.5
+- D.E.

Tipo I Diabetes mellitus insulín dependiente

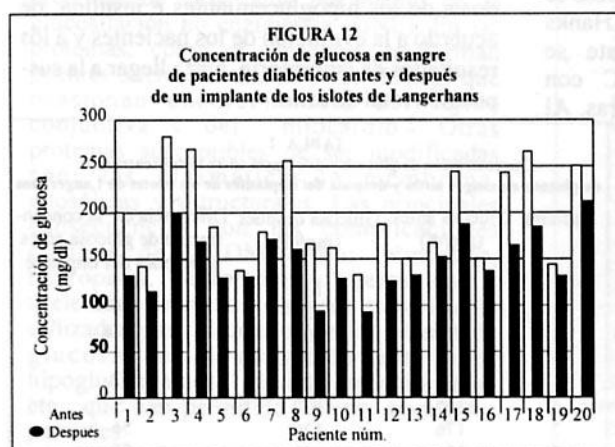
Tipo II Diabetes mellitus no insulín dependiente

Material y Métodos

Pacientes: en la tabla 1 se mencionan las características de los pacientes involucrados en el estudio, el cual se integró con seis mujeres (30%) y 14 varones (70%) y cuyas edades van de los 29 a los 82 años, con un promedio de edad de 57.9 ± 15.5 años. A cada uno de los pacientes les fue tomada una muestra de sangre en ayunas para obtener la concentración de glucosa en suero antes de la realización del implante y a los 30 días de realizado éste.

Aislamiento de los islotes: el páncreas se obtiene de una oveja de tres meses de edad y se lava con solución salina fisiológica en condiciones asépticas, después se conserva en nitrógeno líquido hasta el momento de la separación y purificación de los islotes de Langerhans. En el momento de la separación se descongela y se pesa el páncreas, el tejido adiposo se separa de la glándula y con una jeringa de insulina se le inyecta de manera uniforme la solución de Hanks (SIGMA, México), a la cual se le agregaron previamente 10 ml. de suero

significativos ($p < 0.05$), lo anterior demuestra que existieron diferencias entre las concentraciones de glucosa antes y después de la realización de; implante. El comportamiento mencionado se ejemplifica en la figura 1.



En el grupo de estudio de los autores, no se observaron diferencias significativas en la capacidad de respuesta al implante, entre varones y mujeres con respecto a sus concentraciones de glucosa sanguínea.

Discusión

La búsqueda de tratamientos terapéuticos eficaces para la DMID o DMNID ha sido un proceso prolongado y difícil en donde aún no se ha logrado obtener una respuesta completa. Los tratamientos actuales incluyen hipoglucemiantes, insulina recombinante, etc., y desde hace algunos años se ha comenzado a trabajar de manera constante sobre los beneficios de utilizar al implante de islotes del páncreas de origen porcino,¹⁰ para el tratamiento de la DM. Todas las terapias mencionadas presentan efectos secundarios o beneficios limitados; por ejemplo, se puede mencionar a los hipoglucemiantes, que ocasionan principalmente alteraciones hematológicas, vasculares y endocrinas; las biguanidas ocasionan acidosis láctica e hipoxia con riesgo de insuficiencia cardíaca, renal y hepática. Se sabe además que la estimulación excesiva de las células beta

del páncreas ocasiona con el tiempo su agotamiento.

Para realizar el implante de islotes de Langerhans se deben tomar en cuenta las siguientes dificultades: lograr el adecuado ais-

lamiento de los islotes,¹¹ prevenir la contaminación durante el proceso de purificación,¹² encontrar un adecuado número de donadores y controlar la respuesta inmunológica del individuo contra el implante.¹³ En la actualidad no existe alguna técnica capaz de evitar el rechazo de tejidos u órganos sin efectos secundarios, por lo que en este trabajo se propone (así como en trabajos previos), la utilización de un ácido ribonucleico de transferencia modificado bioquímicamente (RNA t HAM) para reducir su capacidad antigénica, como un agente capaz de

inmunológica. El objetivo de aplicar esta molécula en humanos es aprovechar sus características como inductor de la síntesis de interferón (IFN), lo cual ha sido demostrado al encontrar el aumento de los niveles de IFN total, IFN-V, así como de; factor de necrosis tumoral alta (fNF-ct)6,8 y favorecer el desarrollo de la tolerancia inmunológica,⁹ permitiendo de esta manera que el implante libere gradualmente insulina.

La DM es un padecimiento crónico e invalidante difícil de tratar, los hipoglucemiantes o la aplicación de insulina exógena no son capaces de regular por completo el metabolismo energético y su sobredosificación o hiperinsulinemia pueden provocar hipoglucemia, además de las complicaciones a corto o largo plazos ya mencionadas. El objetivo principal al introducir islotes de Langerhans procedentes de animales jóvenes, son sus células beta y que la insulina contenida en éstas sea liberada, en modo gradual, de acuerdo a las necesidades de; organismo, sin incrementos súbitos de la hormona, eliminando de esta manera el riesgo de hipoglucemia.

En este trabajo, después de la implantación

letal de bovino (*in Vitro*, México) y colagenasa tipo IV (1 mg/ml, SIGMA), a razón de 1.5 ml por gramo de tejido.

La separación del páncreas se realiza en fragmentos de 1cm³ en promedio con ayuda de tijeras de disección estériles. Las piezas se colocan en un frasco con la solución de Hanks utilizada previamente y el recipiente se mantiene en baño María a 37.5°C con agitación media constante por 3.5 horas. Al término de este tiempo el contenido se filtra y se recolecta en un matraz para distribuirse posteriormente en tubos de ensayo, los cuales se centrifugan a 1200 rpm por 7 minutos; el sobrenadante es desechado, el pellet resuspendido en solución salina fisiológica y en este momento se le adicionan 10 ml de X-2 y nuevamente se centrifuga en las mismas condiciones. El sobrenadante se desecha y se resuspende en solución salina fisiológica (1 ml/g del peso del páncreas inicial) con X-2 al 5%. Las muestras de tejido se distribuyen en pequeñas alícuotas, se verifica la viabilidad y la morfología celular y posteriormente se congelan en nitrógeno líquido.

Una hora previa al implante se descongelan las muestras y se aplica al paciente, por vía intra- muscular (IM), 5 ml de un ácido ribonucleico de transferencia (RNAtHAM) como inductor de la síntesis de IFN y como promotor de la tolerancia inmunológica. Al término de la hora de aplicado el RNAtHAM se inyectan, de manera intramuscular en el glúteo, 7 ml de la solución que contiene los islotes de Langerhans e inmediatamente después se administran 5 ml de X-2 también por vía intramuscular.

Análisis estadístico: se realizó una prueba de T pareada donde una $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativa.

Resultados

Los resultados a los tres días del implante de islotes fueron: disminución de la glucemia y

Mejoría clínica importante que consistió en desaparición de la astenia, adinamia y depresión en todos los pacientes. Ninguno presentó irritación local en el sitio de aplicación del implante. Por otro lado, se logró disminuir la dosis de los hipoglucemiantes e insulina, de acuerdo a la evolución de los pacientes y a los resultados de laboratorio, hasta llegar a la suspensión total de éstos.

Paciente	Glucosa antes (mg/dl)	Glucosa después (mg/dl)	Diferencia en la concentración de glucosa antes y después del implante
1	195	138	57
2	142	123	19
3	275.4	201	74.4
4	261	178	83
5	180	128	52
6	135	130	5
7	176	120	56
8	256	158	98
9	164	91	73
10	158	128	30
11	132	93	39
12	187	117	70
13	149.5	138	11.5
14	160	151	9
15	243	194	49
16	150	144	6
17	246	167	79
18	261	189	72
19	146	136	10
20	249	207	42
Promedio +/- D.E.	193.2 +/- 50.1	146.5 +/- 33.6	$p < 0.05$

En la tabla 2 se muestran las concentraciones de glucosa en sangre antes y 30 días después de la aplicación del implante; además, se observa que todos los pacientes mostraron disminución de los niveles de glucosa después de recibir los islotes de Langerhans, aunque existieron casos (pacientes 6, 13, 14, 16 y 19) en quienes la disminución fue mínima, lo cual también se visualiza en la misma tabla. En la tercera columna se aprecia la diferencia entre las concentraciones obtenidas antes y después del implante. Al comparar el comportamiento entre los dos puntos, la prueba de T pareada indicó que los resultados son estadísticamente

SUMMARY

The text offers a general comment on the results obtained in 20 diabetic patients treated with Langerhans islets implant and in whom a fungal based transfer ribonucleic acid (RNA_t HAM) was used in order to induce endogenous interferon synthesis and promote immunologic tolerance. Additionally, a stable solution of pyrophosphate, also known as cocarboxylase (X-2) was applied to these patients. Comments are made on the favourable clinical and laboratory results obtained from using this method in diabetic patients. Shortly, we will publish detailed results of 60 diabetic patients who are undergoing the same therapy. This paper is the result of over 40 years of continuous scientific research conducted by professor Heberto A. Icazar-Montenegro.