



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Medicina  
Maestría en Ciencias en Biomedicina.

**Estandarización de la técnica de aislamiento de islotes pancreáticos en  
modelo murino**

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el Título en Maestra en Ciencias en  
Biomedicina

**Presenta:**

QFB. Brenda Ugalde Villanueva

Dirigido por:

Dr. Hebert Luis Hernández Montiel

Dr. Hebert Luis Hernández Montiel  
Presidente

  
Firma

Dr. Juan Carlos Solís Sáinz  
Secretario

  
Firma

Dra. Ma. Ludivina Robles Osorio  
Vocal

  
Firma

Dra. Ana Gabriela Hernández Puga  
Suplente

  
Firma

Dra. Rosa Martha Pérez Serrano  
Suplente

  
Firma

Dr. Javier Ávila Morales  
Director de la Facultad Medicina, UAQ

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Directora de Investigación y Posgrado,  
UAQ

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Julio 2017



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Medicina  
Maestría en Ciencias en Biomedicina.

## **Estandarización de la técnica de aislamiento de islotes pancreáticos en modelo murino**

### **Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el Título en Maestra en Ciencias en Biomedicina

#### **Presenta:**

QFB. Brenda Ugalde Villanueva

Dirigido por:

Dr. Hebert Luis Hernández Montiel

Dr. Hebert Luis Hernández Montiel  
Presidente

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Juan Carlos Solís Sáinz  
Secretario

\_\_\_\_\_  
Firma

Dra. Ma. Ludivina Robles Osorio  
Vocal

\_\_\_\_\_  
Firma

Dra. Ana Gabriela Hernández Puga  
Suplente

\_\_\_\_\_  
Firma

Dra. Rosa Martha Pérez Serrano  
Suplente

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Dr. Javier Ávila Morales  
Director de la Facultad Medicina, UAQ

\_\_\_\_\_  
Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Directora de Investigación y Posgrado,  
UAQ

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Julio 2017

## RESUMEN

Introducción: La diabetes mellitus tipo 1 (DM 1) es una enfermedad metabólica causada por la destrucción inmune de las células  $\beta$  pancreáticas, causando una pérdida progresiva de la producción de insulina y desarrollando hiperglucemia crónica. En 2015, se estima que 542.000 niños menores de 15 años sufrieron DM1 en el mundo y un estimado de 86.000 nuevos casos por año. El tratamiento se basa en la administración exógena de insulina; sin embargo, el control glucémico es a menudo difícil debido al ajuste constante de la dosis, lo que hace difícil prevenir las complicaciones crónicas. El trasplante de islotes de Langerhans es una alternativa al tratamiento de DM1, permitiendo al paciente la independencia en la administración de insulina exógena hasta por 5 años. El trasplante de islotes en humanos Es una técnica que se realiza en Estados Unidos, Europa, Australia y Canadá. Sin embargo, en México la investigación en este campo es casi nula, por lo que los pacientes con DM1 se han limitado al uso de insulina exógena. Objetivo: Estandarizar la técnica de aislamiento de islotes pancreáticos para su posterior uso en la implantación de islotes pancreáticos en un modelo murino de DM1. Metodología: Los islotes pancreáticos aislados se obtuvieron por infiltración de colagenasa tipo IV a través del conducto pancreático, se extrajo el páncreas y se sometió a una columna de separación con Ficoll. Se cuantificaron los islotes aislados y se determinó el número de islotes aislados. Finalmente, se realizó inmunohistoquímica para determinar la presencia de islotes pancreáticos en la muestra obtenida.

**(Palabras clave:** Aislamiento de islotes pancreáticos, Diabetes mellitus tipo I.)

## Summary

Introduction: Type 1 diabetes mellitus (DM 1) is a metabolic disease caused by immune destruction of pancreatic  $\beta$  cells, causing a Progressive loss of insulin production, and thus developing chronic hyperglycemia. In 2015, an estimated 542,000 children under the age of 15 years they suffered DM1 in the world and an estimated of 86,000 new cases by year. The treatment is based on the exogenous administration of insulin; however, glycemic control is often difficult due to the constant adjustment of the dose, which makes it difficult to prevent the chronic complications. The transplantation of islets of Langerhans is an alternative to the treatment of DM1, allowing the patient the independence in the administration of exogenous insulin up to by 5 years. The islet transplantation in humans Is a technique that is performed in United States, Europe, Australia and Canada. However, in Mexico the research in this field is almost nil, so that patients with DM1 have been limited to the use of exogenous insulin. Objective: To standardize the technique of isolation of pancreatic islets for its subsequent use in the implantation of pancreatic islets in a murine model of DM1. Methodology: The isolated pancreatic islets were obtained by infiltration of collagenase type IV through the pancreatic duct, the pancreas was removed and subjected to a separation column with Ficoll. The isolated islets were quantified and the number of isolated islets was determined. Finally, immunohistochemistry was performed to determine the presence of pancreatic islets in the sample obtained.

**(Key words:** Diabetes mellitus, pancreatic islets.)

## AGRADECIMIENTOS

En el presente trabajo de tesis, primeramente me gustaría agradecer a ti Dios, por bendecirme para llegar hasta donde he llegado, porque hiciste realidad este sueño anhelado.

Quiero agradecer a las instituciones que han hecho posible la realización del trabajo presentado en esta tesis, por el apoyo financiero brindado, el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México), a la Clínica del Sistema Nervioso de la UAQ, a la Universidad Autónoma de Querétaro. Gracias por la ayuda y confianza en mí depositada.

Además, me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial al Dr. Hebert Luis Hernández Montiel, director de esta investigación, por la orientación, el seguimiento y la supervisión continúa de la misma, pero sobre todo, por la motivación y el apoyo recibido a lo largo de estos años.

Agradezco a los miembros del jurado, por las valiosas contribuciones que hicieron al trabajo final y por el tiempo que dedicaron para revisarlo, aún a pesar de tantas actividades que los ocupan. Agradezco a aquellas grandes personas que hacen posible el conocimiento en las aulas, los excelentes profesores del programa de maestría. A mis compañeros de generación, por todos los buenos y malos momentos que viví con ellos. A todos los que alguna vez han compartido sus conocimientos para enriquecernos a todos.

Un Agradecimiento especial al Médico Especialista Enrique López Arvizú y al Maestro en I.M. David Gustavo García Gutiérrez, por el apoyo y confianza que me han brindado, así como también el interés y motivación en el desarrollo del proyecto.

A mis Amigos Rocío Reséndiz Gutiérrez. Luis Arturo Jaime y Ulises Merino Orozco gracias por estar conmigo, sufrir conmigo y aguantarme en estos años. Gracias por su amistad y buenos momentos juntos.

A mis hermanos Isai, Juan. Miriam e Israel, que con su amor me han enseñado a salir adelante. Gracias por su paciencia, por su preocupación, pero sobre todo, gracias por estar en otro momento tan importante en mi vida.

Todo esto no hubiera sido posible sin el apoyo incondicional que me otorgo y el cariño que me inspiro mi madre, que, de forma incondicional, entendió mis ausencias y mis malos momentos. Las palabras nunca serán suficientes para testimoniar mi aprecio y agradecimiento.

A todos ustedes, mi mayor reconocimiento y gratitud.

# ÍNDICE

## Resumen

Índice	1
Índice de cuadros	3
Índice de figuras	4
<b>1. Introducción</b>	<b>5</b>
<b>2. Antecedentes</b>	<b>7</b>
2.1. Diabetes mellitus 1 (DM1)	7
2.2. Panorama mundial y nacional de la DM1	7
2.3. Fisiopatología de la DM1	8
2.4. Tratamiento DM1	10
2.5. Modelos experimentales con trasplantes de órganos y de islotes de Langerhans.	11
2.5.1. Trasplante de Páncreas	11
2.5.2. Trasplante de islotes de Langerhans	12
2.6. Aislamiento de Islotes de Langerhans	13
2.7. Sitios para realizar el trasplante	14
2.8. Destrucción de los islotes trasplantados	16
2.9. Tratamientos inmunosupresores	17
<b>3. Justificación.</b>	<b>19</b>
<b>4. Hipótesis</b>	<b>20</b>
<b>5. Objetivo general</b>	<b>200</b>
<b>6. Objetivos específicos</b>	<b>20</b>
<b>7. Materiales y Métodos</b>	<b>21</b>
7.1. Materiales	21
7.1.1. Material	21
7.1.2. Equipo	21
7.1.3. Reactivos	21
7.1.4. Material Biológico	21
7.2. Metodología	21
7.2.1. Técnica de extracción y digestión pancreática.	21
7.2.2. Inmunohistoquímica	22
7.2.3. Determinación del rendimiento de la extracción pancreática	23

<b>8. Resultados y discusión</b>	<b>24</b>
<b>9. Conclusión</b>	<b>33</b>
<b>10. Bibliografía</b>	¡Error! Marcador no definido.



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Estimación de nuevos casos de DM1 por 100.000 niños por año.	7
2. Fisiopatología de la DM1	10
3. Identificación del conducto pancreático. Determinación del peso.	25
4. Punción e infiltrado del conducto pancreático.	26
5. Aislado de islotes en columna de ficoll.	30
6. Inmunohistoquímica de controles.	31
7. Caracterización de islotes aislados.	32

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
1. Concentración de Colagenasa Tipo IV.	28
2. Cantidad de Colagenasa Tipo IV para infiltrado pancreático.	28
3. Tiempo de digestión.	29
4. Tiempo y velocidad de centrifugado.	30
5. Diámetro de los islotes pancreáticos.	32

## 1. Introducción

La diabetes mellitus tipo 1 (DM1) es una enfermedad metabólica (ADA, 2004), caracterizada por la destrucción masiva de las células  $\beta$  pancreáticas productoras de insulina, que da como resultado niveles crónicos elevados de glucosa sanguínea (IDF, 2015). La etiología de la DM1 se considera multifactorial, aún se desconocen los mecanismos exactos para su desarrollo. Factores ambientales como la dieta y en forma importante las infecciones virales han sido relacionadas con el padecimiento (Knip et al., 2005). Se han descrito alrededor de 60 genes asociados a la DM1, de entre los cuales destacan los genes del antígeno leucocitario humano (HLA) de clase II (Noble et al., 2012), la mayoría de los mecanismos que se desencadenan están mediados por la infiltración linfocítica (Yoon et al., 2005), la producción local de citosinas proinflamatorias y de radicales libres del oxígeno (ROS), secretados por macrófagos, lo que provoca una pérdida de células  $\beta$ , disminuyendo paulatinamente la capacidad de producir insulina, desarrollándose hiperglucemia (Falcone et al., 1999; Mandrup et al., 1993). Es una enfermedad que se desarrolla principalmente en niños o adultos jóvenes; las personas así afectadas dependen del uso de insulina exógena para controlar los niveles de glucosa sanguíneos.

La incidencia de DM1 en menores de 15 años está en aumento en muchos países. En 2015, a nivel mundial, se calculaban aproximadamente 542,000 niños menores de 15 años con el padecimiento; por año, se estiman 86,000 nuevos casos; incrementando la incidencia de esta enfermedad en un 3% anualmente (IDF, 2015). En México, según datos del IMSS, en 2010 la incidencia era del 6.2% (Gómez-Díaz et al., 2012) y según datos de la Federación Internacional de Diabetes, se esperaba que para el 2015, habría aproximadamente 13,500 niños menores de 15 años con DM1.

El tratamiento tradicional propuesto para pacientes con DM1 está basado en la administración exógena de insulina de por vida (Zamani et al., 2015), esto ha permitido aumentar el promedio de vida. Sin embargo, el ajuste de la dosis puede ser complejo y con frecuencia, no permite alcanzar el grado de control necesario para evitar las complicaciones crónicas. El tratamiento con insulina exógena no

siempre es efectivo, muchos pacientes presentan hiperglucemia a pesar del tratamiento; en los casos donde se logran niveles normales de glucosa, frecuentemente se presentan episodios graves de hipoglucemia (Nordfeldt et al., 2005; Savard et al., 2016).

Todo esto ha motivado la búsqueda de nuevas alternativas en el tratamiento, que permitan restaurar el metabolismo normal de la glucosa mediante la recuperación de la masa celular  $\beta$ . El trasplante pancreático y el aislado de células  $\beta$  son una de las alternativas que ha cobrado mayor importancia (CITR, 2008). El trasplante de islotes pancreáticos ha permitido la independencia de insulina hasta por 5 años (CITR, 2008; Shapiro et al., 2000). Sin embargo, el uso de esta técnica presenta diversas limitaciones que se pueden agrupar en la dificultad técnica del proceso de aislamiento de islotes (punción del conducto pancreático, colagenasa, tiempo de digestión, velocidad y tiempo de centrifugado) (Brandhorst et al., 2008; de Haan et al., 2004), la insuficiente cantidad de islotes disponibles para trasplantar, el efecto de los inmunosupresores y la pérdida de función y destrucción de los islotes una vez trasplantados, lo que ha limitado la eficiencia del trasplante. Las investigaciones actuales se han centrado en mejorar las técnicas de aislamiento y trasplante a fin de disminuir el riesgo por los puntos mencionados, con el fin de prolongar la funcionalidad del trasplante y mejorar la calidad de vida del paciente con DM1 (Sakuma et al., 2008).

El objetivo de este trabajo es el establecimiento y estandarización de la técnica de aislado de islotes pancreáticos en un modelo murino, que nos permita garantizar el aislado de material viable y funcional para su posterior evaluación en un modelo murino de DM1. Los islotes se obtendrán mediante la infiltración *in situ* de colagenasa tipo IV, a través del conducto pancreático, para posteriormente, seguir la digestión *in vitro*, y finalmente, realizar la separación mediante una columna de Ficoll. Los islotes así aislados serán cuantificados para determinar el rendimiento de la técnica.

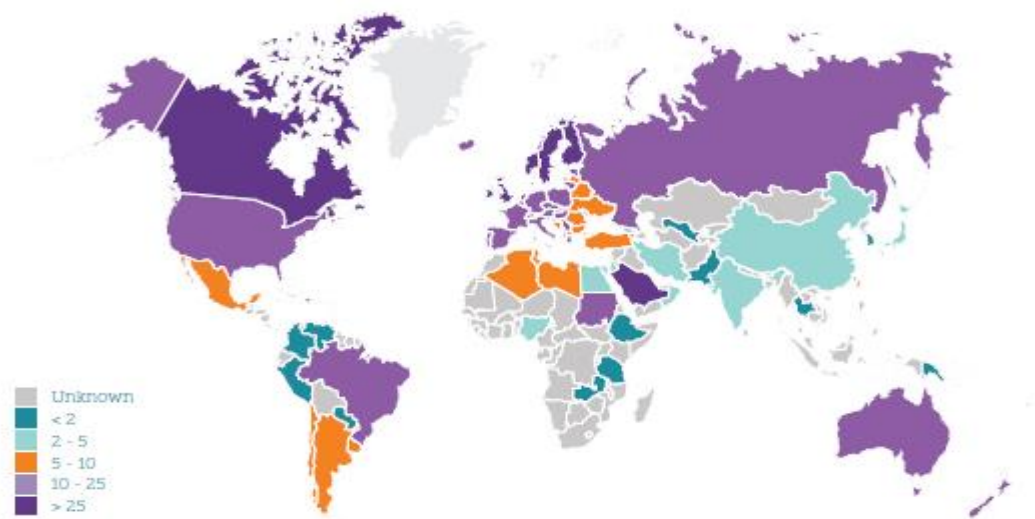
## 2. Antecedentes

### 2.1. Diabetes mellitus 1 (DM1)

La DM1 es provocada por una reacción autoinmune en la que el sistema inmunitario ataca a las células  $\beta$  pancreáticas productoras de insulina, disminuyendo paulatinamente la capacidad de secreción de insulina, dando como resultado niveles elevados de glucosa sérica. Es una enfermedad que afecta principalmente niños y adultos jóvenes; el tratamiento habitual es a través de la administración de insulina con el fin de controlar los niveles de glucosa (IDF, 2015).

### 2.2. Panorama mundial y nacional de la DM1

En los últimos años, la incidencia de DM1 en menores de 15 años ha venido en aumento; en 2015, alrededor del mundo se calcularon 542,000 niños menores de 15 años con DM1 y por año, se estiman 86,000 nuevos casos (IDF, 2015).



**Figura 1.** Estimación de nuevos casos de DM1 por 100.000 niños menores de 15 años por año (IDF, 2015).

### 2.3. Fisiopatología de la DM1

Anatómicamente, el páncreas está conformado de 4 regiones: la cabeza, el cuello, el cuerpo y la cola; además, está clasificado como una glándula mixta, compuesto por dos tipos de tejido, el endocrino y exocrino. En humanos, el tejido exocrino representa aproximadamente el 80 a 85% del tejido pancreático, mientras que la matriz extracelular y los vasos sanguíneos ocupan entre el 10 y 15% y sólo un 2%, constituye la parte endocrina del páncreas. El tejido exocrino está formado por los acinos pancreáticos y el sistema ductal; el tejido endocrino contiene conjuntos de células denominados islotes de Langerhans, aproximadamente un millón por páncreas. Los islotes pancreáticos están rodeados por una red capilar a través de la cual se realiza su secreción endocrina. Tienen un tamaño aproximado de 50 a 250 micras, son esféricos o elipsoides y se encuentran en mayor densidad hacia la cola del páncreas (Rahier et al., 2008).

Los islotes de Langerhans presentan cuatro tipos de células endocrinas:

- Células  $\beta$  productoras de insulina, 75-80% de las células presentes en los islotes.
- Células  $\alpha$  productoras de glucagón, 15% de los islotes.
- Células  $\delta$  productoras de somatostatina, 5% de las células de los islotes.
- Células PP productoras del polipéptido pancreático, alrededor del 2% (Longnecker, 2014).

La etiología de la DM1 se considera multifactorial, aún se desconocen los mecanismos exactos para su desarrollo. Factores ambientales como la dieta y en forma importante las infecciones virales han sido relacionadas con el padecimiento (Knip, et al., 2005). Se han descrito alrededor de 60 genes asociados a la DM1, de entre los cuales destacan los genes del antígeno leucocitario humano (HLA) de clase II, principalmente HLA-DRB1, HLA-DQA1 y HLA-DQB1 conocidos por ser responsables de aproximadamente un 50% de los casos de DM1 (Noble et al., 2012). Es característico el proceso de infiltración por células inmunitarias autorreactivas al cual se le conoce como insulinitis (Gazda et al., 1997).

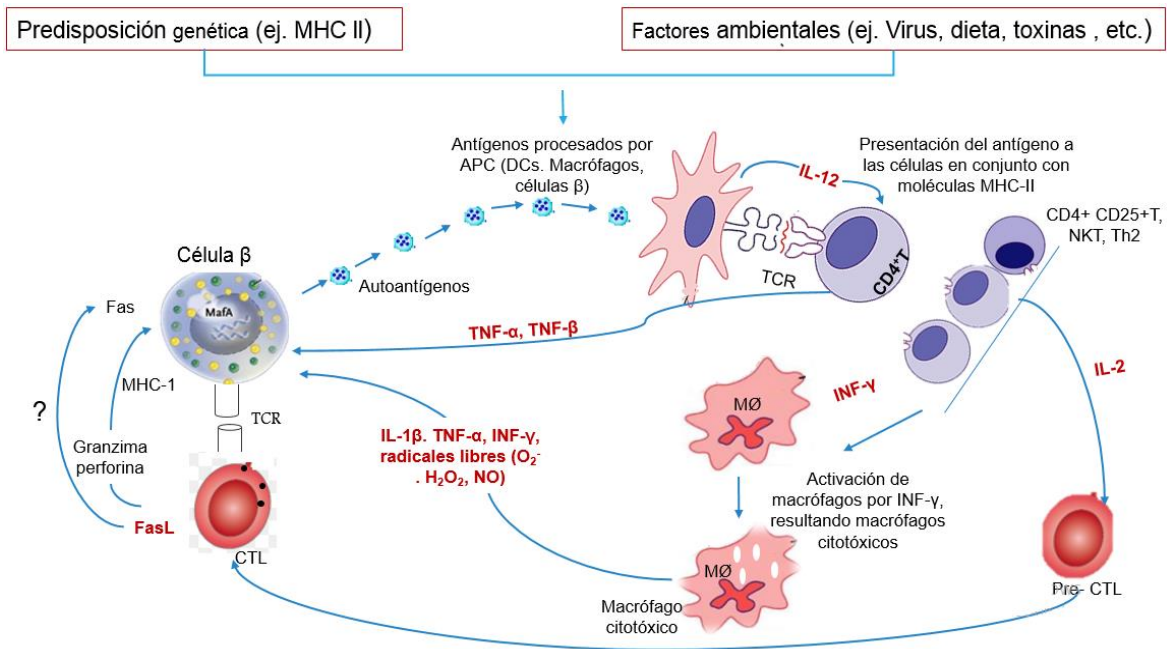
El complicado proceso por el cual se explica la patología de la DM1 implica la presencia de autoanticuerpos en respuesta a diferentes autoantígenos presentes en pacientes con DM1. Algunos de los autoanticuerpos detectados son anti-islole (ICA) (Pietropaolo et al., 2005) frente a insulina (IAA), descarboxilasa de ácido glutámico (GAD65), antígeno 2 de insulinoma (IA-2) (Allen et al., 2009) y transportador de zinc ZnT8 (Steck et al., 2011).

La presencia de estos autoantígenos facilita el proceso de la destrucción de las células  $\beta$ , mediante la acción de las células presentadoras de antígenos (APC) que expondrán los antígenos a la superficie de la membrana en asociación con las moléculas de histocompatibilidad de clase II, además de presentarse una infiltración de IL-12. De esta forma, serán reconocidos por los linfocitos T principalmente linfocitos CD4, los cuales tienen la capacidad de inducir la activación del sistema inmune, principalmente de citosinas como la IL-2 e interferón alfa, beta y gamma (Lee et al., 2005). Tanto la IL-2 como el IFN-gamma (IFN-g) promueven la activación de linfocitos T citotóxicos y macrófagos.

Los linfocitos T citotóxicos, también conocidos como CD8+, tienen la capacidad de activar la apoptosis mediante diferentes mecanismos, entre los cuales destaca la producción de proteínas como perforina y granzima, específicas para la mediación de lisis celular, o bien, mediante la proteína Fas y su ligando (Kim et al., 2012).

Después de la secreción del IFN-gamma, los macrófagos se vuelven citotóxicos y secretan diversas citoquinas como IL-1b, TNF-a e IFN-g y radicales libres que promoverán la muerte de la célula  $\beta$  (Wachlin et al., 2003).

Aunado a lo anterior, cuando el sistema antioxidante pierde la capacidad de controlar la producción de radicales libres, se produce un incremento de la peroxidación lipídica, que da como resultado mayor producción de radicales libres, citotoxicidad y por ende, muerte celular.



**Figura 2.** Fisiopatología de la DM1. Donde: Fas L, ligando de Fas; MHC-1, moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad; TCR, receptor de linfocitos T; CTL, linfocitos T citotóxicos; TNF- $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ , factor de necrosis tumoral; IL-1 $\beta$ , 2 y 12, Interleucina; O<sub>2</sub>, Oxígeno; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peróxido de hidrógeno; NO, óxido de nitrógeno; CD4<sup>+</sup>T, linfocitos T colaboradores. Modificado de Yoon y Jun, 2005.

#### 2.4. Tratamiento DM1

El tratamiento más utilizado en la actualidad para pacientes con DM1 es la aplicación de insulina exógena y sus diferentes análogos. La finalidad del uso de insulina y sus análogos es proporcionar al paciente un mejor control metabólico, que permita tener niveles de glucosa lo más cercano posible a los valores normales (Malik et al., 2014). Si bien el uso de la insulina ha permitido la sobrevivencia de miles de pacientes, su administración exógena presenta diversas limitaciones. Determinar la cantidad exacta es uno de los principales problemas, con frecuencia los pacientes, niños y adolescentes, exigen ajustar la dosis de forma frecuente, complicando la administración ideal de insulina exógena. El tratamiento con insulina exógena no siempre es efectivo, muchos pacientes presentan hiperglucemia a pesar del tratamiento; en los casos los que se logran niveles normales de glucosa, frecuentemente se presentan episodios graves de hipoglucemia (Nordfeldt et al., 2005). Además del problema relacionado con el ajuste de la dosis ponderal, existen complicaciones asociadas que no han podido



erradicarse como la hiper e hipoglucemia. Debido a que la DM1 requiere tratamiento con insulina de por vida, se buscan nuevas alternativas de tratamiento que permita restaurar el metabolismo fisiológico de la glucosa. El trasplante de células  $\beta$ , en forma de órgano completo o aislado, son una de las alternativas más prometedoras que han cobrado mayor importancia (CITR, 2008).

## **2.5. Modelos experimentales con trasplantes de órganos y de islotes de Langerhans.**

Las complicaciones asociadas a la DM1 y la falta de control adecuado de los niveles de glucosa sérica han llevado a la búsqueda de nuevos tratamientos, los cuales permitan restaurar la masa  $\beta$  perdida para conseguir valores normales de glucosa. Entre las alternativas más prometedoras se encuentra el trasplante de páncreas y el reemplazo de células  $\beta$  que pueden restablecer la euglicemia y lograr la independencia del uso de insulina exógena en pacientes con DM1, sin el riesgo asociado de hipoglucemia (CITR, 2008).

### **2.5.1. Trasplante de Páncreas**

El trasplante pancreático es un método utilizado desde 1966 como tratamiento para la DM1; los primeros trasplantes se llevaron a cabo con injertos pancreáticos ligados al riñón del donante. A través de los años, la técnica de trasplante se ha venido modificando, tratando de disminuir las complicaciones postoperatorias (Kelly et al., 1967).

Entre los reportes que permiten visualizar este avance destacan: En 1973, con el implante en cuatro pacientes con segmentos pancreáticos y en los cuales, los ajustes de la técnica consistieron en evitar trasplantar el duodeno, mediante una anastomosis del conducto pancreático al uréter ipsilateral (Gliedman et al., 1973). En 1978, se reporta una nueva técnica, la cual consistía en inyectar un material líquido de caucho sintético (neopreno), material con el cual se lograba islotes bien vascularizados y funcionando por periodos prolongados de hasta 8 meses (Dubernard et al., 1978). En 1983, se informó de una técnica basada en el drenaje vesical de un injerto segmentado. Esta técnica tuvo una amplia popularidad y fue

utilizada hasta finales de los 90's, debido a la baja incidencia de complicaciones quirúrgicas y a que, mediante la medición de los descensos de amilasa en la orina, podían detectar el rechazo al injerto.

En resumen, los principales problemas asociados al trasplante de páncreas radican en la escasez de donantes, una cirugía invasiva y complicaciones postoperatorias tempranas tales como la trombosis, pancreatitis, infecciones, etc. (Li et al., 2016).

### **2.5.2. Trasplante de islotes de Langerhans**

El trasplante de islotes de Langerhans es una de las alternativas más prometedoras en el tratamiento de la DM1. Las técnicas utilizadas para el aislamiento de los islotes de Langerhans tienen sus primeras aportaciones en 1965, con el trabajo de Moskalewski que informó sobre el aislamiento de islotes de Langerhans mediante digestión parcial del páncreas de cobayo con el uso de colagenasa, obteniendo un procedimiento reproducible y que garantizaba la obtención de una cantidad suficiente de islotes viables (Moskalewski et al., 1965).

En 1967, Paul Lacy informó un método para aislar islotes de Langerhans de rata que consistía en inyectar a través del conducto pancreático solución de Hanks, seguido de una digestión con colagenasa y separación por sedimentación, los islotes obtenidos liberaban insulina *in vitro*, además de mostrar una morfología aparentemente normal a la observación por microscopía óptica (Lacy et al., 1967).

En 1988, Ricordi describió un método automatizado para el aislamiento de islotes de Langerhans humanos, mediante el uso de un gradiente de Ficoll, con el cual se conseguían islotes con altos niveles de rendimiento y pureza. Además, se observaban islotes morfológicamente intactos y capaces de responder a la estimulación con glucosa (Ricordi et al., 1988). En la década de 1990, se realizaron hasta 267 trasplantes de islotes, dando como resultado la independencia de sólo un 12, 4% de pacientes por más de una semana y con una viabilidad mayor de un año de tan sólo el 8,2% (Brendel et al., 1999).

Fue hasta el año 2000 donde se implementó el protocolo de Edmonton, dirigido por Shapiro, en el cual se trasplantaron a siete pacientes con islotes de Langerhans obtenidos por perfusión con colagenasa y trasplantados a través de la vena porta, el trasplante fue acompañado de un tratamiento inmunosupresor con sirolimus, tacrolimus y daclizumab, al cual se le atribuye el éxito del implante (Shapiro et al., 2000).

El protocolo de Edmonton ha sido considerado un antes y un después en la historia de los trasplantes con islotes de Langerhans. Aún después del éxito obtenido con este protocolo, el trasplante de islotes de Langerhans presenta todavía considerables limitaciones que pueden disminuir la eficiencia y el éxito de este procedimiento. Entre ellas, se encuentran la dificultad técnica del procedimiento, la insuficiente cantidad de islotes disponibles para trasplante y la pérdida de función y destrucción de los islotes una vez trasplantados.

## **2.6. Aislamiento de Islotes de Langerhans**

El procedimiento tiene numerosos aspectos críticos entre los que se encuentran el conseguir un número suficiente de islotes, viabilidad, funcionalidad y pureza adecuados para el trasplante. Algunos otros aspectos a tomar en cuenta para un aislamiento exitoso son la calidad de la colagenasa, las características del donante (edad, obesidad, estabilidad hemodinámica previa) y por supuesto, la habilidad técnica del equipo que realiza el aislamiento. En los casos exitosos, tan sólo alrededor del 30-50% de los islotes del páncreas son recuperados, debido al estrés mecánico y químico que los lesiona. Además de tomar en cuenta que la única fuente actual de células  $\beta$  para trasplantar proviene de los donantes de órganos (Sakuma et al., 2008).

Con respecto al donador, existen factores que deberán ser considerados para garantizar la obtención de islotes pancreáticos con un mayor rendimiento y adecuada funcionalidad. La mayor parte del material pancreático proviene de donantes con muerte cerebral, factor que se ha asociado a una disminución en la calidad de los islotes obtenidos, ya que se ha observado que el rendimiento y la calidad proveniente de donantes vivos, es mayor en comparación con pacientes

con muerte cerebral (Jung et al., 2007). La edad del donante es otro factor que impactará sobre la calidad de los islotes aislados. Kaddis et al., (2010) reportaba que la obtención de islotes de pacientes mayores nos daría un rendimiento más pobre, sin embargo Niclauss (2011) no reportó diferencias en los islotes obtenidos de pacientes menores de 45 años contra pacientes mayores de 45 años. Además, reportó que la función del trasplante se vio reducida en donadores de edad avanzada. Se ha descrito que los pacientes con sobrepeso son candidatos idóneos para ser donadores, de esta forma se obtienen mejores rendimientos de islotes, contrario a lo que sucede con el trasplante de páncreas, donde un páncreas con grasa en la periferia no cumple con la funcionalidad deseada una vez trasplantado (Ridway et al., 2010).

El proceso de aislamiento de islotes pancreáticos inicia con la infiltración a través del conducto pancreático, de enzimas digestivas como la colagenasa y la liberasa (Shapiro et al., 2000), seguida de una más prolongada digestión enzimática con agitación vigorosa y por último, para la obtención de los islotes pancreáticos se utilizan gradientes de Ficoll, separando las fracciones endocrinas de las exocrinas, de acuerdo a la diferencia de densidades (Azarpira et al., 2014). Esta técnica somete a los islotes a daño mecánico, enzimático, osmótico y estrés isquémico, razón por la cual es frecuente obtener pocos islotes o islotes disfuncionales (Nano et al., 2005).

## **2.7. Sitios de para el trasplante**

El sitio del trasplante ha sido otro punto de discusión, en la búsqueda del sitio idóneo para realizar el trasplante, se han evaluado diferentes sitios anatómicos como son:

El trasplante de islotes intratímico tiene una ventaja sobre los demás ya que es un sitio de fácil acceso, además de permitir cierto grado de tolerancia inmunitaria (Juang et al., 1995). Otro sitio explorado es el trasplante en el espacio intratecal, que ha mostrado viabilidad prolongada del implante, aunque el acceso al sitio muestra dificultades, por lo cual aún no es considerado como el sitio idóneo (Hara et al., 1993).

En 2010, se compararon diferentes sitios para trasplantar los islotes, los lugares analizados fueron el riñón, hígado, músculo y la bolsa omental. En relación a la cirugía, los trasplantes subcapsular en riñón y músculo, son menos invasivos; contrario al trasplante en hígado y en epiplón, en los cuales existen mayor riesgo de mortalidad (Kim et al., 2010). En lo referente a la funcionalidad en músculo se ha considerado como un sitio con poca viabilidad, debido a su pobre perfusión tisular; el trasplante en la bolsa omental ofrece ventaja como un buen suministro de sangre, sin embargo, no es un sitio adecuado en pacientes que requieran laparotomía (Hiller et al., 1991).

El trasplante subcapsular del riñón representa un sitio con una rica vascularización, con lo cual se esperaría fuera un sitio idóneo para el trasplante a pesar del acceso quirúrgico. Sin embargo, los resultados en humanos no han sido tan benéficos como lo observado en modelos animales (Juang et al., 2005).

Por último, el trasplante hepático a través de la vena portal, ha sido de los más utilizados y en humanos, ha proporcionado buenos resultados debido a que brinda una adecuada vascularización, lo que permite una alta viabilidad y el sitio puede ser accesible por perfusión percutánea. El implante de islotes de Langerhans es el estándar actual en la búsqueda de un mejor tratamiento de la DM1 en humanos (Kemp et al., 1973; Shapiro et al., 2000).

En base a los experimentos realizados tanto en animales como en humanos, para identificar el sitio ideal para el trasplante de islotes se ha concluido que el sitio idóneo debería contar con los siguientes requisitos:

- Minimizar las reacciones inflamatorias
- Proporcionar un microambiente bien vascularizado
- Proporcionar un acceso fácil
- Proteger el trasplante de las respuestas autoinmunes (Tchervenivanov et al., 2002).

## **2.8. Destrucción de los islotes trasplantados**

Realizado el trasplante existen mecanismos mediante los cuales se produce la destrucción del material trasplantado. Se ha observado que una semana después del trasplante, se pierde una gran parte de los islotes (Jirak et al., 2009).

Esta pérdida se lleva a cabo por mecanismos que involucran a la respuesta inflamatoria inespecífica, mediada por citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), la interleucina 1 (IL-1) y el interferón gamma (IFN-gamma). Estas citocinas tienen la capacidad de estimular la producción de radicales libres de oxígeno en células como los macrófagos, los cuales estarían implicados en la destrucción de los islotes trasplantados (Jindal et al., 2000).

Otro de los mecanismos por los cuales se pierde el material trasplantado es la presencia de autoanticuerpos, por ejemplo, se ha observado que la presencia de aumentos en el autoanticuerpo anti-islole 2, aumenta significativamente el riesgo en el fracaso del injerto, en comparación con pacientes que no lo presentan. Además, una vez realizado el trasplante, se activan sistemas de coagulación y el complemento, con lo que los islotes son rodeados de coágulos e infiltrados por leucocitos causando daño sobre los islotes, explicando en gran medida los resultados poco satisfactorios del trasplante de islotes de Langerhans en humanos (Piemonti et al., 2013).

Se han identificado los anticuerpos anti-HLA específicos del donante como una causa importante de la destrucción de los islotes, los cuales llegan a ser desencadenados de forma abrupta tras la suspensión del tratamiento inmunosupresor, aunque es importante destacar que en el trasplante no produce un aumento considerable de anticuerpos anti-HLA, como si sucede con el trasplante de páncreas (Bennet et al., 2000). Por último, se debe de tomar en cuenta que los islotes trasplantados con el transcurso del tiempo llegaran a ser destruidos por la autoinmunidad que desencadenó originalmente la DM1.

## **2.9. Tratamientos inmunosupresores**

Con el fin de prolongar la viabilidad y funcionalidad del trasplante de islotes de Langerhans, se ha buscado atacar los mecanismos que llevan a la destrucción de los islotes una vez trasplantados. Algunas de las estrategias que se han seguido para evitar los daños a los islotes consisten en la eliminación de los antígenos, es decir extracción de los epítomos inmunogénicos, uno de los ejemplos más claros es la presencia del anticuerpo dirigido contra el epítomo Gal, de esta manera se puede prevenir el rechazo al trasplante de islotes (Lin et al., 2000).

Evitar la activación de la cascada del complemento es otra de las alternativas a los tratamientos inmunosupresores, en las cuales se busca el uso de inhibidores específicos al complemento. Los inhibidores estudiados son el receptor del complemento soluble tipo 1, el veneno de cobra, producción de animales transgénicos para proteínas como hCD55, HCD46 (Kobayashi et al., 1997; Lam et al., 2005; Menoret et al., 2004). Sin embargo, en este caso llega a ser necesario inhibir múltiples etapas de la cascada del complemento (Huber-Lang et al., 2006). Las estrategias farmacológicas apuntan a la eliminación de aquellas células productoras de anticuerpos, usando fármacos inmunosupresores como es el caso de la ciclofosfamida, ricina o bortezomib (Bauer et al., 2010; Cozzi et al., 2003; Tanemura et al., 2002). Aunque el uso de estos fármacos aun no logra prolongar de manera importante la viabilidad del trasplante.

El quimerismo hematopoyético mixto es otra opción que para disminuir la pérdida de los islotes trasplantados, mediante la inducción de la tolerancia de las células B (Ohdan et al., 1999), observándose que mediante esta inducción se obtendrá una aceptación del trasplante sin necesidad de algún otro tipo de inmunosupresión.

El uso de anticuerpos anti-CD154, ha sido utilizado con el fin de prolongar la supervivencia del implante y ha resultado ser muy prometedor (Cardona et al., 2006; Kuwaki et al., 2005), sin embargo, se han presentado complicaciones como eventos tromboembólicos que lo han descartado (Ezzelarab et al., 2009).

La tolerancia de células T es otra de las alternativas exploradas desde 1996, mediante el trasplante de tejido tímico como forma de inducción de tolerancia. Además, es funcional en alo y xenotrasplantes (Wu et al., 2008), la activación de la tolerancia de las células T ha mostrado suprimir la respuesta de la activación de macrófagos y células B ( Singh et al., 2012).

Hasta el momento, la terapia más prometedora es el propuesto en el protocolo de Edmonton, con el uso de un tratamiento libre de corticosteroides, a base de tacrolimus y sirolimus (Shapiro et al., 2000).

La estandarización de la técnica de aislamiento de islotes de Langerhans, nos permitirá aislar islotes para su posterior implante en un modelo murino de DM1, además de proponer un tratamiento que nos permita ofrecer una tolerancia inmunitaria y con lo cual, se esperaría prolongar la viabilidad y funcionalidad del trasplante de islotes pancreáticos. Lo que en un futuro permitiría ofrecer a los pacientes con DM1 un tratamiento alternativo con el cual puedan liberarse del uso de la insulina exógena y prevenir la aparición de las complicaciones crónicas asociadas a la DM1.



### **3. Justificación.**

La DM1 es una enfermedad metabólica autoinmune causada por la destrucción de las células  $\beta$  pancreáticas, provocando una deficiencia progresiva de insulina y un aumento patológico de los de glucosa; afecta principalmente a niños y adolescentes. A nivel mundial, se han estimado alrededor de 542,000 niños menores de 15 años con DM1; por año, se presenta una incidencia de alrededor de 86,000 nuevos casos. A nivel nacional, en 2015 había aproximadamente 13,500 niños menores de 15 años con DM1 (IDF, 2015). Es uno de los padecimientos con mayor morbi-mortalidad, consume gran parte de los recursos sanitarios a nivel mundial, aproximadamente 1,197 mil millones de dólares (IDF, 2015). A nivel nacional, se estiman gastos por 1,1563 mil millones de dólares (PEF, 2012). Por todo esto, existe una intensa investigación para el desarrollo de nuevas terapias que permitan un control metabólico más estricto en esta patología, entre las que se encuentran el trasplante de páncreas, trasplante de islotes de Langerhans y el tratamiento con células madre. De entre éstos, el trasplante de islotes constituye un tratamiento bastante prometedor ya que proporciona un adecuado control glucémico, evitando la administración diaria de insulina. La estandarización de la técnica de aislamiento de islotes pancreáticos, permitirá obtener material viable y funcional para su posterior aplicación como trasplante a partir de la vena porta en un modelo murino de DM1 y proyectarlo como un tratamiento alternativo en la DM1.

#### **4. Hipótesis**

La estandarización de la técnica de aislamiento de islotes pancreáticos, permitirá la obtención de islotes de Langerhans viables para su posterior implante en un modelo murino de DM1.

#### **5. Objetivo general**

Estandarizar la técnica de aislamiento de islotes de Langerhans.

#### **6. Objetivos específicos**

1. Desarrollar la técnica de aislamientos de islotes de Langerhans, mediante la separación por columna de Ficoll.
2. Determinar el rendimiento en la obtención de islotes viables.
3. Caracterización de los islotes de Langerhans aislados.

## **7. Materiales y Métodos**

### **7.1. Materiales**

#### **7.1.1. Material**

Jeringas de insulina y de 5cc, Material Quirúrgico, Mesh con poros de 0.5mm de diámetro, Pipetas desechables de 10cc, Pipeta eléctrica, Tubos Falcon de 50cc.

#### **7.1.2. Equipo**

Centrífuga refrigerada

Microscopio

Campana de flujo laminar

#### **7.1.3. Reactivos**

Colagenasa tipo IV (C5138, Sigma)

Ficoll-paque (17-5446-52, GE Healthcare)

Medio DMEM (D5796, Sigma)

Suero Fetal Bovino (FGR-BBT-5XM, RMBIO)

#### **7.1.4. Material Biológico**

Los animales fueron obtenidos del Bioterio del INB-UNAM, ratas Wistar macho de más de 400 grs de peso.

### **7.2. Metodología**

#### **7.2.1. Técnica de extracción y digestión pancreática.**

Se trabajó con ratas sanas para la extracción pancreática. Se sacrificaron con éter como lo marca la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Posteriormente, se realizó una incisión abdominal con tijeras de disección, hasta exponer el páncreas y se identificó el conducto pancreático. Se introdujo a través del conducto pancreático una jeringa de insulina de 1 cc con colagenasa tipo IV. Se instiló la colagenasa a través del conducto pancreático hasta conseguir la infiltración completa del órgano. Posteriormente, el páncreas fue extraído y colocado en un tubo de Falcon de 50 mL, manteniéndolo en hielo. Al término de la disección, el páncreas fue colocado en baño María a 37°C, por 17-19 minutos

(este tiempo debe ajustarse de acuerdo a cada lote de colagenasa), este paso permitió la activación de la digestión por temperatura. Al terminar este lapso, la digestión fue detenida añadiendo medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%. Se procedió a realizar la agitación vigorosa hasta tener una mezcla homogénea, pasándolo a través del mesh con poros de 0.5 mm de diámetro. Después, se realizaron lavados con medio DMEM para hacer pasar todos los residuos. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con medio DMEM, centrifugando a 1200 rpm, por 5 minutos en cada ocasión.

El pellet obtenido fue reconstituido con medio DMEM en un tubo Falcon de 50 ml; posteriormente, se añadió una capa de Ficoll, comenzando su aplicación en el fondo del tubo, con apoyo de una pipeta serológica de 10 mL, teniendo precaución de no mezclar las capas, permitiendo la presencia de la interfase entre el medio que contiene los islotes y el Ficoll. Una vez obtenido esta preparación, fue centrifugada por 20 minutos a 4°C, con desaceleración lenta. Al terminar, se recolectaron los islotes que quedaron en la interfase, con una pipeta de 1000 uL. El material recolectado fue colocado en un tubo Falcon de 50 mL, donde se realizaron dos lavados con medio DMEM. Finalmente, se colocaron en una caja de petri para visualizarlos y contarlos en el microscopio.

### **7.2.2. Inmunohistoquímica**

La inmunohistoquímica se realizó de la siguiente forma:

Una vez obtenido el pellet de la extracción del concentrado de islotes de Langerhans se procedió a su fijación con paraformaldehído al 3.5%. Esta fijación se realizó durante media hora. Posteriormente, se hicieron 4 lavados con PBT (PBS/Tritón X-100 0.1%) de 10 minutos cada uno. Se realizó una serie de lavados para deshidratar las muestras con metanol 10%, 30%, 50% y 80%, 5 minutos por lavado. Después, para inactivar peroxidasas endógenas se realizó otro lavado con metanol 80% y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 6%, por 2 hrs, a temperatura ambiente. Al término de este tiempo se hizo el bloqueo con una solución con PBT-M (PBS/Tritón X-100 0.1%/leche 2%), durante 30 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar este tiempo, se añadió el anticuerpo primario contra Insulina (1/1000) y se dejó toda la

noche a 4°C. Posteriormente, se realizaron 6 lavados de 10 minutos cada uno con PBT-M, a temperatura ambiente. Después del término de los lavados, se añadió el anticuerpo secundario Anti-mouse biotinilado 1/200, diluido en PBS/Tritón X-100 0.1%/leche 2%/suero de cabra inactivado por calor 10%, durante toda la noche. Al término de este lapso, se lavó en 6 ocasiones en PBS/Tritón X-100 0.1%/leche 2%/suero de cabra inactivado por calor 10%, 10 minutos cada uno. Posteriormente, se realizó un lavado con PBT, en 2 ocasiones por 10 minutos cada una. Para realizar el revelado, se preparó una solución con Abidina y Biotina, 11 µL de cada uno para cada 1000 µL de PBT y se dejó reposar durante 30 minutos. Se incubó con la muestra durante 2 hrs a temperatura ambiente; posteriormente, se hicieron 4 lavados de 5 minutos cada uno con PBT. Al final, se agregó una solución de DAB (32 µL), Buffer (16 µL), Níquel (16 µL) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (16 µL) por cada 1000 µL de PBT. Se reveló por espacio de 30 segundos a 3 minutos, tomando en cuenta la intensidad del revelado requerido; la reacción se detuvo lavando con PBT frío, 4 lavados de 5 minutos cada uno.

Al final, se agregó Entellan®, se colocó en un cubreobjetos y se selló con barniz. Posteriormente, se visualizó en el microscopio.

### **7.2.3. Determinación del rendimiento**

La determinación del rendimiento se determinó a partir del conteo del número de islotes presentes en ocho laminillas, tratadas previamente con la inmunohistoquímica. Se realizó el conteo por cada laminilla y se promediaron los valores obtenidos.

## **8. Resultados y discusión**

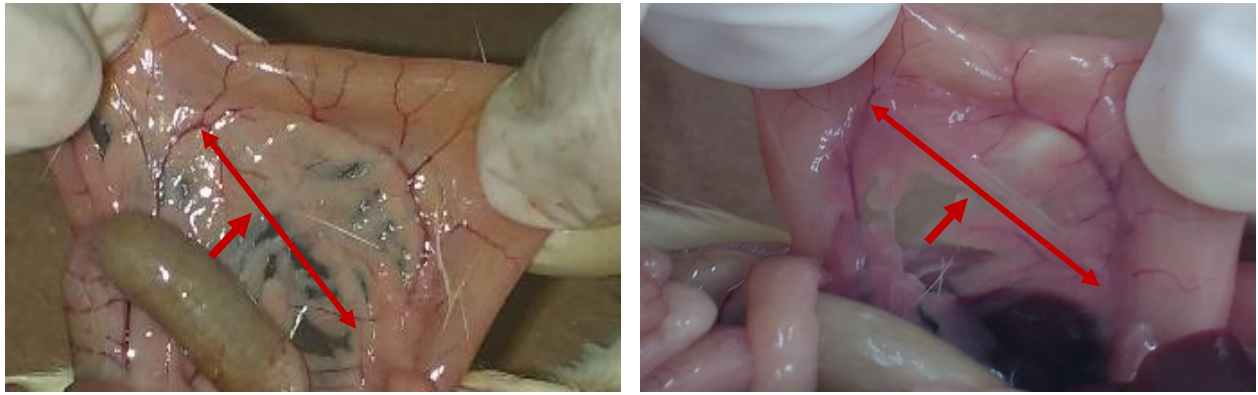
La estandarización de la técnica de aislamiento de islotes pancreáticos es indispensable para establecer las características del procedimiento en común que nos permita la obtención de material viable y con un rendimiento en la obtención de islotes superior o similar a los reportados en publicaciones previas.

La estandarización de islotes requiere enfocarse en puntos clave que permitirán el desarrollo de un procedimiento aceptable en cuestión de calidad y rendimiento de la técnica.

### **Técnica de extracción y digestión pancreática.**

- **Peso promedio de la rata**

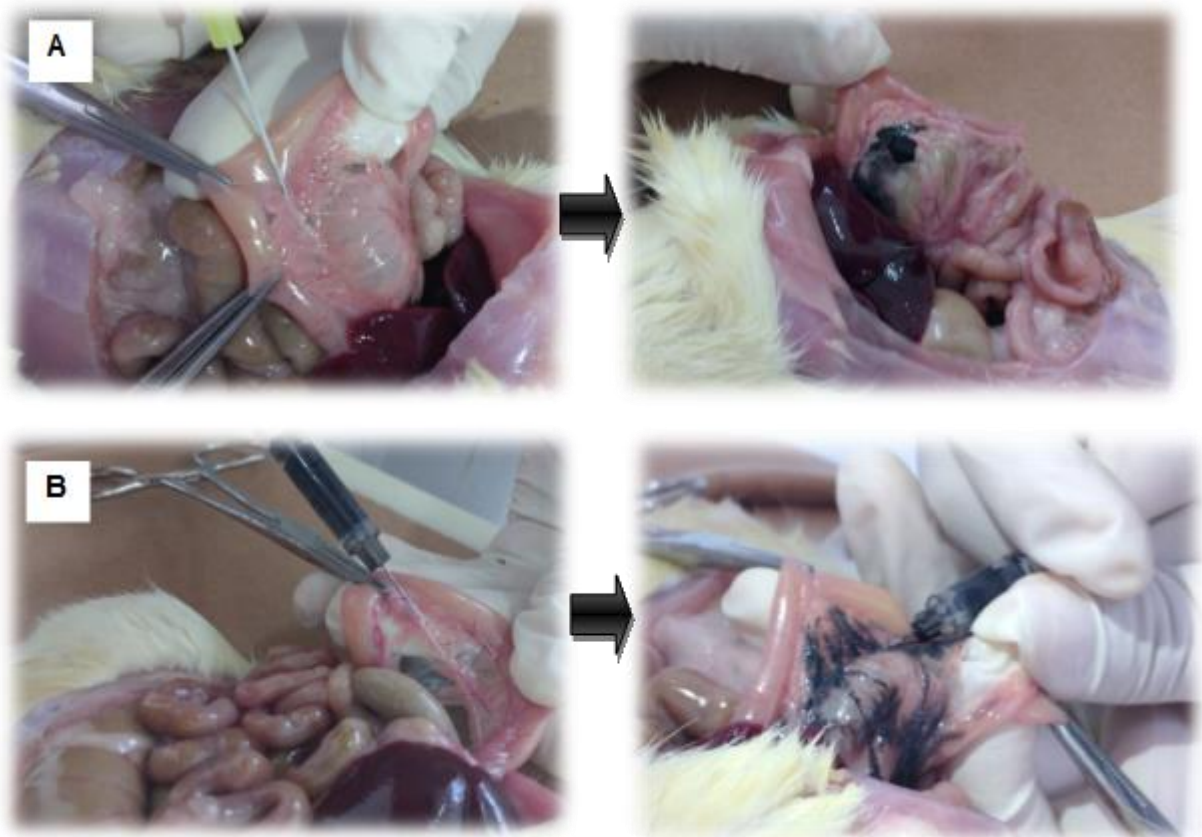
En el proceso de la estandarización se logró concluir que el peso de la rata sería crucial en el éxito de canalización e infiltración de la colagenasa tipo IV. Los protocolos analizados hacen referencia al uso de ratas con un peso de 150 a 180 g (O'Dowd, 2009), en su mayoría refieren usar ratas con un peso de 250 a 300 g (Cavallari, 2007), sin embargo, algunos de los artículos revisados llegan a obviar esta información. En base a lo antes mencionado se trabajó con ratas con un peso de entre 250 y 300 g, trabajar con ratas con este peso promedio fue bastante complicado debido a la dificultad en la localización del conducto pancreático, una vez localizado el conducto pancreático era demasiado delgado y poco visible con lo cual la canalización del mismo era imposible provocando la perforación y con ello la fuga de la colagenasa tipo IV. Por lo anterior se decidió trabajar con ratas con un peso mayor a 450 g, con el aumento en el tamaño de la rata se observó un aumento en el tamaño del páncreas y por ende en el tamaño del conducto pancreático facilitando la localización del mismo, así como el infiltrado de la colagenasa tipo IV. En la Figura 3 se observa la calidad del conducto pancreático en las ratas de 250 a 300g contra las ratas con un peso mayor a 450g.



**Figura 3.** Identificación del conducto pancreático. A) Ratas con peso de 250 a 300 g. B) Ratas con peso mayor a 450 g. Flecha roja: Conducto pancreático.

**Infiltración del conducto pancreático.** Poco se menciona en los protocolos publicados en relación a la forma de realizar el infiltrado o bien el material con el cual se realizara. Sin embargo, es un punto crítico ya que de no contarse con el material adecuado podría ocurrir un daño mecánico sobre el páncreas y perder por completo el órgano o tener una baja en el rendimiento de la técnica. La mayoría de los artículos consultados se limitan a mencionar que se realiza una canulación del conducto pancreático sin ser más específicos sobre el material con el cual realizan el procedimiento (Chaib, 2000; Carter, 2009; Morini, 2006). La mayor información que se ha obtenido para la realización de este proyecto es el uso de un catéter hecho especialmente para infiltrar el conducto pancreático aunado a una ligadura fija, sin hacer mayor referencia en medidas o alguna otra característica especial (Pang, 2015). Por lo mencionado anteriormente, como equipo de trabajo concluimos que estandarizar el material con el cual se puncionará e infiltrará el conducto pancreático permitirá garantizar el tener o no material para la extracción de los islotes pancreáticos, ya que si el conducto pancreático llega a ser perforado perderemos el órgano o el rendimiento de nuestra técnica será insuficiente. Las primeras punciones se realizaron con un punzocat amarillo 24 G del catéter x 20 mm. de longitud de la aguja x 26 G (0.45 mm) de la aguja, tomando en cuenta que el diámetro aproximado del conducto pancreático es de 1.017 mm. De acuerdo a los diámetros antes mencionados, el diámetro de la aguja no representaría problema para puncionar el conducto pancreático, sin embargo, el uso del punzocat implicaba perforar el conducto impulsando el tubing hacia el conducto pancreático y

retirando la aguja para el posterior acoplamiento de la jeringa con la colagenasa, lo que conlleva a una manipulación excesiva generando en la mayoría de los casos la perforación del conducto pancreático limitándonos al uso del mismo, descartando el uso del punzocat. La siguiente opción fue utilizar una jeringa de insulina con un diámetro de 30G (0.30 mm), el uso de esta jeringa permitió la punción e infiltrado del páncreas a través del conducto con mayor facilidad y sin necesidad de una manipulación excesiva, esto debido a sus características entre ellas un menor diámetro y además, la ventaja de no tener que manipular para la colocación del embolo con la colagenasa, si no previamente la jeringa ya va cargada con la colagenasa a infiltrar. En base a esto y a la facilidad de manipulación de la jeringa y a su fácil obtención en el mercado decidimos trabajar con este material, como se muestra en la figura 4.



**Figura 4.** Procedimiento de infiltrado con tinta china dilución 1:9 en solución salina a través del conducto pancreático. A) Punción con Punzocat. B) Punción con jeringa de insulina.



**Proceso de Digestión.** El proceso de digestión nos permite liberar los islotes pancreáticos del tejido exocrino. El proceso de digestión se lleva a cabo con el uso de enzimas generalmente con colagenasa, enzima que romperá los enlaces peptídicos del colágeno y nos permitirá liberar los islotes. Sin embargo, para el uso de estas enzimas habrá que tomar en cuenta que la funcionalidad y viabilidad de los islotes obtenidos se verá directamente alterada o modificada por la colagenasa utilizada. Los factores que influyen en el proceso de digestión son el tiempo, la temperatura, la concentración volumen y vía de administración de la colagenasa, datos que desafortunadamente no han sido estandarizados y cambian de protocolo a protocolo (de Hann, 2004). La estandarización de la concentración de colagenasa fue basada en bibliografía reportada donde se menciona el uso de 1,4 mg/mL en una solución de sal equilibrada de Hank modificada (Carter, 2009), 0.7 mg/mL de colagenasa en una solución a 4°C (Morini, 2006).

**Concentración de colagenasa tipo IV.** La concentración ideal de colagenasa permite una digestión del tejido pancreático adecuada así como la cantidad a infiltrar. Revisamos diferentes protocolos y decidimos evaluar concentraciones similares a las presentadas en la literatura. Algunos de los reportes mencionan la preparación de la colagenasa con 0.5 mg/mL (Pang, 2015), 0.7 mg/mL (Chaib, 2000) y 1.4 mg/mL (Carter, 2009). Sin embargo, la colagenasa presenta características enzimáticas muy variables, debido a la falta de procedimientos estandarizados para la extracción y purificación de la colagenasa (Barnett, 2005). El primer punto a tomar en cuenta es trabajar con colagenasa del mismo lote de producción, disminuyendo de forma importante variables en el proceso de digestión. En base a la literatura, se decidió trabajar con tres concentraciones diferentes y determinar cuál nos proporcionaría la mejor digestión pancreática, sin dañar los islotes pancreáticos. Se evaluaron concentraciones de 0.5, 1.0 y 1.5 mg/mL para determinar de acuerdo a la colagenasa, cuál sería la ideal para la digestión pancreática. Aunado a la concentración de la colagenasa, se determinó el volumen de colagenasa a infiltrar a través del conducto pancreático ya que al igual que las características mencionadas anteriormente, es un valor no

estandarizado por la poca estabilidad que presenta la colagenasa. Sin embargo, nuestra determinación la realizamos con infiltraciones desde 2 mL hasta 4 mL de la solución de colagenasa (Carter, 2009; Stull, 2012). En base a lo anterior, se infiltraron diferentes cantidades de colagenasa 1 mL, 3-4 mL y 5 mL. De las diferentes concentraciones de colagenasa, se observó que con la colagenasa a 0.5 mg/mL existía una falta de digestión pancreática, con 1.0 mg/mL, el páncreas tenía una digestión del 90 % y con una concentración de 1.5 mg/mL, el páncreas se digería de manera excesiva causando daño de los islotes pancreáticos. Referente al volumen, se evaluó con las diferentes concentraciones sin embargo, con 1 mL no se logra infiltrar el páncreas por completo, debido al tamaño de la rata, con 4-5 mL se infiltra casi en su totalidad, mientras que 5 mL es un volumen excesivo que rompe el páncreas, siendo imposible extraerlo una vez infiltrada la colagenasa. De acuerdo a nuestros análisis, concluimos que las condiciones ideales son 1.0 mg/mL y de 3-4 mL de volumen de colagenasa a infiltrar.

**Tabla 1. Concentración de Colagenasa Tipo IV**

<b>0,5 mg/mL</b>	<b>1,0 mg/mL</b>	<b>1,5 mg/mL</b>
Falta de digestión pancreática	Digestión pancreática suficiente	Exceso de digestión pancreática

**Tabla 2. Cantidad de Colagenasa Tipo IV (mL) a infiltrar a través el conducto pancreático**

<b>1 mL</b>	<b>3-4 mL</b>	<b>5 mL</b>
Infiltración pancreática incompleta	Infiltración del 90% del páncreas	Filtración pancreática por exceso de volumen

**Tiempo de digestión a 37°C.** La actividad de la colagenasa se activa a 37°C. El tiempo ideal para la digestión completa del páncreas se debe establecer de acuerdo a la colagenasa que se esté trabajando, por lo cual fue necesario determinar el tiempo en el que se lograba separar los islotes pancreáticos del material exocrino, sin digerir los islotes. De igual forma los reportes proporcionan tiempos de digestión que con el material o reactivos que ellos tenían fueron suficientes para obtener una digestión suficiente en la extracción de islotes. Reportándose tiempos desde 8 a 11 minutos (Carter, 2009) sin embargo, para nosotros ese tiempo de digestión fue insuficiente, por lo cual debimos prolongar el tiempo logrando obtener la digestión en un tiempo aproximado de 17 a 19 minutos.

**Tabla 3. Tiempo de digestión en baño maría a 37°C**

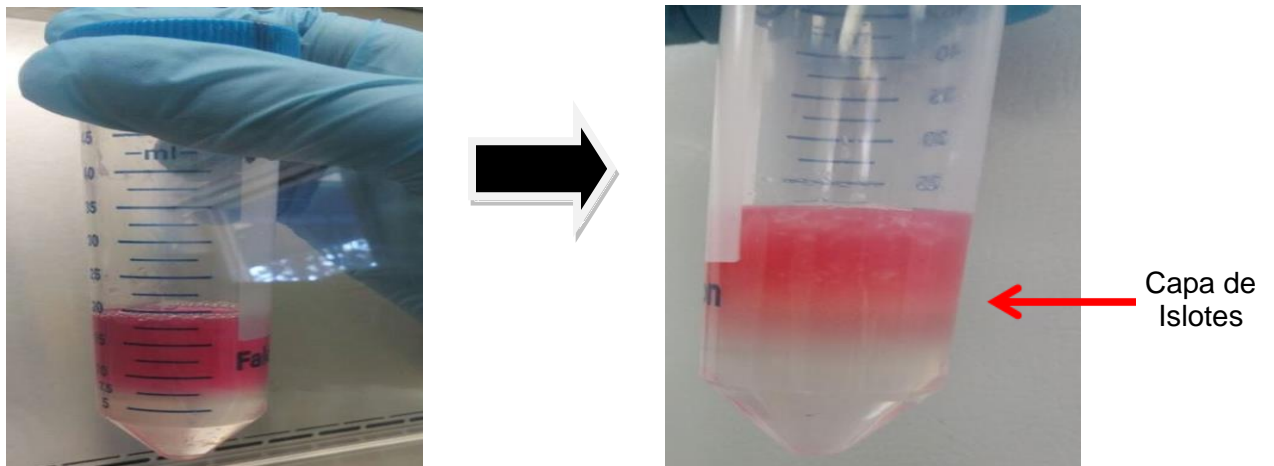
<b>5 min</b>	<b>10 min</b>	<b>15 min</b>	<b>17-19 min</b>
Páncreas integro	Falta de digestión del páncreas	Digestión del 80% del páncreas	Material completamente digerido

**Tiempo y velocidad de centrifugado.** Era necesario determinar la velocidad y el tiempo de centrifugado con el fin de obtener la mayor cantidad de islotes, teniendo especial cuidado en que estos factores no afecten la calidad de los islotes. Las referencias que teníamos era de 1000 a 1200 rpm, con tiempos de 2 a 4 minutos (Carter, 2009; Chaib, 2000). Por lo tanto, evaluamos diferentes tiempos a diferentes rpm, determinando que a 1200 rpm por 5 minutos obteníamos una buena concentración de células con una buena calidad en las células aisladas.

**Tabla 4. Tiempo de velocidad y centrifugado**

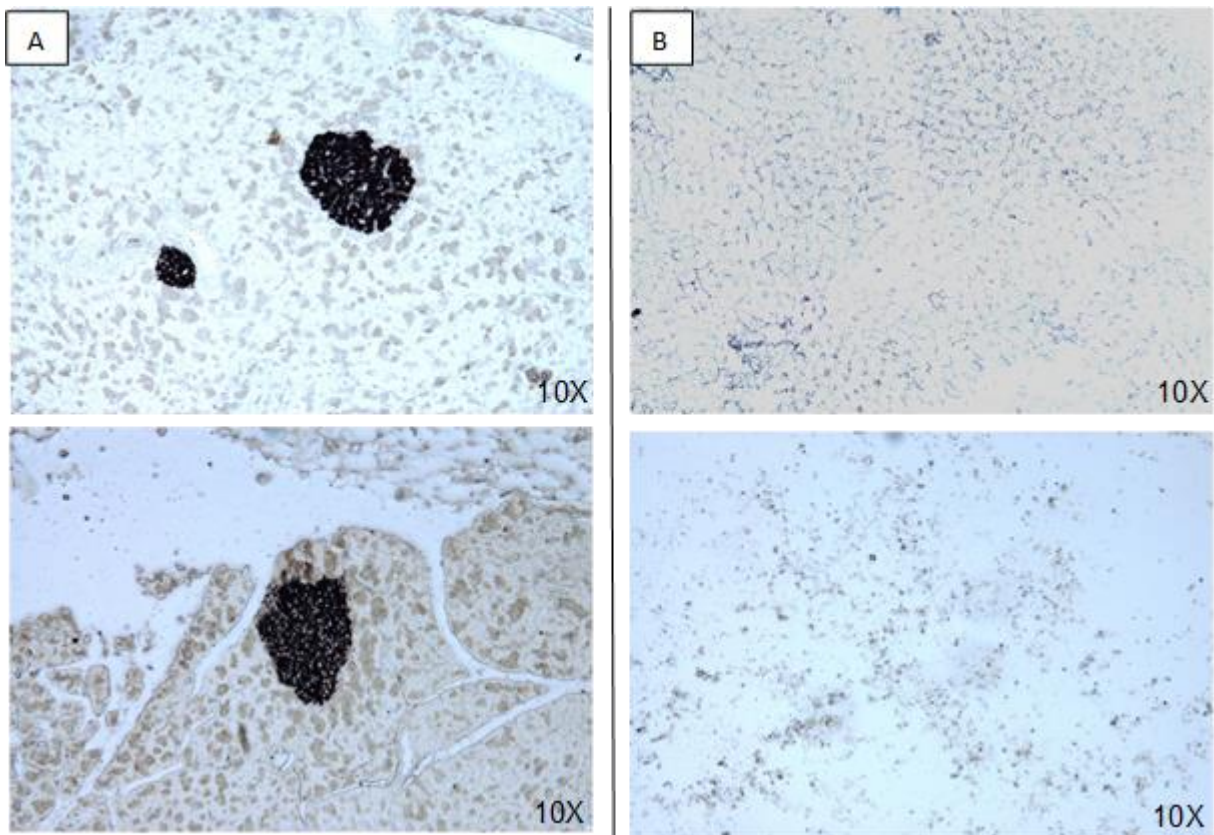
RPM	Tiempo (min)	Resultado
500	5	Formación de pellet poco visible
	10	
	15	
1200	5	Formación de pellet de buen tamaño
	10	
1500	5	Pellet con las mismas características, que el obtenido a 1200 rpm
	10	
	15	

**Tiempo y velocidad de centrifugado con el gradiente de ficoll.** Para realizar separaciones mediante gradientes de ficoll fue complicado la determinación de la velocidad y el tiempo de centrifugado, sin embargo, recurrimos a centrifugar a 1200 rpm durante veinte minutos de acuerdo a lo referenciado por Carter, 2009. Obteniendo en este tiempo la separación de los islotes.

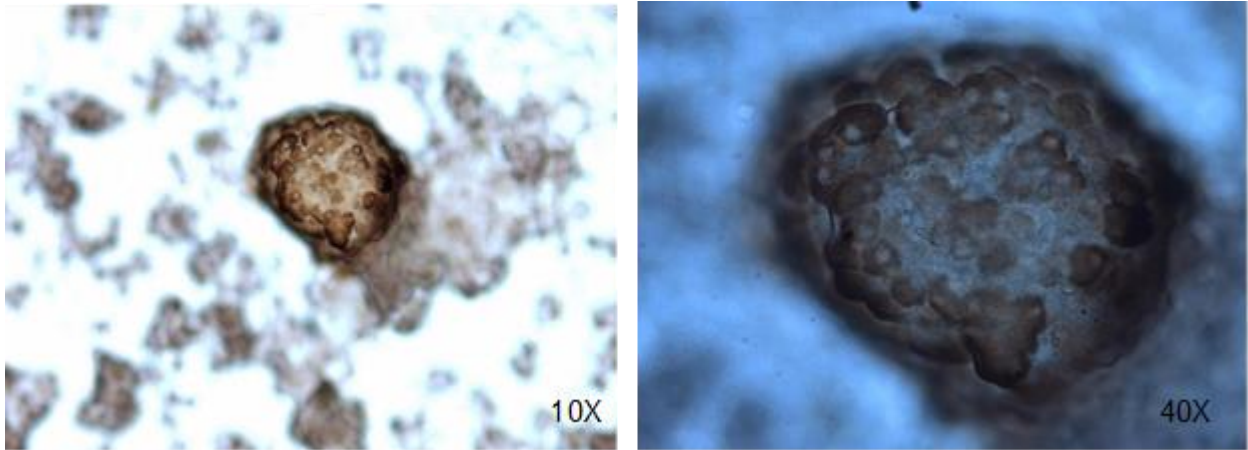


**Figura 5.** Aislado de islotes con el uso de la columna de ficoll

**Caracterización de los islotes mediante la inmunohistoquímica.** Los islotes obtenidos, se fijaron con paraformaldehído al 3.5%, se colocaron sobre laminillas gelatinizadas, realizando la inmunohistoquímica para confirmar la presencia de islotes, determinar el tamaño y evaluar su morfología. Como controles, se incluyeron estudios de tejido pancreático y hepático. Se confirmó la presencia de los islotes de Langerhans, al visualizar en el microscopio, conglomerados celulares de color marrón como se observa en la figura 6, se observan núcleos celulares de células presentes en los islotes, debido al reconocimiento de la insulina por el anticuerpo. Una vez caracterizadas mediante inmunohistoquímica se determinó el diámetro de las células para confirmar que el material obtenido corresponde a los islotes, el diámetro reportado para los islotes oscila entre 50 a 250  $\mu\text{m}$  (Carter, 2009), los islotes aislados por esta técnica tuvieron un diámetro promedio de  $195.46 \pm 48.01 \mu\text{m}$  (desviación estándar), mientras que en los controles, el diámetro fue  $152.63 \pm 40.25 \mu\text{m}$  (desviación estándar). Confirmando de esta manera que el material obtenido a partir de la técnica aquí reportada corresponde a islotes pancreáticos.



**Figura 6.** Inmunohistoquímica. A) Control positivo (páncreas). B) Control negativo (hígado).



**Figura 7.** Caracterización de islotes aislados.

**Tabla 5. Diámetro de los islotes pancreáticos**

<b>Islotes aislados</b>		<b>Control tejido pancreático</b>	
Diámetro ( $\mu\text{m}$ )	195.46	Diámetro ( $\mu\text{m}$ )	152.63
Desv Est	48.01	Desv Est	40.25

**Rendimiento de la técnica de aislamiento de islotes.** Parte de los objetivos al estandarizar una técnica fue proporcionar características que permitan ofrecer una técnica con un rendimiento similar o mayor. Debido a la gran cantidad de reportes sobre aislamiento de islotes pancreáticos, existen diversos reportes en cuanto al rendimiento o al número de islotes aislados. Se estima que el páncreas de una rata cuenta con alrededor de 3000 a 5000 islotes, después del proceso de aislamiento se aíslan entre 600 a 800 islotes (de Groot, 2004). Se analizó el rendimiento de la técnica antes propuesta y se obtuvo un rendimiento de aproximadamente 670 islotes/mL, valor capaz de garantizar una técnica con un rendimiento aceptable dentro de los parámetros antes establecidos.

## **9. Conclusión**

La estandarización de la técnica de extracción de islotes de Langerhans permitirá contar con una herramienta novedosa y con múltiples aplicaciones. En este momento, contamos con un procedimiento dominado, en el cual hemos podido disminuir los tiempos de procesamiento para elevar la supervivencia de los islotes así como aumentar el rendimiento en la obtención del número de islotes aislados. La técnica establecida permite la obtención de material celular con prácticamente todas las características morfológicas de un islote pancreático para poder ser utilizado en procedimientos de trasplante en modelos de lesión en el sistema nervioso como en modelos de diabetes.

## 10. Bibliografía

- Allen JS, Pang K, Skowera A, Ellis R, Rackham C, Lozanoska-Ochser B, Tree T, Leslie RD, Tremble JM, Dayan CM, et al. 2009. Plasmacytoid dendritic cells are proportionally expanded at diagnosis of type 1 diabetes and enhance islet autoantigen presentation to T-cells through immune complex capture. *Diabetes*. 58: 138–145.
- American Diabetes Association (ADA): *Diabetes Care* 27 (Suppl. 1), s5 (2004).
- Atlas, I. D. 2015. 7th edn. International Diabetes Federation.
- Azarpira N, Aghdai MH, Nikeghbalian S, Geramizadeh B, Darai M, Esfandiari E, et al. 2014. Human islet cell isolation: the initial step in an transplanting program in Shiraz, Southern Iran. *Exp Clin Transplant*. 12 (2):139-42.
- Barnett MJ, Zhai X, LeGatt DF, et al. Barnett MJ, Zhai X, LeGatt DF, et al: Quantitative assessment of collagenase blends for human islet isolation. *Transplantation* 80:723, 2005. Quantitative assessment of collagenase blends for human islet isolation. *Transplantation* 80:723.
- Bauer A, Postrach J, Thormann M, Blanck S, Faber C, Wintersperger B, et al. 2010. First experience with heterotopic thoracic pig-to-baboon cardiac xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 17(3):243-9.
- Bennet W, Groth CG, Larsson R, Nilsson B, Korsgren O. 2000. Isolated human islets trigger an instant blood mediated inflammatory reaction: implications for intraportal islet transplantation as a treatment for patients with type 1 diabetes. *Ups J Med Sci*. 105(2):125-33.
- Brendel M, Hering B, Schulz A, Bretzel R. 1999. International Islet Transplant Registry report. Giessen, Germany: University of Giessen. 1-20.
- Cardona K, Korbitt GS, Milas Z, Lyon J, Cano J, Jiang W, et al. 2006. Long-term survival of neonatal porcine islets in nonhuman primates by targeting costimulation pathways. *Nat Med*. 12(3):304-6.
- Carter, J. D., Dula, S. B., Corbin, K. L., Wu, R., & Nunemaker, C. S. (2009). A Practical Guide to Rodent Islet Isolation and Assessment. *Biological Procedures Online*, 11, 3–31.



- Chaib, E., Papalois, A., Brons, I. G., & Calne, R. Y. (2000). Transplante isogênico de ilhotas de Langerhans no fígado de ratos (metodologia para separação e purificação das ilhotas de Langerhans). *Arq. gastroenterol*, 37(1), 44-51.
- Collaborative Islet Transplant Registry Fifth Annual Report. Collaborative Islet Transplant Registry. Rockville, MD, 2008.
- Cozzi E, Vial C, Ostlie D, Farah B, Chavez G, Smith KG, et al. 2003. Maintenance triple immunosuppression with cyclosporin A, mycophenolate sodium and steroids allows prolonged survival of primate recipients of hDAF porcine renal xenografts. *Xenotransplantation*. 10(4):300-10.
- de Groot M, de Haan BJ, Keizer PP, Schuurs TA, van Schilfgaarde R, Leuvenink HG. 2004. Rat islet isolation yield and function are donor strain dependent. *Lab Anim*. 38(2):200–206.
- de Haan BJ, Faas MM, Spijker H, van Willigen JW, de Haan A, de Vos P. Factors influencing isolation of functional pancreatic rat islets. *Pancreas*. 2004;29(1):e15-22. PubMed PMID: 15211119.
- Dubernard JM, Traeger J, Neyra P, Touraine JL, Tranchant D, Blanc-Brunat N. 1978. A new method of preparation of segmental pancreatic grafts for transplantation: trials in dogs and in man. *Surgery*. 84(5):633-9.
- Ezzelarab M, Garcia B, Azimzadeh A, Sun H, Lin CC, Hara H, et al. 2009. The innate immune response and activation of coagulation in alpha1,3 galactosyltransferase gene-knockout xenograft recipients. *Transplantation*. 87(6):805-12.
- Falcone M, Yeung B, Tucker L, Rodriguez E, Sarvetnick N. 1999. A defect in interleukin 12-induced activation and interferon gamma secretion of peripheral natural killer T cells in nonobese diabetic mice suggests new pathogenic mechanisms for insulin-dependent diabetes mellitus. *J Exp Med*. 190 (7):963-72.
- Furlan R, Brambilla E, Ruffini F, Poliani PL, Bergami A, Marconi PC, et al. 2001. Intrathecal delivery of IFN-gamma protects C57BL/6 mice from chronic-progressive experimental autoimmune encephalomyelitis by increasing apoptosis of central nervous system-infiltrating lymphocytes. *J Immunol*. 167(3):1821–9.

- Gazda LS, Charlton B, Lafferty KJ. 1997. Diabetes results from a late change in the autoimmune response of NOD mice. *J Autoimmun.* 10: 261-70.
- Gliedman ML, Gold M, Whittaker J, et al. 1973. Clinical segmental pancreatic transplantation with ureterpancreatic duct anastomosis for exocrine drainage. *Surgery.* 74:171-180.
- Gómez-Díaz RA, Pérez-Pérez G, Hernández-Cuesta IT, Rodríguez-García Jdel C, Guerrero-López R, Aguilar-Salinas CA, et al. 2012. Incidence of type 1 diabetes in Mexico: data from an institutional register 2000-2010. *Diabetes Care.* 35(11):e77.
- Hara Y, Taniguchi H, Bouike T, Nagata Y, Narutaki K. 1993. Insulin content and immunostained insulin in the pancreatic islets allografted in intrathecal space. *Transplant Proc.* 25(5):2861-2862.
- Hiller WF, Klempnauer J, Luck R, Steiniger B. 1991. Progressive deterioration of endocrine function after intraportal but not kidney subcapsular rat islet transplantation. *Diabetes.* 40:134–140.
- Huber-Lang M, Sarma JV, Zetoune FS, Rittirsch D, Neff TA, McGuire SR, et al. 2006. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat Med.* 12(6):682-7.
- Jindal RM, Hjelmesaeth J. 2000. Impact and management of posttransplant diabetes mellitus. *Transplantation.* 70(11 Suppl):SS58-63.
- Jirak D, Kriz J, Strzelecki M, Yang J, Hasilo C, White DJ, et al. 2009. Monitoring the survival of islet transplants by MRI using a novel technique for their automated detection and quantification. *MAGMA.* 22(4):257-65.
- Juang JH, Bonner-Weir S, Vacanti JP, Weir GC. 1995. Outcome of subcutaneous islet transplantation improved by a apolymer device. *Transplant Proc.* 27(6):3215-3216.
- Juang JH, Hsu BR, Kuo CH. 2005. Islet transplantation at subcutaneous and intramuscular sites. *Transplant Proc.* 37(8):3479-81.
- Jung HS, Choi SH, Kim SJ, Lee KT, Lee JK, Jang KT, et al. 2007. A better yield of islet cell mass from living pancreatic donors compared with cadaveric donors. *Clin Transplant.* 21(6):738-43.

- Kaddis JS, Danobeitia JS, Niland JC, Stiller T, Fernandez LA. 2010. Multicenter analysis of novel and established variables associated with successful human islet isolation outcomes. *Am J Transplant*. 10(3):646-56.
- Kelly WD, Lillehei RC, Merkel FK, Idezuki Y, Goetz FC. 1967. Alotrasplante del páncreas y el duodeno junto con el riñón en la nefropatía diabética. *Cirugía*. 61: 827-837.
- Kemp CB, Knight MJ, Scharp DW, Ballinger WF, Lacy PE. 1973. Efecto del sitio de trasplante en los resultados de isoinjertos de los islotes pancreáticos en ratas diabéticas. *Diabetologia*. 9: 486-491.
- Kim HI, Yu JE, Park CG, Kim SJ. 2010. Comparison of four pancreatic islet implantation sites. *J Korean Med Sci*. 25(2):203-10.
- Kim S, Kim KA, Suk K, Kim YH, Oh SH, Lee MK, Kim KW, Lee MS. 2012. Apoptosis of human islet cells by cytokines. *Immune Netw*. 12(3):113-7.
- Knip M, Veijola R, Virtanen SM, Hyöty H, Vaarala O, Akerblom HK. 2005. Environmental triggers and determinants of type 1 diabetes. *Diabetes*. 54(Suppl 2): S125–S136.
- Kobayashi T, Taniguchi S, Neethling FA, Rose AG, Hancock WW, Ye Y, et al. 1997. Delayed xenograft rejection of pig-to-baboon cardiac transplants after cobra venom factor therapy. *Transplantation*. 64(9):1255-61.
- Kuwaki K, Tseng YL, Dor FJ, Shimizu A, Houser SL, Sanderson TM, et al. 2005. Heart transplantation in baboons using alpha1, 3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience. *Nat Med*. 11(1):29-31.
- Lacy PE, Kostianovsky M. 1967. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes*. 16:35–39.
- Lam TT, Hausen B, Hook L, Lau M, Higgins J, Christians U, et al. 2005. The effect of soluble complement receptor type 1 on acute humoral xenograft rejection in hDAF-transgenic pig-to-primate life-supporting kidney xenografts. *Xenotransplantation*. 12(1):20-9.
- Lee L, Xu B, Michie S, Beilhack G, Warganich T, Turley S, et al. 2005. The role of TNF $\alpha$  in the pathogenesis of type 1 diabetes in the nonobese diabetic mouse: analysis of dendritic cell maturation. *Proc Natl Acad Sci*. 102(44):15995-16000.

- Li B, Cairns JA, Robb ML, Johnson RJ, Watson CJ, Forsythe JL, Oniscu GC, et al. 2016. Predicting patient survival after deceased donor kidney transplantation using flexible parametric modelling. *BMC Nephrol.* 25; 17(1):51.
- Lin SS, Hanaway MJ, Gonzalez-Stawinski GV, Lau CL, Parker W, Davis RD, et al. 2000. The role of anti-Gal $\alpha$ 1-3Gal antibodies in acute vascular rejection and accommodation of xenografts. *Transplantation.* 70(12):1667-74.
- Longnecker, D. S. 2014. *Anatomy and Histology of the Pancreas.* Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base.
- Malik FS, Taplin CE. 2014. Insulin therapy in children and adolescents with type 1 diabetes. *Paediatr Drugs.* 16(2):141-50.
- Mandrup T, Corbett JA, McDaniel ML, Nerup J. 1993. What are the types and cellular sources of free radicals in the pathogenesis of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus? *Diabetologia* 36: 470-3.
- Ménoret S, Plat M, Blancho G, Martinat-Botté F, Bernard P, Karam G, et al. 2004. Characterization of human CD55 and CD59 transgenic pigs and kidney xenotransplantation in the pig-to-baboon combination. *Transplantation.* 77(9):1468-71.
- Morini, S., Braun, M., Onori, P., Cicalese, L., Elias, G., Gaudio, E., & Rastellini, C. 2006. Morphological changes of isolated rat pancreatic islets: a structural, ultrastructural and morphometric study. *Journal of Anatomy,* 209(3), 381–392.
- Moskalewski s. 1965. Isolation and culture of the islets of langerhans of the guinea pig. *Gen comp endocrinol.* 5:342-53.
- Nano R, Clissi B, Melzi R, Calori G, Maffi P, Antonioli B, et al. 2005. Islet isolation for allotransplantation: variables associated with successful islet yield and graft function. *Diabetologia.* 48 (5):906-12.
- Niclauss N, Bosco D, Morel P, Demuylder-Mischler S, Brault C, Milliat-Guittard L, et al. 2011. Influence of donor age on islet isolation and transplantation outcome. *Transplantation.* 15; 91(3):360-6.
- Noble, J. A., & Erlich, H. A. 2012. Genetics of type 1 diabetes. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine,* 2(1), a007732.

- Nordfeldt S, Ludvigsson J. 2005. Fear and other disturbances of severe hypoglycaemia in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 18: 83–91.
- O'Dowd JF. 2009. The isolation and purification of rodent pancreatic islets of Langerhans. *Methods Mol Biol.* 560:37-42.
- Ohdan H, Yang YG, Shimizu A, Swenson KG, Sykes M. 1999. Mixed chimerism induced without lethal conditioning prevents T cell- and anti-Gal alpha 1,3Gal-mediated graft rejection. *J Clin Invest.* 104(3):281-90.
- Piemonti L, Everly MJ, Maffi P, Scavini M, Poli F, Nano R, et al. 2013. Alloantibody and autoantibody monitoring predicts islet transplantation outcome in human type 1 diabetes. *Diabetes.* 62(5):1656-64.
- Pietropaolo M, Yu S, Libman IM, Pietropaolo SL, Riley K, LaPorte RE, Drash AL, Mazumdar S, Trucco M, Becker DJ 2005. Cytoplasmic islet cell antibodies remain valuable in defining risk of progression to type 1 diabetes in subjects with other islet autoantibodies. *Pediatr Diabetes* 6: 184–192.
- Rahier J, Guiot Y, Goebbels RM, Sempoux C, Henquin JC. 2008. Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 4:32-42.
- Ricordi C, Lacy PE, Finke EH, Olack BJ, & Scharp DW. 1988. Automated method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes*, 37(4), 413-420.
- Ridgway, D., Manas, D., Shaw, J. and White, S. 2010. Preservation of the donor pancreas for whole pancreas and islet transplantation. *Clinical Transplantation.* 24: 1–19.
- Sakuma Y, Ricordi C, Miki A, Yamamoto T, Pileggi A, Khan A, et al. 2008. Factors that affecting human islet isolation. *Transplantation proceedings.* 40(2):343-345.
- Savard V, Gingras V, Leroux C, Bertrand A, Desjardins K, Mircescu H, et al. 2016. Treatment of Hypoglycemia in Adult Patients with Type 1 Diabetes: An Observational Study. *Can J Diabetes* 40(4):318-23.
- Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, et al. 2000. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med.* 343(4):230-8.

- Singh AK, Seavey CN, Horvath KA, Mohiuddin MM. 2012. Ex-vivo expanded baboon CD4+ CD25 Hi Treg cells suppress baboon anti-pig T and B cell immune response. *Xenotransplantation*. 19(2):102-11.
- steck AK, Johnson K, Barriga KJ, Miao D, Yu L, Hutton JC, Eisenbarth GS, Rewers MJ. 2011. Age of islet autoantibody appearance and mean levels of insulin, but not GAD or IA-2 autoantibodies, predict age of diagnosis of type 1 diabetes: Diabetes autoimmunity study in the young. *Diabetes Care* 34: 1397–1399.
- Stull, N. D., Breite, A., McCarthy, R., Tersey, S. A., & Mirmira, R. G. 2012. Mouse Islet of Langerhans Isolation using a Combination of Purified Collagenase and Neutral Protease. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (67), 4137.
- Tanemura M, Ogawa H, Yin DP, Chen ZC, DiSesa VJ, Galili U. 2002. Elimination of anti-Gal B cells by alpha-Gal ricin1. *Transplantation*. 73(12):1859-68.
- Tchervenivanov N, Yuan S, Lipsett M, Agapitos D, Rosenberg L. 2002. Morphological and functional studies on submucosal islet transplants in normal and diabetic hamsters. *Cell Transplant*. 11:529–537.
- Wachlin G, Augstein P, Schroder D, Kuttler B, Kloting I, Heinke P, et al. 2003. IL-1beta, IFN-gamma and TNF-alpha increase vulnerability of pancreatic beta cells to autoimmune destruction. *J Autoimmun*. 20:303-12.
- Wu J, Yi S, Ouyang L, Jimenez E, Simond D, Wang W, et al. 2008. In vitro expanded human CD4+CD25+ regulatory T cells are potent suppressors of T-cell-mediated xenogeneic responses. *Transplantation*. 85(12):1841-8.
- Yoon JW, Jun HS. 2005. Autoimmune destruction of pancreatic beta cells. *Am J Ther*. 2(6):580-91.
- Zamani F, Almasi S, Kazemi T, Jahanban Esfahlan R, Aliparasti MR. 2015. New Approaches to the Immunotherapy of Type 1 Diabetes Mellitus Using Interleukin-27. *Adv Pharm Bull. (Suppl 1)*:599-603.