

2006

396632789

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS



**“EFECTO DE LA MELATONINA EXÓGENA SOBRE LAS CITOCINAS
IL-1 β Y TNF- α EN EL RECHAZO AGUDO DEL ALOTRANSPLANTE
DE ISLOTES PANCREÁTICOS VÍA INTRAPORTAL”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE
TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

PRESENTA

LUCÍA FLORES CONTRERAS

LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JAL. ENERO DE 2007

**“EFECTO DE LA MELATONINA EXÓGENA SOBRE LAS
CITOCINAS IL-1 β Y TNF- α EN EL RECHAZO AGUDO DEL
ALOTRANSPLANTE DE ISLOTES PANCREÁTICOS VÍA
INTRAPORTAL”**

TESISTA

LUCÍA FLORES CONTRERAS

DIRECTOR

Dr. en C. SERGIO RODRÍGUEZ REYNOSO

ASESOR

Dr. en C. JUAN RAMÓN GONZÁLEZ GARCÍA

SEDE

LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN QUIRÚRGICA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE OCCIDENTE-IMSS

Y

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN CARDIOVASCULAR
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS DE LA SALUD
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

Coordinación de Carrera de Licenciado en Biología
Comité de Titulación

C. Lucía Flores Contreras
Estudiante de la carrera de Biología
Presente

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de TESIS E INFORMES opción tesis con el título: "Efecto de la melatonina exógena sobre las citocinas IL-1b y TNF-a en el alotrasplante de islotes pancreáticos vía intraportal" para obtener la licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado el Dr. Sergio Rodríguez Reynoso como director de la tesis, y el Dr. Juan Ramón González García como asesor.

Sin otro particular, quedamos de usted con un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas Zapopan, Jal, 9 de Junio del 2005


DR. CARLOS ÁLVAREZ MOYA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN


DRA. ANA ISABEL RAMÍREZ QUINTANA
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN



RECIBIDO

BIBLIOTECA CUCBA

Dr. Carlos Álvarez Moya
Presidente del comité de titulación
Carrera de Licenciado en Biología
CUCBA

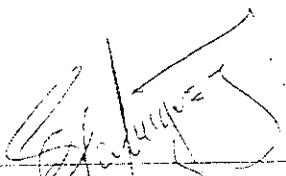
PRESENTE

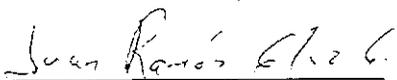
Por medio de la presente nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad tesis, opción I con el título "Efecto de la Melatonina Exógena sobre las citocinas IL-1 β y TNF- α en el alotrasplante de islotes pancreáticos vía intraportal en ratas". Que realizo la pasante Lucía Flores Contreras con número de código 396632789 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión.

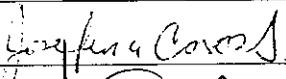
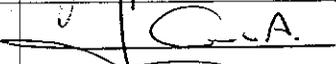
Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente
Guadajajara, Jalisco, 15 de Diciembre del 2006

Vo. Bo.


D en C Sergio Rodríguez Reynoso
Director de Tesis


D en C Juan Ramón González García
Asesor de la Tesis

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de Aprobado	Fecha de Aprobación
M en C. Josefina Casas Solís		19/Dic/06
Dr en C. Carlos Álvarez Moya		19/Dic/06
Dr en C. Ramón Reynoso Orozco		19/dic/06
Supl. Jorge Peregrina Sandoval		19/Dic/06

Val B

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	5
ANTECEDENTES CIENTÍFICOS.....	6
• Diabetes Mellitus (DM).....	6
• Principales tipos de DM.....	7
• Epidemiología.....	8
• Tratamiento de la DM.....	9
• Trasplante	
Trasplante de páncreas.....	10
Trasplante de islotes pancreáticos	11
Aislamiento de islotes.....	12
Islotes pancreáticos.....	
Sitios de aplicación de los islotes.....	13
Hígado.....	
• Respuesta Inmune alogénica al trasplante.....	15
• Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH).....	16
• Células Presentadoras de Antígenos (CPA).....	16
• Linfocitos T.....	17
• Linfocitos B.....	19
• Citocinas.....	20
• IL-1 β	22
• TNF- α	22
• Óxido nítrico (ON).....	23
• Células endoteliales.....	24
• Tipos de Rechazo.....	26
Rechazo Hiperagudo.....	26
Rechazo Agudo.....	27
Rechazo Crónico.....	28
Inducción de tolerancia inmunológica.....	29

Melatonina.....	31
Justificación.....	34
Planteamiento del problema.....	35
Objetivos.....	36
Hipótesis.....	37
Materiales y Métodos.....	38
• Grupos.....	38
• Variables.....	40
• Criterios.....	40
• Protocolo experimental.....	41
• Descripción y medición de las variables (ELISA).....	48
• Tratamiento.....	49
Análisis Estadístico.....	50
Resultados.....	51
Discusión.....	61
Conclusión.....	68
Bibliografía.....	69

INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas más graves en el área del trasplante de órganos, es la respuesta inmunológica causante del daño funcional y estructural en el tejido trasplantado, la cual, si no es controlada resulta en el rechazo y pérdida total del injerto.

Algunos de los cambios que ocurren en el huésped y en el injerto, son simples consecuencias del trauma asociado con la cirugía y otros involucran el reconocimiento de las diferencias antigénicas entre el donador y el receptor.

Durante los últimos años se han investigado los fenómenos involucrados en la pérdida del injerto y se han establecido diferentes mecanismos para explicar la lesión tisular que ocurre después del trasplante de islotes. La activación de las células presentadoras de antígenos (CPA) tales como los macrófagos y las células dendríticas, la síntesis de interleucina- 1β (IL- 1β) y del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), así como, la formación de radicales libres como el óxido nítrico (ON), son considerados los eventos más importantes implicados en la lesión durante la pérdida del injerto. En términos generales, el rechazo agudo del trasplante de islotes se debe principalmente a la activación de las células de Kupffer, adhesión de leucocitos y plaquetas a la pared sinusoidal, activación del complemento y la producción de citocinas y radicales libres.

La melatonina es conocida como uno de los agentes antioxidantes más potentes por su capacidad depuradora de radicales libres derivados de oxígeno como el ON.

La melatonina también ha sido estudiada como agente regulador de la respuesta inmune inflamatoria en diferentes enfermedades y ha demostrado tener un efecto benéfico sobre la regulación de varias citocinas proinflamatorias como la IL- 1β y el TNF- α .

La realización de este trabajo tiene como finalidad estudiar el efecto de la melatonina sobre estas citocinas y sobre el ON en un modelo de alotrasplante de islotes vía intraportal, de manera que al establecer el efecto, la melatonina pueda ser considerada como un agente inmunomodulador de la respuesta de rechazo agudo en contra del injerto.

ANTECEDENTES

DIABETES MELLITUS

La diabetes mellitus (DM) es un síndrome, o un grupo de enfermedades crónico-degenerativas en el cual se altera el metabolismo de los carbohidratos, las grasas y las proteínas, bien por falta de secreción de insulina o por disminución de la sensibilidad tisular a esta hormona. La DM se caracteriza por manifestar hiperglucemia e intolerancia a la glucosa. Las complicaciones secundarias de la DM se deben principalmente a los niveles elevados de azúcar en sangre durante muchos años, lo cual se encuentra sumamente asociado con disfunción y falla de varios órganos. Entre los tejidos más afectados, debido a que se encuentran en libre contacto con la glucosa son la retina, los riñones, los nervios, el corazón y los vasos sanguíneos.

Las causas de la DM son múltiples y de carácter heterogéneo, con grados variables de predisposición hereditaria y con la participación de diversos factores ambientales. Por lo que el incremento en la susceptibilidad del individuo a desarrollar DM depende tanto de factores ambientales como genéticos. Así, más que una entidad única la DM es un grupo de procesos degenerativos.

Se distinguen dos tipos principales de DM

- **Diabetes mellitus tipo 2**

Es la forma más común de esta enfermedad ya que representa aproximadamente entre el 85%-90% de ésta. Se origina por la resistencia a la acción de la insulina en sus células diana (hiperinsulinemia), así como, por la deficiencia en la secreción de insulina debido a la inadecuada respuesta compensatoria de las células β por mantener un estado de normoglucemia causada por un defecto no inmunitario. Afecta primariamente el aparato vascular y suele ser asintomática durante la etapa prediabética.⁷

La resistencia a la insulina tiene gran importancia en la patogenia de la DM tipo 2, pero el elemento indispensable para que surja el estado diabético es la

ineficiencia relativa o absoluta de las células β para compensar la resistencia a la insulina.

- **Diabetes Mellitus tipo 1**

Representa aproximadamente entre el 10% y 15% de los casos de diabetes y es la más frecuente entre los niños y adolescentes. Aunque cerca del 15 y 30% de los adultos de más de 30 años también presentan este tipo de diabetes.

La DM tipo 1 es consecuencia de la destrucción selectiva de las células β productoras de insulina debido a un proceso autoinmune, al parecer mediado por linfocitos T que reaccionan específicamente contra algunas proteínas de la célula β en los islotes pancreáticos. De acuerdo con varios reportes, esta respuesta autoinmune puede tener origen químico o viral.¹ Sin embargo, una vez establecida es claro que la respuesta inmunitaria constituye la causa de la destrucción de las células beta.

Este tipo de diabetes se caracteriza por deficiencia de la secreción insulínica absoluta y por la necesidad de administrar insulina para conservar la vida del paciente. Los síntomas causados por la hiperglucemia, son repentinos e intensos e incluyen poliuria, polidipsia, pérdida de peso, visión borrosa y tendencia a la cetosis.²

En resumen ambos tipos de diabetes son consecuencia de la interacción de factores genéticos y ambientales.

Epidemiología de la DM

La DM es muy común, con numerosos efectos de salud a nivel global. Se calcula que alrededor del 5-7% de la población mundial presenta este tipo de síndrome. En la actualidad, existen 171 millones de diabéticos en el mundo y se estima que esta cifra se incrementará a 370 millones para el año 2030, de los cuales 85% pertenecen a DM tipo 2 y 15% a DM tipo 1.³

La prevalencia e incidencia de la DM va en aumento en muchas poblaciones, particularmente en los países en desarrollo, lo cual, puede deberse a una mayor exposición a factores de riesgo relacionados con el estilo de vida.⁴

En México es un problema de salud pública con importantes consecuencias médicas, sociales y económicas y cuya morbilidad y mortalidad ha ido en aumento a partir de 1980.⁵ Actualmente, en nuestro país la DM ocupa uno de los primeros lugares como causa de muerte, tanto en hombres como en mujeres.⁶

Los costos derivados para la atención de los pacientes diabéticos en el ámbito hospitalario junto con la pérdida de productividad de la población afectada, coloca a la DM dentro de las enfermedades de mayor costo social y carga financiera para las instituciones de salud ⁷.

Páncreas

El páncreas es una glándula sólida localizada transversalmente sobre la pared posterior del abdomen y su peso en un individuo adulto es de 85 g. Esta glándula está constituida por tejido exocrino y tejido endocrino. El componente exocrino está formado por los acinos pancreáticos que secretan enzimas dentro del intestino, las cuales participan en el proceso de digestión. El tejido endocrino está formado por los islotes de Langerhans (figura 1)REF.

Islotes Pancreáticos

Los islotes de Langerhans o islotes pancreáticos son agregados de células diferenciadas. Están constituidos por las células α , β , δ y γ , las cuales vierten sus secreciones directamente en la sangre (figura 1). Las células α secretan glucagón, las δ somatostatina y las γ polipéptido pancreático. Las células β son las principales productoras de insulina. La insulina es una hormona cuya función principal es permitir el paso de la glucosa al interior de las células como fuente principal de energía.

Normalmente después de consumir una dieta rica en carbohidratos, las células β finamente sensibles a la glucosa se activan y secretan insulina. Cuando las células β no funcionan adecuadamente, la producción de insulina es muy pobre o incluso nula. Esto dificulta el paso de glucosa al interior de las células, ocasionando un incremento en la concentración de glucosa en sangre. La consecuencia es la acumulación de glucosa y de sus productos metabólicos que contribuyen a la generación de varias complicaciones metabólicas que participan en el desarrollo de la DM REF.

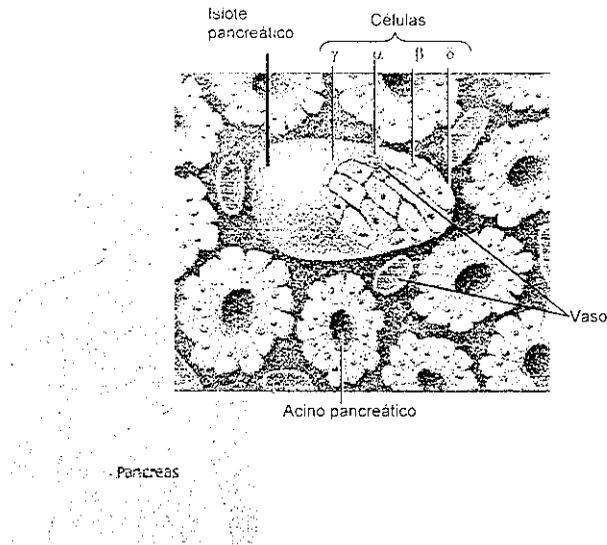


Figura 1: Estructura de un islote pancreático. Se muestran los cuatro tipos celulares que conforman un islote. También se muestra la localización anatómica del páncreas y los acinos pancreáticos.

Tratamiento de la DM

Para lograr un control óptimo de la diabetes es necesario normalizar los niveles de glucosa en sangre, lo cual reduciría en gran medida los riesgos a largo plazo de las complicaciones secundarias.

Normalmente, el tratamiento se basa en la administración de insulina exógena. Por tanto, la terapia para los pacientes con DM tipo 1, comúnmente involucra un régimen invasivo y riguroso de pruebas para medir los niveles de glucosa en sangre a lo largo del día junto con inyecciones subcutáneas de insulina. Las bombas de insulina que se introducen en el organismo y liberan la hormona a un ritmo predeterminado permiten realizar un control más exhaustivo de los niveles de glucosa en la sangre; sin embargo, hay complicaciones asociadas a este tratamiento, como son la cetoacidosis y las infecciones en relación con la bomba de infusión.⁸ Por otro lado, la mayoría de los pacientes con DM tipo 2 presentan sobrepeso; la base del tratamiento es la dieta y el ejercicio, lo cual contribuye a la pérdida de peso y por tanto, disminuye la resistencia de los tejidos a la acción de la insulina; posteriormente se añaden al tratamiento hipoglucemiantes orales e insulina.⁹

El estudio sobre el control de la DM tipo 1 y sus complicaciones demostró que la terapia intensiva con insulina reduce significativamente el riesgo de las complicaciones microvasculares de la diabetes. Sin embargo, no resulta en la normalización de los valores de hemoglobina glucosilada, por lo que aún, es necesario seguir en la búsqueda de nuevos métodos para lograr un excelente control de la glucosa.¹⁰

Por todo esto, la sustitución o reposición de células productoras de insulina a través del trasplante de páncreas completo o de islotes pancreáticos es la mejor alternativa para curar la DM tipo 1.

TRASPLANTE

El trasplante se define como el proceso por el cual se toman células, tejidos u órganos, denominados injertos, de un individuo y se colocan en otro. El individuo que proporciona el injerto se denomina donador y el que lo recibe, receptor o huésped. Según el sitio de implantación del injerto, los trasplantes se clasifican en ortotópicos, cuando se colocan en su sitio original y heterotrópicos cuando se colocan en un sitio diferente. De acuerdo con la relación existente entre los individuos, los trasplantes se dividen en autotrasplante, cuando un injerto es trasplantado de una a otra parte del cuerpo de un mismo individuo. En isotrasplante cuando un injerto es trasplantado entre dos individuos genéticamente idénticos. En alotrasplante cuando un injerto se trasplanta entre dos individuos de la misma especie pero genéticamente distintos y en xenotrasplante cuando un injerto es trasplantado entre individuos de distinta especie.

En la práctica clínica el trasplante de tejidos para reemplazar órganos enfermos se lleva a cabo con la finalidad de tratar diferentes enfermedades, por lo que en las últimas décadas el alotrasplante se ha convertido en el tratamiento de elección de múltiples procesos patológicos. Actualmente el número y tipo de órganos que pueden ser trasplantados va en aumento, debido al éxito logrado por este procedimiento.

Asimismo, el objetivo principal del alotrasplante de páncreas o de islotes pancreáticos es curar la DM tipo 1, con lo que se logra un control glucémico excelente.

Trasplante de Páncreas

El primer trasplante de páncreas se realizó en la Universidad de Minnesota en 1966. A partir de 1970 se realizaron varios trasplantes de páncreas y a finales de 1980 es aceptado como alternativa para manejar la DM.¹¹

En la actualidad, es una de las alternativas más aceptadas para controlar la DM tipo 1, debido a que cerca del 86% de los pacientes logra alcanzar el estado normoglucémico independiente de insulina y cerca del 50% de los receptores se mantienen euglucémicos durante 5 años.¹² Sin embargo, el trasplante de páncreas completo es un procedimiento muy invasivo, con alto índice de morbilidad y mortalidad significativas en términos de riesgos quirúrgicos.

El trasplante de páncreas como órgano completo vascularizado, se acepta como una alternativa terapéutica en combinación con el trasplante de riñón, en pacientes con diabetes y nefropatía terminal. Por otra parte, el trasplante de páncreas solitario, se lleva a cabo ocasionalmente para tratar la diabetes mellitus tipo 1 lábil en pacientes no urémicos.¹³

Trasplante de islotes pancreáticos

Actualmente, el trasplante de islotes pancreáticos es de las estrategias más prometedoras para curar a los pacientes con DM tipo 1,¹⁴ debido a que proporciona un excelente control glucémico si se realiza en etapas tempranas de la enfermedad, reduciendo en gran medida las complicaciones secundarias sin necesidad de administrar insulina exógena.¹⁵ En comparación con el trasplante de páncreas completo, el trasplante de islotes es un procedimiento mucho más seguro y más simple.¹³

El trasplante de islotes representa la alternativa más lógica para el tratamiento de los pacientes con DM tipo 1. Hasta ahora, varios casos reportados en seres humanos que recibieron un alotrasplante de células insulares mostraron buenos resultados.¹⁵ La probabilidad de lograr la independencia a la insulina en humanos ha sido de 68%, 58% y 49% a dos años¹⁷ y, aunque la evaluación a largo plazo ha sido difícil, en 1997 se reportaron dos casos con independencia a la insulina después de 6 años del alotrasplante de islotes.¹⁸

Gran parte del éxito obtenido por el trasplante de islotes en las últimas décadas ha sido posible gracias a las técnicas de aislamiento de islotes, las cuales han permitido el aislamiento de gran número de islotes funcionales.^{19, 20}

Se cree que el páncreas humano normal cuenta con aproximadamente 1,000,000 de islotes; y se requiere como mínimo de 63% a 70% de esta masa para revertir la diabetes; es decir, el número mínimo de islotes que se recomienda trasplantar es de 9,000 a 10,000 islotes por Kg de peso corporal o 630,000 islotes para una persona de 70 Kg.²¹

La obtención de un número de islotes suficiente para lograr la independencia a la insulina y revertir la DM tipo 1 depende de varios factores relacionados con el método

de aislamiento seleccionado para obtener la más alta producción de islotes, así como de la especie de estudio seleccionada.

Aislamiento de islotes

El proceso de aislamiento implica una serie de pasos que involucran desde la procuración del páncreas hasta la digestión mecánica y enzimática de éste, lo cual, debe resultar en la obtención del número suficiente de islotes viables y funcionalmente intactos.

La digestión con colagenasa fue introducida por primera vez en 1965, para alterar enzimáticamente el páncreas del cobayo y permitir la liberación de fracciones celulares.²² Posteriormente se perfeccionó el procedimiento mediante el uso de distensión intraductual, filtrando solución de Hanks a través de los conductos pancreáticos. Este método permite la distensión y la desorganización del componente exócrino del páncreas (islotes) y consecuentemente estimula la digestión de este órgano mediante el uso de colagenasa, permitiendo así, la separación de los islotes del tejido exócrino (acinos pancreáticos) y ductual.²³

Las técnicas de purificación implican la separación por centrifugación y el lavado de los islotes varias veces para eliminar los residuos peligrosos, relacionados con el proceso de aislamiento.

El desarrollo de métodos automatizados utilizados para la obtención de islotes pancreáticos y los adelantos en las técnicas de separación y purificación han permitido obtener mayor número de islotes viables con competencia funcional. Sin embargo, aún así, el número de islotes que se logra obtener es muy pobre, por lo que se requieren mínimo dos donadores de páncreas para lograr obtener una cantidad significativa de islotes, capaz de revertir la DM tipo 1.

Sitios de aplicación de los islotes pancreáticos

El sitio de aplicación de los islotes pancreáticos a trasplantar es factor crucial. Debe ser un lugar fácilmente accesible, seguro, con buen flujo vascular y adecuado drenaje portal. Los sitios de aplicación de los islotes pancreáticos son diversos y abarcan desde la circulación portal, en la cápsula renal, en el timo, en el pulmón, en el espacio peri-aórtico del retroperitoneo y libre en la cavidad peritoneal. Sin embargo, hasta la fecha el hígado es el sitio más eficiente para el trasplante de islotes en pacientes con DM tipo 1.²⁴

Hígado

El hígado es el órgano más grande del cuerpo, pesa 1,500 g aproximadamente y está dividido en dos lóbulos y a su vez, cada lóbulo en cientos de lobulillos. Ocupa una posición fisiológica muy importante, pues cuenta con una irrigación sanguínea doble, ya que recibe sangre arterial y venosa. El 75% de la sangre que llega al hígado proviene del tubo digestivo a través de la vena portal y es rica en nutrientes. El 25% restante procede de la circulación cardiaca a través de la arteria hepática y es rica en oxígeno. El lobulillo hepático es una unidad anatómica y funcional del hígado definido por las triadas (la vena porta, la arteria hepática y el conducto biliar) y por millones de células hepáticas (hepatocitos) distribuidas en forma de cordones radiados alrededor de la vena central (figura 2).REF

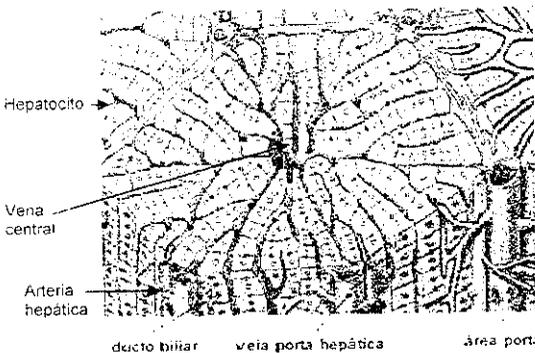


Figura 2: Lobulillo hepático. Está formado por cordones de hepatocitos y por las triadas (vena porta, arteria hepática y ducto biliar)

Los sinusoides hepáticos son capilares diminutos, recubiertos por células del endotelio vascular y por los hepatocitos. A nivel sinusoidal se fusionan la sangre arterial y venosa (figura 3). En el hígado se encuentran diversos tipos celulares como los hepatocitos, las células endoteliales del sinusoides y los macrófagos tisulares o células de Kuffer.REF

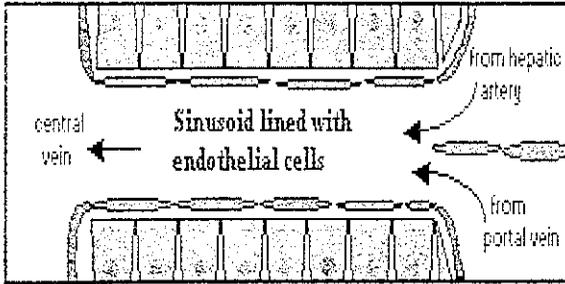


Figura 3: Sinusoides hepático. Son los capilares más pequeños y están formados por las células epiteliales y los hepatocitos que los rodean.

El trasplante de islotes aplicados en la circulación intraportal ha demostrado tener mejor funcionalidad y viabilidad en comparación con otros sitios de aplicación. Debido a que la vena porta cuenta con un importante soporte de oxígeno y nutricional, asimismo en estudios recientes, se ha demostrado que esta vía presenta tolerancia inmunológica reflejada por la disminución continua y progresiva del índice de proliferación de linfocitos T.²⁵

El sondeo transhepático es en sí mismo sencillo, hasta cierto punto económico y carente de morbilidad importante, por lo que hasta hoy, el trasplante de islotes vía intraportal es la mejor alternativa para curar la DM tipo 1 (figura 4).

RESPUESTA INMUNE ALOGÉNICA AL TRASPLANTE

El trasplante de órganos induce una variedad de cambios en el huésped y en el injerto. Algunos de estos cambios son simples consecuencias del trauma asociado con la cirugía y otros involucran el reconocimiento de las diferencias antigénicas entre el donador y el receptor.

Dentro de estos cambios, el sistema inmunológico juega un papel muy importante en la tolerancia o rechazo de cualquier órgano o tejido trasplantado, debido a la respuesta colectiva y coordinada de moléculas y células responsables de mantener el equilibrio homeostático ante la exposición continua de antígenos extraños. De este modo, la importancia del sistema inmunológico dentro del proceso depende de factores tales como la incompatibilidad entre el donador y el receptor.

Así pues, normalmente cuando se implanta un órgano o tejido extraño, se activan todos los mecanismos inmunitarios que controlan las respuestas celulares y humorales tanto específicas como inespecíficas. Por lo que la respuesta inmune clásica en un receptor no presencibilizado es un proceso dependiente de células T, las cuales requieren la presencia de células presentadoras activadas, pertenecientes al Sistema Inmune Innato. Habitualmente ésta activación se desarrolla en condiciones fisiológicas por estímulos proinflamatorios, tales como citocinas inflamatorias. En el caso del trasplante, estas señales pueden ser producidas por las células del donante o por las células del huésped, expuestas a insultos inmunológicos y no inmunológicos.

Sin embargo, aunque la mayor parte de los estímulos proinflamatorios en la respuesta inmune derivan del sistema innato de defensa, en el trasplante de órganos, uno de los elementos centrales es la activación de las células T del huésped. Lo cual se debe a las importantes disparidades antigénicas entre el donador y el receptor. REF

Complejo Principal de Histocompatibilidad

El complejo principal de histocompatibilidad (CPH), es el principal responsable de que el injerto sea percibido como similar o diferente a los tejidos propios. Los genes del CPH están presentes en todas las especies de mamíferos y son los que determinan la compatibilidad tisular entre individuos.²⁶

Sus productos génicos más importantes son las moléculas de clase I y de clase II y son los principales antígenos responsables del rechazo de injertos entre diferentes sujetos. La función fisiológica de estas moléculas es la presentación de péptidos extraños a los linfocitos T. Las moléculas de clase I presentan péptidos a los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ y las de clase II a los linfocitos T cooperadores CD4⁺.²⁷

En pocas palabras, las diferencias entre el tejido propio y el tejido no propio se deben a polimorfismos genéticos entre los diferentes alelos de los genes del CPH. Por tanto, el reconocimiento del injerto como propio o extraño es una característica heredada.²⁵

Células Presentadoras de Antígenos

Las células presentadoras de antígeno (CPA) son células especializadas en el procesamiento y presentación de antígenos. Estas células expresan en sus superficies moléculas antigénicas del CPH de clase II de forma constitutiva. Debido a esto, las CPA, pertenecientes al Sistema Inmune innato tales como las células dendríticas y los macrófagos, son un componente crítico en el inicio de la respuesta inmune en contra de antígenos extraños (aloantígenos).

Las células dendríticas intervienen principalmente en el inicio de las respuestas de los linfocitos T a antígenos proteicos. Se localizan por debajo del epitelio y en la mayor parte de los órganos donde están preparadas para captar antígenos y transportarlos a los órganos linfáticos periféricos.²⁸

Las células de la línea monocitos/macrófagos son células que se originan en la médula ósea, circulan en la sangre y maduran y se activan en diferentes tejidos. De esta manera los macrófagos están presentes en todos los órganos y tejidos, y reciben nombres especiales para designar localizaciones específicas, tales como los macrófagos que residen en el hígado o células de Kupffer. Asimismo las células efectoras de la inmunidad innata son los macrófagos activados que sintetizan citocinas proinflamatorias, las cuales reclutan y activan a otras células. Otras citocinas como la IL-12 e IL-4 inducen la diferenciación de los linfocitos T a linfocitos Th1 y Th2. En la inmunidad adaptativa estas células actúan como CPA al presentar los antígenos extraños a los linfocitos T.

Normalmente las CPA del donador son progresivamente reemplazadas por las CPA del receptor, lo cual indica el grado de importancia que tienen estas células en la respuesta de rechazo. En condiciones fisiológicas, los antígenos exógenos unidos a las moléculas de clase II son presentados a los linfocitos T CD4⁺, y éste contacto entre la CPA y el linfocito T es suficiente para proporcionar señales que estimulan la proliferación y diferenciación de los linfocitos T.²⁹

Linfocitos T

Los linfocitos T constituyen la mayoría de los linfocitos circulantes en el torrente sanguíneo y son los principales mediadores de la inmunidad adaptativa.

Numerosas evidencias demuestran, que la respuesta inmune en contra del injerto es dependiente de células T, y aseveran que el papel de los linfocitos T en el rechazo agudo es dirigir la respuesta inmune por medio de la inflamación en el rechazo de órganos.³⁰

Normalmente, después del trasplante, los linfocitos T pueden reconocer los aloantígenos de dos maneras, directa e indirecta, es decir, la activación de las células T del receptor, se puede originar tanto por CPA del donante como por CPA del receptor. Por lo que, el alorreconocimiento ocurre a través de dos vías: la vía directa, en la que las células T del receptor reconocen las moléculas del CPH expresadas sobre la superficie de las CPA del donador. Y la vía indirecta, donde las moléculas del CPH del donador y los antígenos menores de histocompatibilidad son capturados y procesados por las CPA del receptor para ser presentados a los linfocitos T.³¹

En el caso del trasplante los antígenos exógenos también pueden ser presentados unidos a las moléculas del CPH de clase I, y así activar a los linfocitos T CD8⁺, de esta manera, las células T CD8⁺ donador-específicas juegan un importante papel en el rechazo temprano. Datos experimentales evidencian que el reconocimiento directo del antígeno es el principal mecanismo por el cual los linfocitos T citotóxicos (LTC) reaccionan frente al injerto.³²

Sin embargo, la activación de los linfocitos T requiere de dos señales: la primera, que ya ha sido mencionada, es proporcionada por los antígenos extraños que junto con las

moléculas del CPH expresadas en la superficie de las CPA son presentados a los linfocitos T, simultáneamente los correceptores CD8⁺ y CD4⁺ de los linfocitos T interaccionan con regiones conservadas de las moléculas del CPH de clase I o clase II respectivamente, y como consecuencia el linfocito es activado parcialmente.²⁷ La segunda señal necesaria para la activación de los linfocitos T es aportada por señales coestimuladoras, mediadas por la interacción entre receptores no polimórficos expresados en la superficie de los linfocitos T tales como CD28 y CD40L y sus respectivos ligandos B7-1, B7-2 y CD40, en la superficie de las CPA del donante o del receptor, esta señal también es proporcionada por citocinas como IL-1 e IL-6 secretadas por los macrófagos y por los propios linfocitos.³³

La activación de los linfocitos T CD4⁺ resulta fundamental en el rumbo de la respuesta inmunitaria al trasplante, ya que una vez activados los linfocitos T CD4⁺ vírgenes (Th0) proliferan diferenciándose en células efectoras Th1 o Th2. Los linfocitos Th1 CD4⁺ producen Interleucina (IL) IL-2, Interferón- γ (IFN- γ) y TNF- α , que dirigen la respuesta de células T citotóxicas CD8⁺ y la activación de macrófagos, respuesta mediada por células del tipo hipersensibilidad retardada, constituyendo así la respuesta predominante frente al injerto. Mientras que los linfocitos Th2 CD4⁺ secretan principalmente IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10 e IL-13 que dirigen la activación de los linfocitos B, producción de anticuerpos y consecuentemente respuestas humorales, y la regulación de las respuestas tipo Th1.^{34, 35}

Después de ser activados los linfocitos T CD8⁺ también secretan citocinas como INF- γ , INF- α , linfotóxina y en menor grado IL-2 que incrementan la respuesta alógena en contra del injerto.

Aunque las células asesinas naturales (NK) infiltran los aloinjertos rechazados, sólo se ha demostrado que están implicados de manera importante en el rechazo de aloinjertos de médula ósea y xenoinjertos.³⁶

Linfocitos B

La respuesta de los linfocitos T activados por el antígeno, proporciona las señales necesarias para la maduración de los linfocitos B a células plasmáticas secretoras de anticuerpos o inmunoglobulinas, que guían la respuesta inmune humoral.

Los anticuerpos o inmunoglobulinas participan en el proceso de rechazo recubriendo o neutralizando células extrañas, fijan el complemento produciendo quimiotaxis celular, con aumento de la permeabilidad vascular y lisis de las células blanco.

También pueden recubrir antígenos extraños mediante el proceso de opsonización con lo que aumenta la capacidad fagocítica de células como macrófagos y basófilos, que tiene receptores para inmunoglobulinas en sus superficies.³⁷

Finalmente también pueden presentar actividad de CPA. Los linfocitos B reconocen el antígeno, lo internalizan y procesan para luego presentarlo junto con las moléculas del CPH de clase II a los linfocitos T.

Las respuestas de anticuerpos son causa importante de rechazo, sin embargo, el papel de los linfocitos B en el rechazo agudo del alotrasplante de islotes pancreáticos es mucho menos claro que el de los linfocitos T.

Citocinas

Como ya ha sido mencionado, un papel muy importante en este gran número de interacciones entre células, es el de la señalización celular a través de mediadores solubles tales como citocinas, que activan y guían a las células inmunes al sitio de la lesión.

Las citocinas son proteínas solubles sintetizadas y secretadas por los macrófagos, células endoteliales y más tarde por los linfocitos T que responden al antígeno extraño. Estas proteínas son modificadoras de la respuesta biológica ya que regulan la proliferación, diferenciación y activación de las células del sistema inmune.³⁸

Las células del sistema inmunitario utilizan las citocinas para comunicarse entre sí y regular los eventos locales y sistémicos de la respuesta inmunitaria e inflamatoria. Las acciones de las citocinas suelen ser pleiotrópicas, redundantes, sinérgicas y antagónicas con respecto a la función del sistema inmune. Pueden actuar sobre las

mismas células que la producen (actividad autócrina), en células cercanas (actividad parácrina) y en células distantes (actividad endócrina).

Después del trasplante se activa la respuesta inmune y gran cantidad de citocinas es expresada por los linfocitos T y otros leucocitos (macrófagos). Tales citocinas dirigen el proceso de señalización e interacción celular debido a su unión a receptores celulares para citocinas. De esta manera, dirigen el desarrollo de la fase efectora del sistema inmune, lo cual, lleva a la destrucción de las células trasplantadas.³⁹

Con respecto a la respuesta inmunológica del rechazo de injertos, las citocinas de mayor interés incluyen TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-2, IL-5, IL-10, IL-4 e INF γ . Las citocinas IL-1 β y TNF- α producidas principalmente por los macrófagos, sensibilizan a las células T a través de la expresión de receptores para otras citocinas que tienen efectos sobre la proliferación y diferenciación celular, tales como IL-2 e IL-12.³⁹ IL-1 β y TNF- α son consideradas las citocinas clave en el desarrollo de la disfunción de los islotes pancreáticos trasplantados, ya que inducen daño estructural y funcional en las células del endotelio vascular. Y promueven la expresión de moléculas de adhesión endotelial, por tanto, contribuyen al reclutamiento de leucocitos en el sitio del trasplante.⁴⁰

En el caso del alotrasplante estas citocinas pueden ser producidas por las células del donante o por las células del huésped expuestas a insultos inmunológicos y no inmunológicos.

Algunas citocinas como el TNF- α y el IFN- γ incrementan la expresión de moléculas del CPH en gran cantidad de tipos celulares.

IL-1 β

La IL-1 β es un péptido de 17 KD. Esta citocina es liberada durante la fase aguda de la respuesta inmune y es producida por los macrófagos presentes en los tejidos. Es una potente citocina proinflamatoria, activa linfocitos T, estimula células endoteliales para la expresión de moléculas de adhesión y favorece la coagulación. A bajas concentraciones funciona como mediador de la inflamación local y a altas concentraciones causa fiebre y anorexia.

La IL-1 α e IL-1 β son producidas principalmente por los macrófagos pero también por células endoteliales, fibroblastos y linfocitos T. La IL-1 β tiene varias funciones fisiológicas tales como inducción de la inflamación y modificación de la respuesta inmune. Varios artículos publicados demuestran que la IL-1 β es de las citocinas con más responsabilidad en la destrucción de los islotes trasplantados. Además se ha encontrado que la IL-1 β estimula la liberación del óxido nítrico (ON).⁴¹

TNF- α

Es un péptido de 17 KD sintetizado por varias células durante la respuesta inflamatoria, los macrófagos son las principales células productoras de TNF- α , pero también otros tipos celulares, tales como, las células endoteliales pueden ser estimuladas para secretar TNF- α .⁴²

Esta citocina fue descubierta originalmente como el agente responsable de la necrosis hemorrágica del sarcoma murino después de la administración de endotoxina.⁴³

Dependiendo de las concentraciones de TNF- α , las respuestas sistémicas de los tejidos y las células son extremadamente variables. A bajas dosis el TNF- α actúa manteniendo e incrementando la reparación tisular. A altas concentraciones, lleva a necrosis tumoral, pero eventualmente también al daño del tejido normal. Finalmente a muy altas concentraciones, causa choque letal similar al observado en choque endotóxico.⁴⁴

La producción y liberación de TNF- α es de los eventos iniciales en la respuesta inflamatoria y en la lesión del tejido trasplantado, capaz de desencadenar la cascada de liberación de citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, Factor Estimulante de Colonias y moléculas de adhesión) que coparticipan en la lesión de los islotes trasplantados y actúa como estimulante continuo para la infiltración de leucocitos. También es capaz de inducir la generación de radicales libres, lo que aumenta la susceptibilidad de las células endoteliales vasculares al ataque mediado por leucocitos.⁴⁴

El TNF- α también está involucrado en la inflamación, diferenciación y proliferación de linfocitos T y B. Esta citocina puede también ser directamente citotóxica para las células presentes dentro del injerto.

La secreción de TNF- α junto con la interacción CD40/CD40L producen varios efectos: vasodilatación y adhesión de leucocitos al endotelio, activación y extravasación de leucocitos. Además de que varias citocinas proinflamatorias como IL-1 β , TNF- α e INF- γ estimulan la liberación de varias quimiocinas por las células endoteliales.

De acuerdo con numerosos estudios, los islotes pancreáticos son particularmente susceptibles al daño mediado por citocinas proinflamatorias, particularmente IL-1 β y TNF- α , de tal manera que éste es el componente más importante en el rechazo de trasplante de islotes pancreáticos.⁴⁵

Óxido Nítrico

El ON es un gas simple, con vida media de 10-20 segundos, que posee un electrón desapareado o radical libre, lo que lo hace rápidamente reactante con otras moléculas y por ser lipofílico pasa fácilmente a través de las membranas para reaccionar con proteínas blanco dentro de la célula.

La célula endotelial continuamente produce ON en pequeñas cantidades, el cual tiene un papel fisiológico bien establecido como vasodilatador y regulador del tono vascular importante para mantener el suministro de sangre oxigenada a las células.⁴⁶

La biosíntesis del ON requiere de dos sistemas enzimáticos, la óxido nítrico sintasa constitutiva (cNOS), que requiere calcio y calmodulina para la expresión de su actividad y genera pequeñas cantidades de ON y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) cuya expresión depende de la activación celular mediante citocinas como IL-1 β y TNF- α , que junto con otros estímulos generan la producción de grandes cantidades de ON.⁴⁷

A altas concentraciones el ON es considerado tóxico, por causar lesión celular durante el trasplante debido a su reactividad con radicales libres, entre otros efectos. Los radicales libres causan lesión celular, que resulta en daño estructural y funcional de la célula. De esta manera, el ON interacciona con el superóxido para formar peroxinitrito que es un potente agente oxidante.

Células endoteliales

En vista de que el endotelio vascular constituye la barrera donde se establece el primer contacto (además de las CPA) entre el sistema inmune del huésped y el injerto, es evidente que el endotelio vascular juega un papel muy importante en esta gran variedad de procesos fisiológicos y fisiopatológicos.

Tras los insultos por isquemia/reperfusión se genera una gran cantidad de radicales libres derivados de oxígeno (radicales superóxido (O_2), radicales hidroxilo (OH) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2)). Estos radicales libres en combinación con la activación de las células de Kupffer estimulan la producción y liberación de algunas citocinas como IL-1 β y TNF- α . Tanto los radicales libres como las citocinas reaccionan con las células endoteliales promoviendo su activación. Esta activación se caracteriza por la expresión de moléculas de adhesión endotelial, las cuales junto con factores quimiotácticos promueven el tránsito de leucocitos.⁴⁸ De esta manera, el reclutamiento y la extravasación de los leucocitos al sitio de la lesión es regulado por la interacción entre las moléculas de adhesión tales como selectina E y P, ICAM-1 (del inglés Intercelular Adhesión Molecular-1) y VCAM-1 (del inglés, Vascular Cell Adhesión Molecular-1) expresadas en la superficie de las células endoteliales, con sus ligandos como LFA-1 y VLA-4 expresados en los leucocitos activados.⁴⁹

Así la activación endotelial por citocinas proinflamatorias incrementa la producción de ON. El ON en conjunto con factores quimiotácticos y las citocinas proinflamatorias promueven el tráfico de leucocitos al interior del injerto durante el proceso de rechazo y regulan directamente el proceso inflamatorio.⁵⁰

Las citocinas TNF- α e IL-1 β también actúan sobre las células endoteliales induciendo la activación del factor de transcripción nuclear κ -B (Nuclear Factor NF κ -B), el cual se encuentra normalmente dentro del citoplasma celular asociado a la proteína inhibidora llamada I κ B α . Cuando la célula endotelial es estimulada por el TNF- α , I κ B α se fosforila y separa del NF κ -B el cual es traslocado al núcleo donde se une a los promotores de varios genes para citocinas como L-1 β , IL-1 α , TNF α , IL-8, IL-2 y moléculas de adhesión como selectina E, ICAM-1 y VCAM-1, dando inicio a la transcripción y expresión de estas proteínas y potenciando la respuesta inmune.⁵¹

Además de su capacidad quimiotáctica las quimiocinas facilitan la migración al injerto de leucocitos, reforzando la capacidad adhesiva entre la interacción leucocito-célula endotelial.⁵²

Por otra parte, las células del endotelio vascular también pueden actuar como CPA ya que expresan moléculas del CPH tanto de clase I como de clase II, por lo que tienen la capacidad de estimular a los linfocitos T.

RECHAZO

En distintos modelos experimentales en animales y en trasplantes clínicos intervienen macrófagos, linfocitos Th1 CD4⁺ o CD8⁺ alorreactivos y linfocitos B en el rechazo de los aloinjertos. Estos distintos efectores inmunitarios provocan el rechazo del injerto a través de diferentes mecanismos.⁵³

Comúnmente un paciente al que se le implanta un órgano no propio, puede presentar tres tipos de rechazo:

Rechazo Hiperagudo

Es aquel que se presenta en minutos a horas después de iniciada la revascularización del órgano, y se debe a la presencia de anticuerpos preexistentes en la circulación del huésped contra antígenos del donante.

Los anticuerpos preformados reaccionan al unirse a los antígenos presentes en las células del endotelio vascular del órgano trasplantado, tales como los antígenos de los grupos sanguíneos (A,B,O,Rh) y antígenos del CPH e inician la cascada del complemento y de la coagulación, los vasos sanguíneos del órgano trasplantado se obstruyen con coágulos desencadenando una trombosis intravascular rápida que bloquea los vasos del injerto causando necrosis vascular y la muerte inmediata del tejido trasplantado.⁵⁴

Hoy día este tipo de rechazo es fácilmente predecible, y por lo tanto evitable mediante la determinación del grupo sanguíneo entre el donador y el receptor, y mediante la tipificación del HLA (prueba cruzada).

Rechazo Agudo

El individuo receptor que no ha sido sensibilizado necesita tiempo para responder a los antígenos del injerto, por lo que el rechazo agudo normalmente se presenta transcurridos unos días o semanas desde el momento del trasplante. El rechazo agudo de causa inmune es la forma más común entre las disfunciones tempranas del injerto y se le considera una reacción mediada por linfocitos T.

Histológicamente la característica más importante del rechazo agudo es la infiltración leucocitaria, localizada en principio en las áreas perivasculares y que con el tiempo se extienden por el resto del injerto. Normalmente este infiltrado celular está compuesto por linfocitos T, linfocitos B, macrófagos y células NK. Conjuntamente se observan fenómenos de trombosis intravascular y necrosis celular.⁵⁵

Normalmente después del alotrasplante, los linfocitos T reconocen los antígenos del donador, particularmente los del CPH, presentados por las CPA, tales como macrófagos o células endoteliales. Después del reconocimiento antigénico los linfocitos T son activados.

Por lo tanto, el rechazo del injerto inicia con el reconocimiento de los antígenos extraños y la consecuente activación de los linfocitos T. Una vez activados, los linfocitos T se expanden y generan células T maduras que provocan la destrucción del injerto a través de la respuesta de citotoxicidad directa mediada por linfocitos T citotóxicos ($CD8^+$), o mediante la Respuesta de tipo Hipersensibilidad Retardada (HSR) dirigida por linfocitos $Th1 CD4^+$.⁵⁶

Los Linfocitos $Th1 CD4^+$ median la respuesta de HSR, a través de la producción de citocinas que activan y guían a las células inmunes al sitio de la lesión. Existen algunas pruebas según las cuales estos linfocitos son suficientes para provocar un rechazo agudo. Los linfocitos T activados que infiltran el tejido y secretan citocinas tales como IL-2, $TNF-\alpha$ e $INF-\gamma$ promueven la activación de poblaciones inflamatorias inespecíficas como los macrófagos, los cuales contribuyen a la destrucción del injerto y la lesión de los tejidos adyacentes.⁵⁷

Los linfocitos Th1 CD4⁺, promueven también la maduración y diferenciación de las células B a células plasmáticas productoras de anticuerpos. Estos anticuerpos alorreactivos formados tras la implantación del injerto también pueden contribuir en la lesión vascular mediante la activación del complemento. Alternativamente, los anticuerpos pueden unir receptores Fas (Fc) en células NK o macrófagos y causar lisis por citotoxicidad mediada por anticuerpos.⁵⁸

Los linfocitos T CD8⁺ activados reaccionan con aloantígenos de las células endoteliales y producen lisis directa de las células del injerto.⁵⁹

En el caso del alotrasplante de islotes pancreáticos vía intraportal, diversos estudios demuestran que los islotes son altamente sensibles a los efectos tóxicos de citocinas y radicales libres, por lo tanto, la activación de los macrófagos y de las células endoteliales representa uno de los primeros eventos potenciadores de la disfunción y/o muerte de los islotes.⁶⁰ Durante la infusión intraportal los islotes quedan dispersos dentro del hígado donde hay un alto contenido de células de Kupffer. Estas células presentan aloantígenos a los linfocitos T. El linfocito reconoce el antígeno y las moléculas del CPH, junto con moléculas coestimuladoras y otras señales como interleucinas (IL-12) activan a los linfocitos Th1. Los linfocitos Th1 CD4⁺ activados, producen IL-2 e INF- γ , las cuales activan macrófagos, CD8⁺, NK y linfocitos B, que en conjunto con radicales libres y citocinas como IL-1 β y TNF- α inducen la destrucción de las células trasplantadas.

La incidencia de episodios de rechazo agudo y el tiempo en que aparecen durante el mantenimiento del injerto disminuyen la tasa de supervivencia, tanto en el primer año como a largo plazo, y constituyen un indicador de rechazo crónico.

Rechazo Crónico

Es aquel que se presenta de meses a años después del trasplante, y se origina principalmente por daño vascular inflamatorio al trasplante. Este tipo de rechazo se caracteriza por la infiltración de macrófagos a los vasos y tejidos del injerto, seguida por oclusión arterial, es decir, hay una reconstrucción patológica del órgano con la fibrosis y pérdida de la función. En sentido estricto, el rechazo crónico supone la pérdida irreversible de la función del tejido trasplantado que ocurre de forma tardía en el periodo

postrasplante, generalmente tras varios años. Tanto los factores inmunológicos como los no inmunológicos contribuyen a su patogénesis y al parecer tanto la inmunidad celular como la humoral participan a través de la infiltración de linfocitos Th1CD4⁺ que activan células T citotóxicas (LCT), macrófagos y linfocitos B.^{61, 62}

INDUCCIÓN DE TOLERANCIA INMUNOLÓGICA

Como es bien sabido, el alto grado de polimorfismo en los genes del CPH es la principal causa de los problemas de rechazo de los trasplantes de órganos. Por lo que, la inducción de tolerancia inmunológica de un órgano o tejido trasplantado de un donador específico, mediante la reducción del sistema inmune del receptor que ocasione que el injerto sea aceptado, permanece por si mismo como el principal problema derivado del trasplante.

La falta de respuesta del Sistema Inmune frente a la estimulación antigénica provoca una respuesta de tolerancia. De acuerdo con varias publicaciones, los principales mecanismos implicados en la generación de tolerancia son, la delección clonal mediante un proceso de muerte celular, y la anergia clonal mediante la inactivación funcional. Otras publicaciones indican que la falta de respuesta funcional también se puede deber a la inducción de células T reguladoras que suprimen las funciones efectoras de los linfocitos T, generalmente mediante citocinas como IL-4.⁶³

A este respecto, uno de los fenómenos más intrigantes de la naturaleza es la aceptación materna del feto o semi-injerto, ya que la mitad de sus genes son de origen paterno. Se sabe que la madre produce una respuesta inmune activa frente al feto y sin embargo, en la mayoría de los casos, no hay rechazo inmunológico. Varias publicaciones describen diferentes mecanismos que pueden explicar la paradoja inmunológica del embarazo: 1) el feto ocupa un lugar protegido por una barrera de tejido no inmunogénico, 2) inmadurez antigénica del feto, y 3) tolerancia inmunológica de la madre, probablemente debido a que el feto fomenta una respuesta inmunosupresora en ella. Asimismo ciertos experimentos revelan que en la interfase materno fetal se sintetizan citocinas Th2 responsables de la supresión local de las respuestas Th1 a los antígenos fetales⁶⁴. Sin embargo, en ratones gestantes que han

sido bloqueados para IL-4 e IL-10 puedan tener gestaciones normales. El conocimiento de la forma en que el feto escapa al sistema inmunitario de la madre puede ser importante para mejorar la práctica de los trasplantes.⁶⁵

Por otro lado, la tolerancia al trasplante implica, en sentido estricto, la falta de respuesta frente al tejido alogénico con respuesta inmune mantenida a otros antígenos, en ausencia de tratamiento inmunosupresor.

Sin embargo, hasta la fecha no existen protocolos que permitan interrumpir por completo la inmunosupresión. El uso de agentes que bloquean específicamente las respuestas T y la correlación de su uso con la supervivencia del injerto, confirman el papel central de las células T en el rechazo de injertos. En la actualidad, a pesar de los tratamientos inmunosupresores, los episodios de rechazo post trasplante siguen siendo frecuentes.^{66, 67, 68}

Aunque los tratamientos inmunosupresores utilizados en la actualidad son relativamente eficaces en la prevención y tratamiento de las formas más agudas de rechazo. Sin embargo, en la totalidad de los enfermos trasplantados el órgano injertado es finalmente destruido en un plazo más o menos largo sin que hasta el momento se disponga de tratamientos eficaces que lo eviten.⁶⁹ Por ello, el interés prioritario en trasplante se centra, por un lado, en el descubrimiento de nuevas terapias inmunosupresoras y/o inmunomoduladoras que introduzcan en el receptor un estado de tolerancia al injerto completo y permanente.

MELATONINA

La glándula pineal secreta una hormona llamada melatonina o N-acetil-5-metoxitriptamina (figura 5).

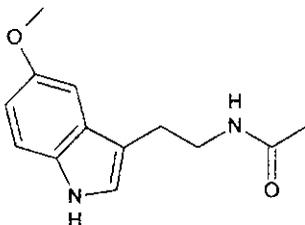


Figura 5: Estructura química de la melatonina.

La función principal de esta hormona es sincronizar la actividad biológica con el ciclo luz-oscuridad, pero además, esta hormona también funciona como captador de radicales libres. De acuerdo con varias publicaciones esta característica está dada por el grupo 5-metoxi, el cual, es esencial para tener mayor actividad antioxidante, y es una de las razones por las que se considera a la melatonina una hormona con amplias cualidades como agente citoprotector.⁷⁰

De este modo, la melatonina es conocida como uno de los agentes antioxidantes más potentes por su capacidad depuradora de radicales libres derivados de oxígeno tales como el radical OH así como también por reducir la producción de ON, lo que proporciona a los componentes celulares protección contra el daño oxidativo. Asimismo, la melatonina es una hormona lipofílica capaz de cruzar todas las membranas biológicas.⁷¹

El mecanismo de acción que subyace a los efectos pleiotrópicos de la melatonina no se conocen con exactitud. Sin embargo, al parecer la melatonina actúa por medio de tres mecanismos de acción: 1) Se une a receptores membranales acoplados a las vías de señalamiento de la adenilato ciclasa y de la fosfolipasa C; 2) Se une a proteínas nucleares que pertenecen a la familia de los receptores retinoidales; y 3) Se une y modula la actividad de la calmodulina y de la proteína cinasa C.⁷²

Diversos reportes demuestran que además de la glándula pineal la melatonina puede ser sintetizada por otras partes del cuerpo, así como por algunas células del sistema inmunológico, lo cual indica que hay un efecto directo de la melatonina sobre las células del Sistema Inmune.⁷³

En relación con la producción de mediadores inflamatorios como las citocinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α y el ON, los cuales participan de manera muy importante en el proceso de rechazo del alotrasplante de islotes pancreáticos. Numerosos estudios concuerdan en que la melatonina inhibe la producción de TNF- α ⁷⁴ entre otras citocinas (INF- γ), a través de su actividad antioxidante.⁷⁵ Ésto al parecer es debido a que la melatonina contrarresta el efecto de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), a través de la inhibición de la activación del NF- κ B, el cual tiene que ver con la síntesis de varias moléculas que participan en la respuesta inmune en contra del injerto⁷⁶

Sin embargo, de acuerdo con algunos reportes el efecto protector de la melatonina es específico para el TNF- α , debido a que sobre otras citocinas inflamatorias como IL-1 e IL-6, al parecer no tiene el mismo efecto.⁷⁷

De acuerdo con varios trabajos, la melatonina incrementa la secreción de IL-4, e inhibe la secreción de IL-2 y de INF- γ . La IL-4 junto con la IL-10, son responsables de suprimir las respuestas locales de los linfocitos Th1⁷⁸. Sin embargo, contrario a estos resultados hay evidencias que indican que la melatonina aumenta la secreción de citocinas TH1.⁷⁹ Una ventaja adicional de la melatonina es que ha demostrado no ser tóxica si se administra de manera exógena, es absorbida y eliminada rápidamente puesto que es capaz de atravesar todas las barreras morfológicas, por lo que su utilidad como antioxidante parece ilimitada.⁸⁰

JUSTIFICACIÓN

Los injertos trasplantados son muy vulnerables al ataque de citocinas inflamatorias, por lo que se considera que estas citocinas pueden ser el componente más importante en el rechazo agudo del injerto. A pesar de los tratamientos inmunosupresores la totalidad de los injertos son rechazados sin que hasta el momento se disponga de tratamientos eficaces que lo eviten. La melatonina ha demostrado tener un efecto modulador sobre algunas citocinas de fase aguda, por lo que consideramos que puede actuar como un agente regulador de la respuesta inmune de rechazo, con potencial para modificar la evolución del rechazo agudo y así ser una importante alternativa para prevenir el rechazo agudo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El problema más grave en el campo del trasplante de órganos es la respuesta inmune en contra del injerto. El reconocimiento de los antígenos del injerto activa a los linfocitos T que responden secretando citocinas, que amplifican la respuesta inmune en contra del injerto, es aquí, donde se puede intervenir para prevenir el rechazo. Por su capacidad depuradora de radicales libres y por tener un efecto inmunomodulador sobre las citocinas inflamatorias consideramos que la melatonina puede tener un efecto benéfico sobre el rechazo agudo.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto sobre el sistema inmune de la melatonina exógena en el rechazo agudo del alotrasplante de islotes pancreáticos vía intraportal en ratas.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Determinar el efecto de la melatonina exógena sobre las concentraciones séricas de IL-1 β en el alotrasplante de islotes pancreáticos vía intraportal.
- 2.- Determinar el efecto de la melatonina exógena sobre las concentraciones séricas de TNF- α en el alotrasplante de islotes pancreáticos vía intraportal.
- 3.- Determinar el efecto de la melatonina exógena sobre las concentraciones séricas de ON en el alotrasplante de islotes pancreáticos vía intraportal.

HIPÓTESIS

La melatonina exógena evita el rechazo agudo en el alotrasplante de islotes pancreáticos vía intraportal a través de la disminución en los niveles séricos de las citocinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α , entre otras cosas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para evaluar el efecto de la melatonina exógena sobre las citocinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α , así como del ON, en el rechazo agudo durante el alotrasplante de islotes pancreáticos vía intraportal se realizó un estudio intervencionista de tipo experimental, en el que se utilizaron 72 ratas macho de la cepa Sprague-Dawley con peso de 250-300 g provenientes del Bioterio del Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO) que sirvieron como receptores del trasplante de islotes de Langerhans vía intraportal, y 74 ratas macho de la cepa Wistar con peso de 350-400 g provenientes del Bioterio del Centro Universitario de Ciencias de la Salud (CUCS), que sirvieron como donadores de islotes pancreáticos.

Los animales fueron criados y manejados en condiciones de bioterio con ciclos luz/oscuridad de 12/12 h, a temperatura ambiente (21 \pm 1°C), respetando las normas nacionales e internacionales sobre el uso de animales de laboratorio.

GRUPOS DE ESTUDIO

Las ratas trasplantadas fueron divididas para su estudio y para la observación del comportamiento las variables en el tiempo en cuatro grupos:

GRUPO CONTROL: Trasplante y solución salina (Tx NS): 20 Ratas sometidas a alotrasplante de islotes pancreáticos vía intraportal. Se administró 0.5 mL de solución salina vía endovenosa 75 y 30 minutos pretrasplante, justo después del mismo, 1 y 2 horas postrasplante y una dosis diaria de sostén a las 9:00 a.m. durante 3 y 7 días.

GRUPO EXPERIMENTAL: Trasplante y Melatonina (Tx Mel): 17 ratas sometidas a alotrasplante de islotes pancreáticos vía intraportal más la administración de melatonina exógena. Se administró Melatonina exógena a dosis de 10 mg/Kg vía endovenosa disuelta en 0.5 mL de solución salina con una concentración al 4% de etanol (Sewerynek, 1996a), 75 y 30 minutos pretrasplante, justo después del mismo, 1 y 2 h postrasplante y una dosis diaria de sostén a las 9:00 a.m. por 3 y 7 días.

GRUPO Cirugía simulada NS: 19 ratas sometidas al mismo procedimiento anestésico quirúrgico que los grupos anteriores pero sin trasplante de islotes pancreáticos. Se administró 0.5 mL de solución salina vía endovenosa 75 y 30 minutos antes del procedimiento quirúrgico, justo después del mismo, 1 y 2 h después del procedimiento y todos los días a las 9:00 a.m. durante 3 y 7 días.

GRUPO Cirugía Simulada + Mel (n=25): Ratas sometidas al mismo procedimiento anestésico quirúrgico que los grupos anteriores sin trasplante de islotes pancreáticos más la administración de melatonina exógena. Se administró Melatonina exógena a dosis de 10 mg/Kg vía endovenosa disuelta en 0.5 mL de solución salina con una concentración al 4% de etanol, 75 y 30 minutos antes del procedimiento quirúrgico, justo después del mismo, 1 y 2 h después del procedimiento y una dosis diaria de sostén a las 9:00a.m. por 3 y 7 días.

Una *n* de 5 animales por grupo, se utilizaron para la determinación de las variables en los tiempos cero o pretrasplante (*n* = 5); a 1(*n*=5) y 2 (*n*=5) horas postrasplante y 3 (*n*=5) y 7 (*n*=5) días postrasplante.

VARIABLES

1. Independiente

a) Melatonina 10 mg/Kg (Sigma Chemical Co. PO Box 14508. St Louis MO, USA) 75 y 30 minutos pretrasplante, justo después del mismo, 1 y 2 h postrasplante y una dosis diaria de sostén a las 9:00 a.m. durante 7 días.

2. Dependientes

- a) Niveles plasmáticos de IL-1 β
- b) Niveles plasmáticos de TNF- α
- c) Determinación de nitritos en plasma

CRITERIOS

- a) Inclusión: Se incluyeron ratas macho sanas de la cepa Sprague-Dawley (receptores) y ratas Wistar (donadores), con peso de 250-300g y 350-400g respectivamente, criadas y manejadas en condiciones de bioferio.
- d) No inclusión: No se incluyeron ratas enfermas sin peso apropiado o de otra cepa diferente a las mencionadas.
- e) Exclusión: Se excluyeron del estudio ratas que fallecieron durante en el acto anestésico-quirúrgico, cuando se presentaron incidentes y/o accidentes durante la realización técnica que impidieran la valoración correcta de alguna de las variables, tales como, anormalidades anatómicas, sangrado, hipovolemia o incidentes en la toma de muestras, etc.

Diagrama de flujo

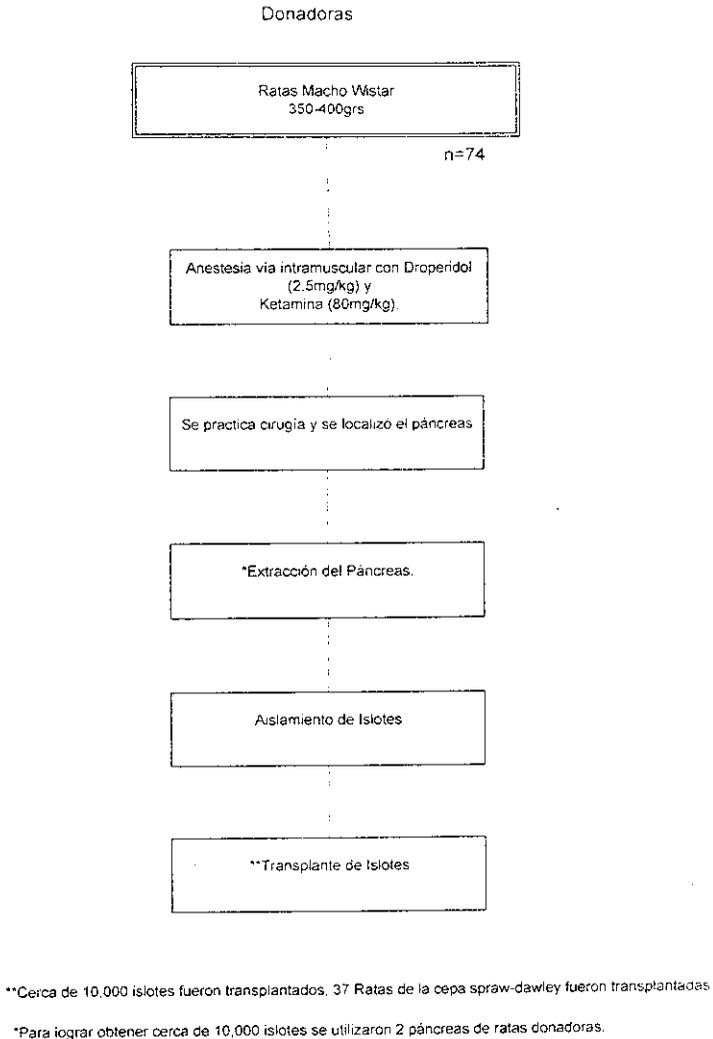


Diagrama 1. Procedimiento para las ratas donadoras.

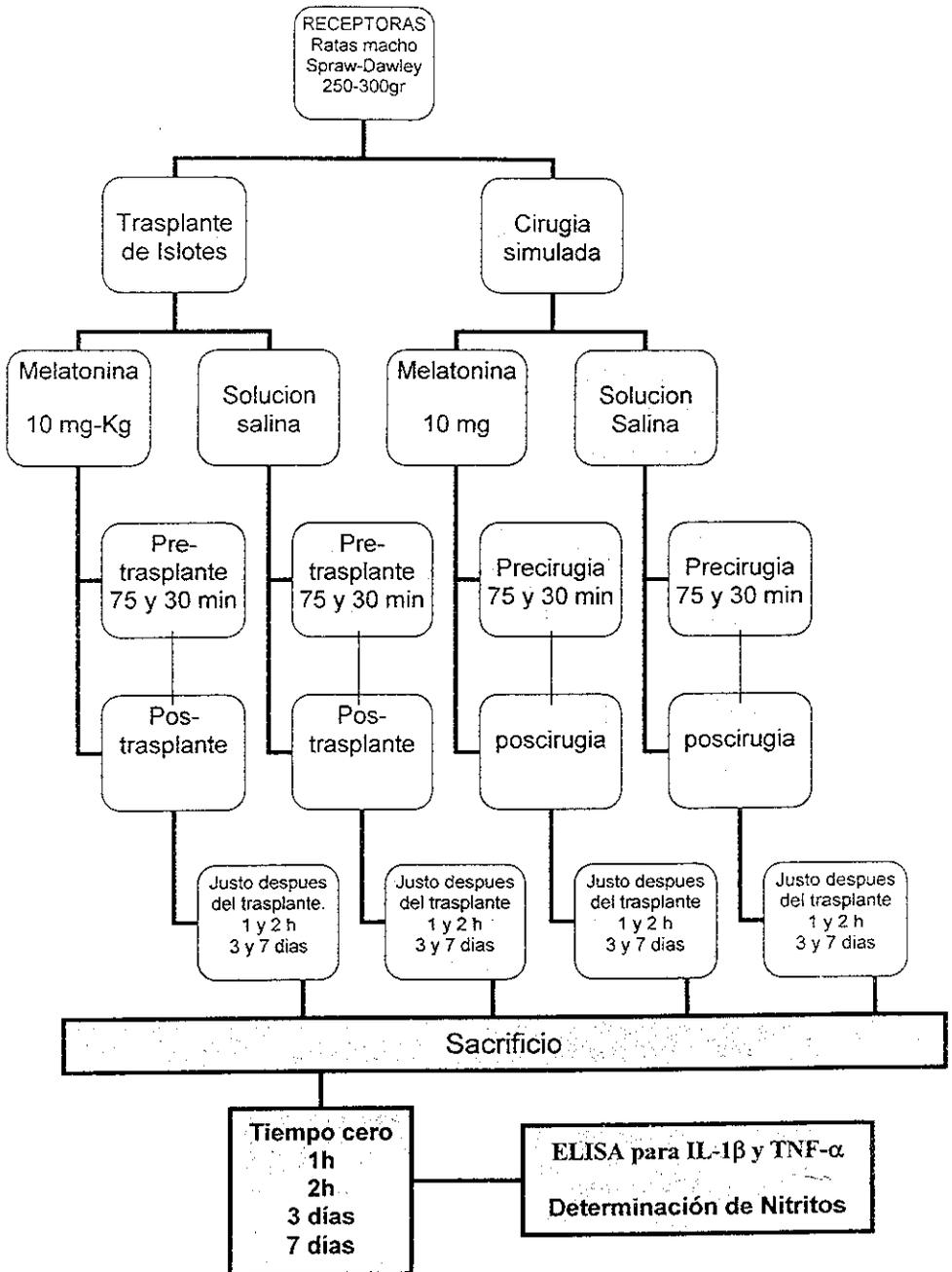


Diagrama. Ratas receptoras

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Técnica Quirúrgica

Todos los procedimientos quirúrgicos tanto en los donadores como en los receptores se realizaron con técnica estéril.

Donador

Se utilizaron dos páncreas de ratas donadoras, de la cepa Wistar provenientes del bioterio del CUCS de la Universidad de Guadalajara. Se realizó previa anestesia con Droperidol 2.5 mg/Kg y Ketamina 80 mg/Kg vía intramuscular. Se les practicó incisión media supra e infra-umbilical, se incidió la piel, tejido celular subcutáneo y peritoneo.

Se extirpó el apéndice xifoides para permitir la exposición del hígado y localizar el páncreas y el conducto biliar común, donde fueron colocadas dos riendas de seda 4/0 y entre ellas en el interior del conducto biliar un catéter el cual sirvió para inyectar solución Salina Balanceada de Hanks (HBSS, Sigma) (20 mL por páncreas) y permitir la distensión del páncreas.

Se ligaron las riendas y se colocaron dos más al final del conducto biliar en su entrada al duodeno para evitar la salida del líquido hacia el intestino. Y se procedió a extraer el páncreas, el cual una vez retirado fue colocado dentro de un frasco estéril con HBSS, el cual se mantuvo cerrado (Figura 6).

Los animales donadores fueron sacrificados por exanguinación y cierre de la pared abdominal.

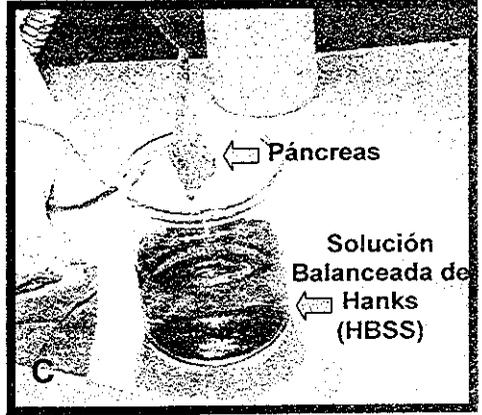
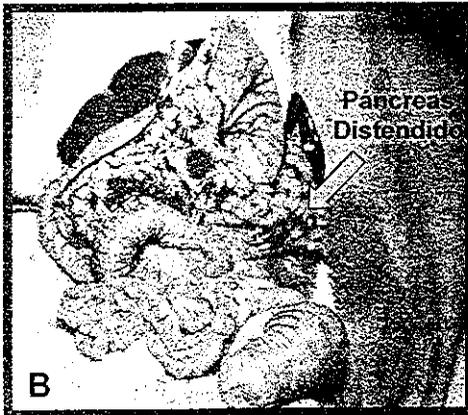
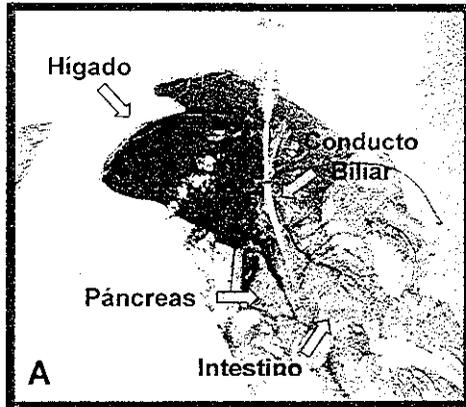


Figura 6: EXTRACCIÓN DEL PÁNCREAS. Se puede observar (A), a nivel del conducto biliar común, que es el mismo que el conducto pancreático en el hígado de la rata, la colocación de riendas con seda 4/0 y la introducción de hule de punzocat calibre 26, se liga el conducto en su entrada al duodeno y (B) se infiltra con solución HBSS estéril a 4° C, 25 mL. (C) Se extrae el páncreas completo y se coloca en recipiente con solución HBSS a 4° C.

Enseguida se procedió a hacer el aislamiento de los islotes de Langerhans del páncreas de rata donadora (Wistar).

La solución HBSS es un medio de preservación que contiene varios de los componentes necesarios para mantener la homeostásis de las células o tejidos. Previamente se tenía preparada colagenasa tipo V (Sigma), 8 mg por páncreas de rata, para provocar la separación del tejido conectivo y así permitir la liberación de los islotes. Después de la extracción, se procedió a limpiar el páncreas dentro de una campana de flujo laminar para retirar todos los coágulos y residuos de grasa. Los páncreas fueron colocados dentro de un vaso de precipitado con solución HBSS fría y colagenasa tipo V para su digestión (dos páncreas fueron digeridos dentro de cada frasco). El páncreas fue cortado con tijeras durante 5 minutos e incubado en baño con agitación constante a 37°C durante 15 minutos (Figura 7). Una vez digeridos los páncreas se filtraron a través de una malla previamente humedecida con solución HBSS, para obtener solamente las células de los islotes del páncreas, posteriormente se lavaron con solución HBSS fría en tubos cónicos para centrifuga de 50 mL a 1,300 g durante tres minutos a 4°C. El paquete de células fue nuevamente resuspendido en 40 mL de solución HBSS fría y lavado en dos ocasiones más a 1,300 rpm durante 3 min a 4°C para un total de 3 lavados.

Después de los lavados con solución HBSS, el paquete de células fue resuspendido en 25 mL de solución salina fisiológica fría y lavado en tres ocasiones a 1,300 g durante 3 minutos a 4°C (Figura 8). Al final de los lavados los islotes fueron nuevamente resuspendidos en 5 mL de solución salina fría para enseguida ser implantados por medio de un catéter a través de la vena porta hepática (vía intraportal) en el hígado de la rata.

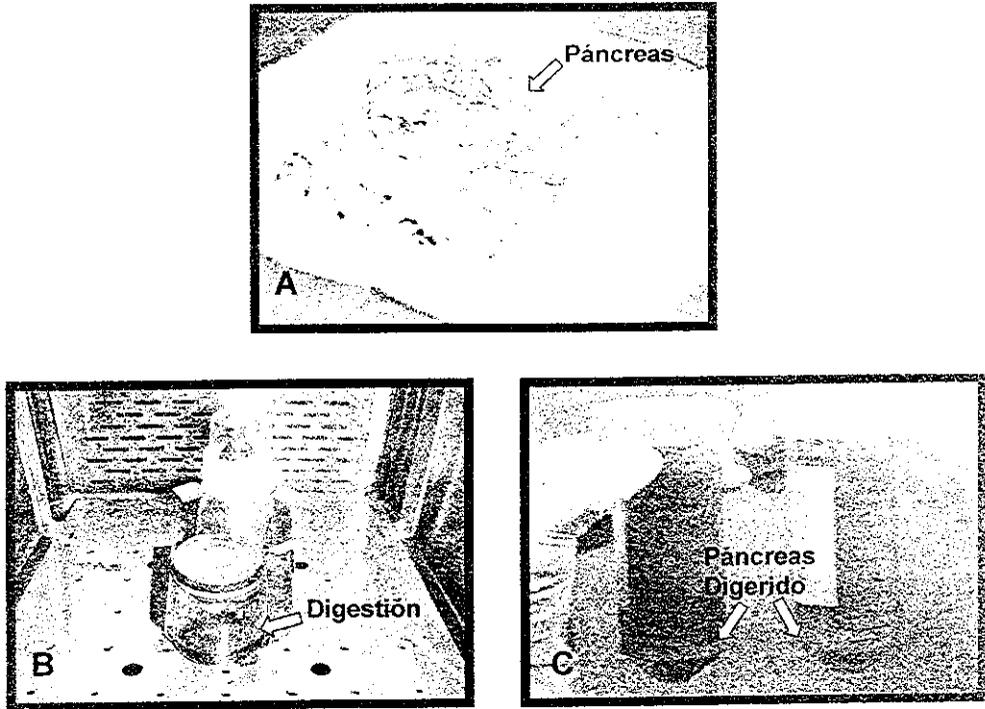


Figura 6. DIGESTIÓN CON COLAGENASA V. Previamente se tiene preparada *Colagenasa* tipo V (Sigma), 8 mg por páncreas de rata. (A) Se limpia el páncreas dentro de una campana de flujo laminar, sobre una gasa estéril. Se retiran los coágulos y grasa excedentes. (B) Se colocan los páncreas limpios dentro de un vaso de precipitado conteniendo solución HBSS, se agrega la *colagenasa tipo V*, y se cortan los páncreas con tijeras, en fragmentos lo mas pequeño posible y se incuban en baño con agitación a 37° C durante 20 minutos. (C), Se vacían los páncreas digeridos en tubos de centrifuga cónicos de 50 mL y se lavan 3 veces con HBSS a 4° centígrados a 1,300 rpm, durante 3 minutos.

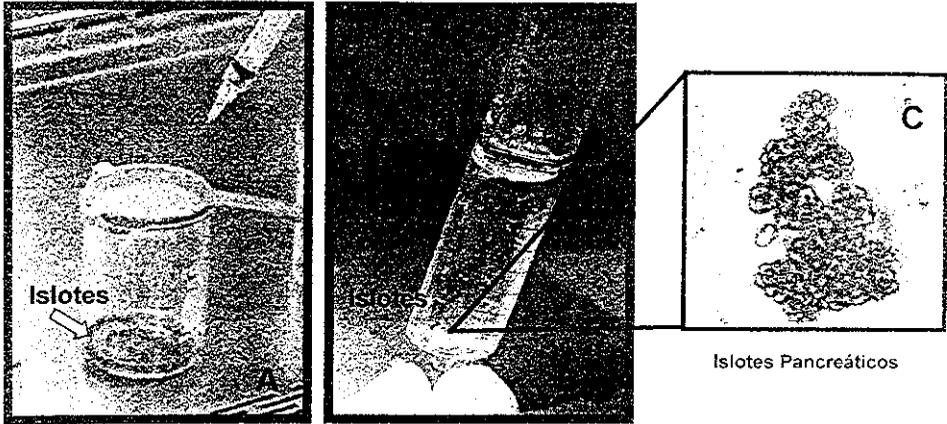


Figura 7. PURIFICACIÓN DE ISLOTES PANCREÁTICOS. (A) Se filtran los islotes pancreáticos sobre una malla previamente humedecida con solución HBSS. Se resuspende el tejido con 50 mL de solución HBSS fría y se lavan en 3 ocasiones a 1,300 rpm durante 3 minutos. (B) Se aplican en Circulación Intraportal. (C) Islotes Pancreáticos, teñidos con ditizona (colorante específico que los tiñe de color café).

Receptor

Se utilizaron ratas de la cepa Sprague-Dowley provenientes del bioterio del CIBO. Se realizó previa anestesia general con la administración de Droperidol 2.5 mg/Kg y Ketamina 80 mg/Kg vía intramuscular. Se les practicó tricotomía amplia abdominal, antisepsia de la piel, apertura de cavidad peritoneal a través de la línea media, y se procedió a la disección del vaso cecal de la vena porta y la colocación de un catéter PE-90/C 15" (INTRAMEDIC, Polyethylene Catheter, Clay Adams, Parsippany, N.J. 070554), para realizar el trasplante intraportal de cerca de 10,000 islotes pancreáticos/Kg, el cual fue retirado una vez realizado el mismo. La pared abdominal fue suturada en dos planos con material absorbible. Durante todo el procedimiento se mantuvieron condiciones de temperatura con la colocación del animal sobre un colchón térmico (figuras 8 y 9).

Cirugía Simulada

Las ratas fueron sometidas a la misma manipulación quirúrgica que los otros grupos, pero sin ser sometidas al trasplante de islotes (Grupos Manipulados).

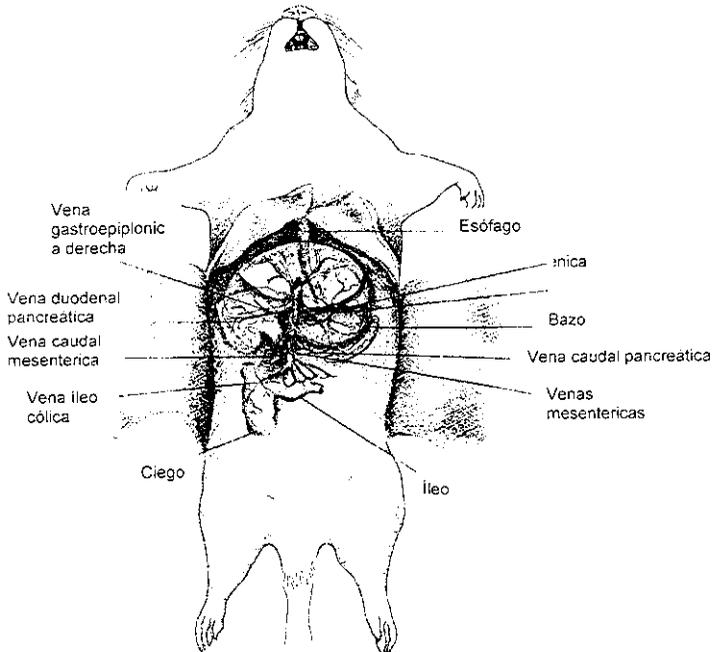


Figura 8:
CIRCULACIÓN PORTAL. Se muestra la circulación venosa portal de la ratona, se puede observar claramente la vena ileo-cólica (tributaria directa del sistema porta), sitio donde se aplican los Islotes Pancreáticos en el estudio que se presenta. Sitio en el que se embolizan los Islotes pancreáticos del grupo experimental.

TRANSPLANTE DE ISLOTES PANCREÁTICOS

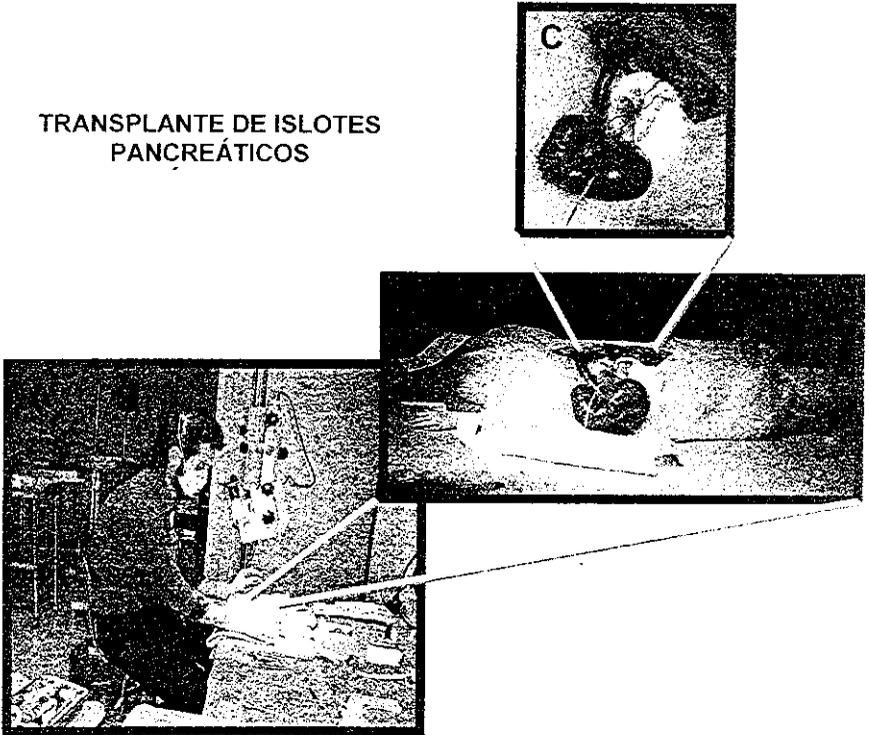


Figura 9. TRANSPLANTE DE ISLOTES PANCREÁTICOS APLICADOS EN CIRCULACIÓN INTRAPORTAL (Tx IP). (A) Se realiza laparotomía abdominal a través de incisión media supra e infra-umbilical, se incide piel, peritoneo hasta llegar a la cavidad abdominal completa. (B) Sobre una gasa húmeda se colocan los intestinos, Con la ayuda de un Microscopio Quirúrgico, se localiza la vena ileo-cólica (tributaria de la vena porta), y se colocan 2 riendas de seda 5/0, (C) se coloca un catéter largo en la luz de la vena y se sujeta con las riendas, se aplican los islotes pancreáticos suspendidos en solución salina fría, aproximadamente 8,000/Kg de peso.

DESCRIPCIÓN Y MEDICIÓN DE LAS VARIABLES (Prueba de ELISA)

La Melatonina (Sigma Chemical Co. PO Box 14508. St Louis MO, USA) fue administrada a dosis de 10 mg/Kg vía intraperitoneal disuelto en 0.5 mL de solución salina con una concentración al 4% de etanol.

Determinación de los niveles de IL-1 β y TNF- α en plasma: Para determinar los niveles plasmáticos de IL-1 β , TNF- α se tomaron muestras sanguíneas de la vena cava suprahepática y fueron colocadas en tubos de ensayo estériles. El suero fue obtenido por centrifugación a 10,000 rpm durante 10 min y dividido en alícuotas, las cuales fueron almacenadas a -80°C hasta llevar a cabo su determinación, mediante un análisis de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) para lo cual se utilizó un kit para IL-1 β y otro para TNF- α (QUANTIKINE. Rd Systems. Rat IL-1 β o TNF- α immunoassay. Minneapolis, MN 55413). Las placas de 96 pozos fueron leídas en un Elisometro (Microplate reader. Model 550. BIO RAD. California 94547. Cat. Num. 170-6750) a 450 nm. La concentración de IL-1 β y TNF- α en cada una de las muestras experimentales fue calculada a través de una curva estándar.

Determinación de niveles plasmáticos de Nitritos: Para determinar el ON, compuesto con una vida media muy corta, se utilizó la determinación de nitritos en plasma, debido a que estos son los productos finales estables. Los nitritos reaccionan con la oxihemoglobina al entrar al sistema vascular, por esta razón los encontramos en pequeñas cantidades en plasma, suero y orina. La reacción de los nitritos con la oxihemoglobina resulta en la formación de nitrato y metahemoglobina.

Reacción de Griess

Durante esta reacción los nitritos son sometidos a reacción de diazotización con la sulfanilamida para formar una sal diazonio de sulfanilamida, la cual puede acoplarse con la N-(1-Naftil) etilenediamina, un compuesto con un espectro de absorción característico. Los nitratos no pueden ser sometidos a reacción de diazotización con

sulfanilamida y entonces deben ser primero reducidos cuantitativamente a nitritos para reaccionar con el reactivo de Griess.

Los nitratos pueden ser reducidos a nitritos por dos métodos, uno químicamente utilizando cadmio y otro utilizando nitrato reductasa acoplada con la reacción de Griess (Granger, 1995).

Reactivos:

- 1.-Nitrato reductasa (5 μ L= 50 mU)
- 2.-NADPH 25Mm, EDTA 10 mM
- 4.-Glutámico Deshidrogenasa (5ml=100 mU)
- 5.-NH₄Cl (100mM)
- 6.- α -Ketoglutarato (4mM)
- 7.-Ac. 5-Sulfosalicílico al 6%
- 8.-NH₄Cl al 30%
- 9.-NaOH al 5%
- 10.-Reactivo de Griess:
 - N-(1-Naftil) etilendiamina al 0.1% en agua bidestilada
 - Sulfanilamida al 1% en Ácido Fosfórico al 5%

Para determinar los niveles plasmáticos de nitritos y nitratos se tomaron muestras sanguíneas de la vena cava suprahepática al final del tiempo establecido para cada grupo, y fueron colocadas en tubos de ensayo estériles. El suero fue obtenido por centrifugación a 10,000 rpm durante 10 min y dividido en alícuotas, las cuales fueron almacenadas a -80°C hasta llevar a cabo su determinación. Se midió la absorbancia a 543 nm utilizando un espectrofotómetro. El cálculo total fue hecho después de realizar una curva estándar relacionando absorbancia con concentraciones conocidas de nitrito de sodio (NaNO₂) y utilizando agua bidestilada como blanco (Figura 10).

Curva estándar NaNO₂

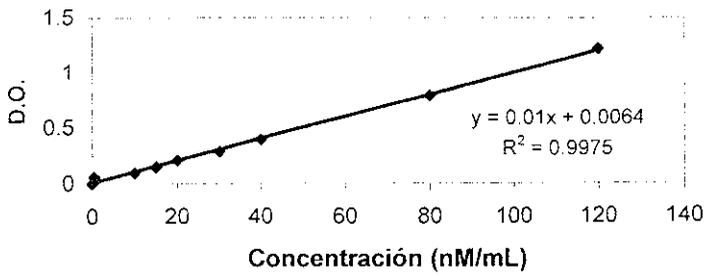


Figura 10. Curva estándar NaNO₂, con concentraciones de 0.1 a 120 nano moles (nM). $r^2=0.9975$. Densidad Óptica (DO).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los valores fueron expresados en valores de media \pm el error estándar (ESM). Los datos fueron analizados con una ANOVA de dos vías y la prueba Student Newman Keuls para variables no paramétricas. Fue considerada estadísticamente significativa una $p < 0.05$.

RESULTADOS

Efecto de la melatonina exógena sobre los niveles de la IL-1 β durante el alotrasplante de islotes pancreáticos via intraportal.

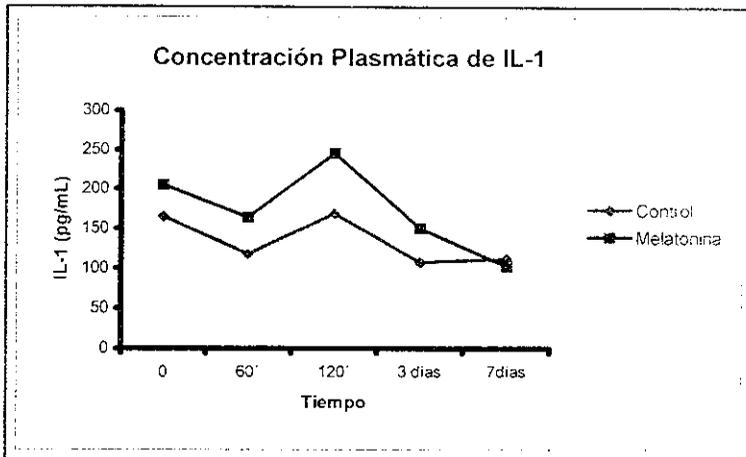
En la tabla uno se muestran los valores promedio, de la desviación estándar (DSM) y error estándar (ESM) de los niveles de IL-1 β en cada grupo en todos los puntos en el tiempo después del alotrasplante de islotes. Cuando se realizó la prueba *t de Student* entre cada tiempo comparado con el promedio basal en todos los grupos, hubo algunas diferencias en los grupos Melatonina, Sham y Sham más Melatonina, como se describe en los siguientes párrafos.

En el grupo control (Tx-SN) la diferencia de los promedios no fue significativa en ninguno de los puntos en el tiempo con respecto a su basal, pero comparado con el grupo Sham hubo diferencia a los 3 y 7 días. Mientras que el grupo Mel presentó un decremento discreto en los valores plasmáticos de IL-1 β , con disminución significativa al final de los 7 días postrasplante ($p= 0.021$). De igual forma que el Sham contra el control, el grupo Mel contra el grupo Sham fue diferente a los 3 y 7 días ($P=0.008$ y $p=0.003$, respectivamente).

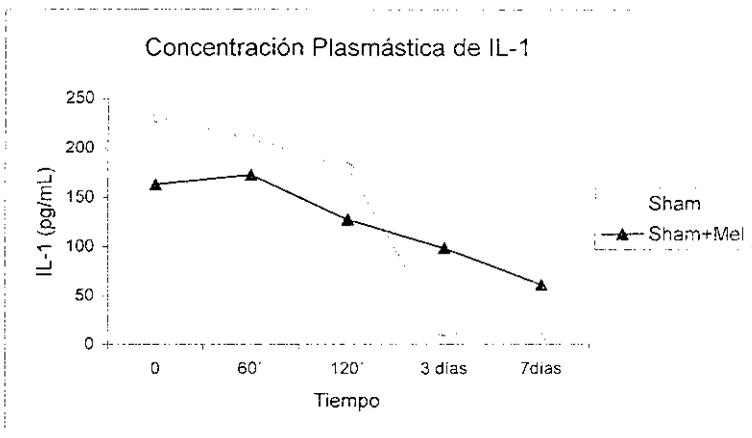
El análisis entre todos los grupos Control, Mel y Sham+Mel (ANOVA de una sola vía) mostró solo diferencia estadística significativa de los niveles de la citocina IL-1 β entre los grupos control y Mel en todos los tiempos ($P= 0.047$).

Debe mencionarse que contrario a lo esperado las diferencias significativas mencionadas anteriormente, señalan un incremento en los niveles de IL-1 β en los grupos Mel (tabla 2) y Sham más Mel. Una posibilidad, para explicar esta observación inesperada, es que el vehículo de la solución con melatonina (etanol) haya provocado algún efecto inflamatorio. Ya que los animales fueron medicados en cada punto en el tiempo en los grupos correspondientes, podría ser una razón para que precisamente estos grupos sean los que presentaron incremento de la interleucina en lugar de disminuirla. De hecho, en algunas muestras de estos grupos se observó lisis al tiempo de la toma. Independientemente de esto, el comportamiento de la citocina, se apegó a

lo esperado, es decir, si hubo disminución de IL-1 β en el tiempo en los grupos a los que se les administró Melatonina, como se muestra en las gráficas 1 y 2.



Gráfica 1. Comportamiento de los niveles de IL-1 β durante el alotrasplante de islotes pancreáticos via intraportal con y sin melatonina. Los resultados son expresados en media \pm ESM. Se muestran los grupos control y melatonina



Gráfica 2. Comportamiento de los niveles de IL-1 β durante el alotrasplante de islotes pancreáticos via intraportal con y sin melatonina. Los resultados son expresados en media \pm ESM. Se muestran los grupos sham y sham con melatonina

Niveles en Plasma de IL-1 β						
Grupo		Tiempo				
		Basal	60 min.	120 min.	3días	7días
Control Tx-SN	X	164.840	117.873	168.594	107.700	111.900
	DSM	58.775	24.519	91.686	78.271	36.779
	ESM	26.285	10.965	41.003	35.004	16.448
	t- Student		P= 0.138	P= 0.940	P= 0.228	P= 0.126
Melatonina Tx-Mel	X	204.805	163.391	245.249	149.700	102.100
	DSM	38.915	37.060	70.923	44.920	42.143
	ESM	19.458	16.574	50.150	20.089	24.331
	t- Student		P= 0.147	P= 0.394	P= 0.094	P= 0.021*
Sham IQ-SN	X	231.499	209.654	179.569	11.820	7.020
	DSM	56.928	178.914	55.965	26.430	25% 0.000
	ESM	28.464	89.457	25.028	11.820	75% 8.775
	t- Student		P= 0.824	P= 0.212	P< 0.001**	
	U-Mann Whitney					P= 0.016*
Sham+Mel IQ-Mel	X	162.744	172.450	127.154	98.100	61.100
	DSM	41.686	42.061	-	40.749	22.716
	ESM	18.643	24.284	-	22.716	13.115
	t- Student		P= 0.761	-	P= 0.038**	P= 0.009***
Control Vs Sham	t- student				P= 0.032[®]	P=<0.001^{®®}
Melatonina Vs Sham	t- student				P=0.008[®]	P=0.003^{®s}

Tabla 1. Muestra los valores de la media, desviación estándar (DSM) y error estándar de la media (ESM) de los niveles plasmáticos de IL-1 β en cada grupo en todos los puntos en el tiempo durante el alotrasplante de islotes pancreáticos via intraportal. Se contrastaron mediante una prueba de t de student o U de Mann Withney el basal de cada grupo con todos los puntos en el tiempo y se muestran sus significancias. Tx (Trasplante de islotes), SN (Solución Salina normal), Mel (Melatonina), IQ (intervención Quirúrgica sin trasplante)

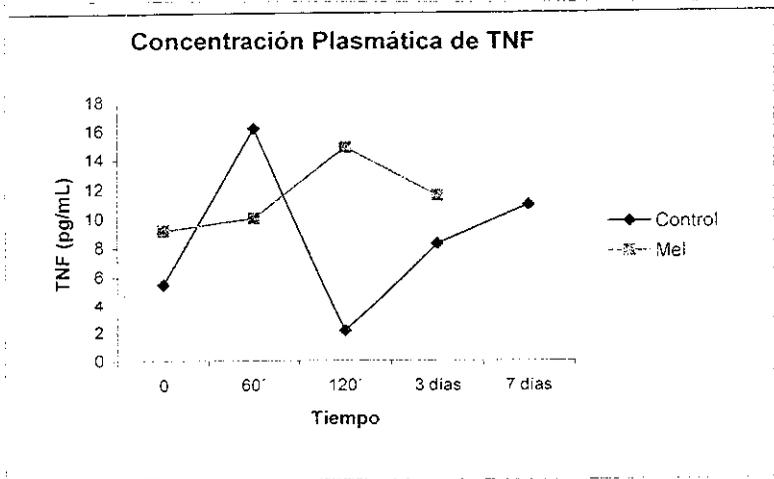
Análisis de ANOVA para IL-1 β					
Grupos	Tiempo				
	Basal	60 min.	120 min.	3 días	7 días
Control	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
Melatonina	(4) Fcal= 1.047	(5) Fcal= 3.286	(2) Fcal= 1.086	(5) Fcal= 1.152	(3) Fcal= 2.011
Sham + Mel	(5)	(3)	(1)	(5)	(3)
ANOVA	P= 0.384	P= 0.080	P= 0.345	P= 0.349	P= 0.196
Ho	√	√	√	√	√
Control	(5) Fcal= 2.202				
Melatonina	(4) ++	(5) ++	(2) ++	(5) ++	(3) ++
ANOVA	P= 0.047 ⁺				
Ho	X	X	X	X	X
Ha	√	√	√	√	√

Tabla 2: Muestra los valores estadísticos de F calculada (Fcal) y de P entre los grupos analizados mediante un análisis ANOVA con los valores de n en paréntesis. La hipótesis nula (Ho) dice que (las varianzas de los datos son iguales) no hay una diferencia estadística significativa entre los promedios de los grupos analizados. Ha = Las varianzas de los datos no son iguales

Efecto de la Melatonina (Mel) exógena sobre los niveles plasmáticos del TNF- α durante el alotrasplante de islotes pancreáticos via intraportal

La tabla tres muestra los promedios de los niveles plasmáticos de TNF- α en cada grupo y en todos los puntos en el tiempo después del alotrasplante de islotes. La diferencia en los valores de la media, analizada mediante la prueba de t de Student, en cada uno de los grupos no fue estadísticamente significativa, a excepción de un incremento significativo en el grupo control a los 60 minutos después del trasplante ($p=0.008$). En la gráfica 2 se muestra ese comportamiento.

Los grupos: Control contra Sham+Mel, Mel contra Sham y Sham+Mel contra Sham presentaron diferencia estadística significativa entre los promedios a los 60, 120 minutos y 3 días respectivamente ($p=0.031$; $p<0.001$; $p=0.032$).



Gráfica 3. Comportamiento de los niveles de TNF- α durante el alotrasplante de islotes pancreáticos via intraportal con y sin melatonina. Los resultados son expresados en media \pm ESM

El análisis de ANOVA entre los grupos control, Mel y Sham+Mel muestra que no hubo diferencia significativa en los promedios entre los grupos, sin embargo al aplicar el análisis de Kruskal-Wallis entre Control y Mel hubo diferencia significativa en todos los puntos en el tiempo (tabla 4).

Niveles Plasmáticos de TNF- α						
Grupo		Tiempo				
		Basal	60 min.	120 min.	3días	7días
Control Tx-SN	X	5.480	16.198	2.118	8.310	10.968
	DSM	3.816	3.916	2.190	2.206	1.105
	ESM	1.908	1.958	0.980	1.560	0.782
	t-Student		P=0.008*	P=0.138	0.401	P=0.132
Melato nina Tx-Mel	X	9.169	10.022	14.875	11.590	-
	DSM	9.511	7.095	0.884	1.994	-
	ESM	4.755	3.173	0.625	1.410	-
	t-Student		P= 0.881	P= 0.469	P=0.753	-
Sham IQ-SN	X	8.145	8.815	2.144	3.365	18.750
	DSM	6.177	6.478	2.265	0.233	6.300
	ESM	3.088	3.239	1.013	0.165	3.538
	t-Student		P= 0.886	P= 0.081	P=0.361	P= 0.076
Sham+ Mel IQ-Mel	X	7.063	5.185	-	9.434	15.810
	DSM	4.492	5.986	-	2.748	-
	ESM	2.246	3.456	-	1.229	-
	t-Student		P= 0.653	-	P= 0.359	-
	U Mann- Witney					P=0.057
Control Vs Sham+ Mel	t-Student		P= 0.031**			
Mel Vs Sham	t-Student			P<0.001***		
Sham+ Mel Vs Sham	t-Student				P= 0.032#	

Tabla 3. Muestra los valores de la media, desviación estándar (DSM) y error estándar de la media (ESM) de los niveles plasmáticos de TNF- α en cada grupo en todos los puntos en el tiempo durante el alotrasplante de islotes pancreáticos via intraportal. Se contrastaron mediante la prueba de t de Student o U de Mann-Witney el basal de cada grupo con cada uno de los puntos en el tiempo y se muestran sus significancias

Análisis de ANOVA para TNF- α						
Grupos	Tiempo					
	Basal	60 min.	120 min.	3 días	7 días	
Control	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	
Melatonina	(4)	(5)	(2)	(5)	(3)	
Sham + Mel	(5)	(3)	(1)	(5)	(3)	
ANOVA	Fcal= 0.328 P=0.728	Fcal= 3.020 P=0.099		Fcal= 0.872 P=0.465	Fcal= 2.420 P=0.195	
Ho						
Kruscal-Wallis			P=0.048#			
Control	(5)	(5)	(5) +	(5)	(5)	
Melatonina	(4)	(5)	(2)	(5)	(3)	
Kruscal-Wallis	0.034**	0.034**	0.034**	0.034**	0.034**	

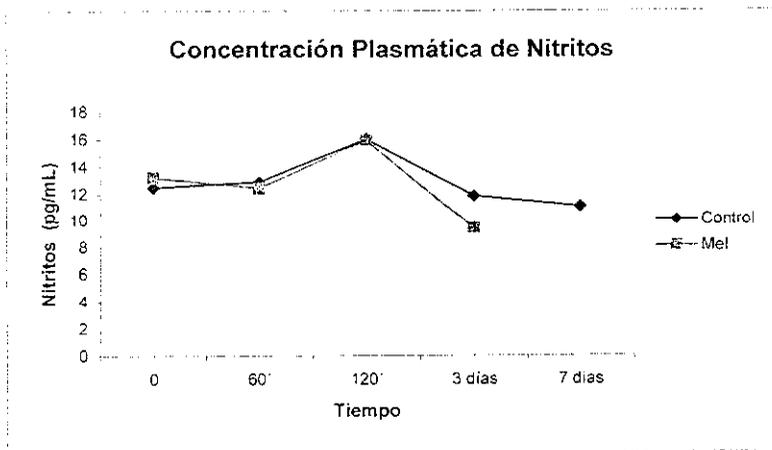
Tabla 4. Muestra los valores estadísticos de F calculada (Fcal) y de P entre los grupos analizados mediante un análisis ANOVA o Kruscal-Wallis con los valores de n en paréntesis. La hipótesis nula (Ho) dice que no hay una diferencia estadística significativa entre los promedios de los grupos analizados. Ha (Hipótesis estadística alterna)

BIBLIOTECA CUCBA

Efecto de la Melatonina (Mel) exógena sobre los niveles plasmáticos de Nitritos durante el alotrasplante de islotes pancreáticos vía intraportal

La tabla cinco muestra los valores de la media, DSM y ESM de los niveles plasmáticos de nitritos para cada grupo en todos los puntos en el tiempo después del alotrasplante de islotes pancreáticos.

Como en las anteriores variables, los valores promedio también se analizaron mediante la prueba de *t* de Student encontrándose lo siguiente. El grupo control presentó muy poca variación de los niveles de nitritos, solamente a los 120 min hubo una ligera elevación no significativa, respecto al valor basal. Por otro lado, a los mismos 120 minutos, el grupo Mel presentó una elevación significativa con respecto a su basal, disminuyendo a los 3 días postrasplante, aunque sin alcanzar la significancia. Este último comportamiento se muestra en la gráfica 4.



Gráfica 4. Comportamiento de los niveles de nitritos durante el alotrasplante de islotes pancreáticos vía intraportal con y sin melatonina. Los resultados son expresados en media \pm ESM.

Los niveles basales de nitritos en el grupo Sham fueron más bajos estadísticamente significativo ($p=0.044$) que en el grupo de Tx-Mel . Esta diferencia se repite a los 120 ($P=0.003$) y ($P=0.009$), pero ahora entre el control y Sham, como era de esperarse (Tabla 5).

Niveles Plasmáticos de Nitritos						
Grupo		Tiempo				
		Basal	60 min.	120 min.	3días	7días
Control Tx-SN	X	12.460	12.860	15.990	11.860	11.060
	DSM	3.240	0.819	4.538	0.919	2.051
	ESM	1.620	0.409	2.029	0.650	1.450
	t- Student		P=0.819	P=0.233	P=0.819	P=0.617
Melato nina Tx-Mel	X	13.185	12.410	15.910	9.410	-
	DSM	0.544	3.212	1.414	6.110	-
	ESM	0.272	1.436	1.000	12.710	-
	t- Student		P=0.52	P=0.021*		-
	U Mann- Whitney				P=0.267	
Sham IQ-SN	X	10.035	16.635	8.510	11.860	11.010
	DSM	2.413	6.621	1.746	0.919	2.563
	ESM	1.206	3.311	0.781	0.650	1.480
	t- Student		P=0.110	P=0.306	P=0.380	P=0.628
Sham+ Mei IQ-Mel	X	15.635	14.010	-	12.330	15.285
	DSM	6.437	1.670	-	0.879	3.955
	ESM	3.218	0.964	-	0.393	1.978
	t- Student		P=0.694	-	P=0.286	P=0.929
Mel Vs Sham	t- Student	P= 0.044		P=0.003		
Control Vs Sham	t- Student			P= 0.009		

Tabla 5. Valor promedio, desviación estándar (DSM) y error estándar de la media (ESM) de los niveles plasmáticos de nitritos en cada grupo en todos los puntos en el tiempo Se contrastaron mediante la prueba t de Student el basal de cada grupo con todos los puntos en el tiempo y se muestran sus significancias

El análisis estadístico de ANOVA o Kruscall-Wallis no muestra diferencias significativas entre ninguno de los grupos (Tabla 6).

Análisis de ANOVA para Nitritos					
Grupos	Tiempo				
	Basal	60 min.	120 min.	3 días	7 días
Control	()	(5)	(5)	(5)	(5)
Melatonina	() Fcal= 0.636	(5) Fcal= 0.448	(2) Fcal=0.000542	(5) Fcal=	(3) Fcal= 1.862
Sham + Me!	()	(3)	(1)	(5)	(3)
ANOVA	P= 0.552	P= 0.653	P= 0.982		P= 0.244
Ho					
Kruscall- Wallis				P=0.759	
Control	(5) Fcal= 1.411	(5) Fcal= 1.411	(5) Fcal= 1.411	(5) Fcal= 1.411	(5) Fcal= 1.411
Melatonina	(4)	(5)	(2)	(5)	(3)
ANOVA	P= 0.249	P= 0.249	P= 0.249	P= 0.249	P=0.249
Ho					

Tabla 6. Muestra los valores estadísticos de F calculada (Fcal) y de P entre los grupos analizados mediante un análisis ANOVA o Kruscall-Wallis con los valores de n en paréntesis. La hipótesis nula (Ho) dice que no hay una diferencia estadística significativa entre los promedios de los grupos analizados. Ha (Hipótesis estadística alterna).

DISCUSIÓN

Actualmente uno de los procedimientos más comunes para tratar diferentes enfermedades es el trasplante de órganos o tejidos. Sin embargo, cada tipo de trasplante presenta una respuesta inmunitaria diferente, así como sus propias dificultades médicas y quirúrgicas.

El trasplante de islotes pancreáticos por ejemplo, constituye una forma de tratamiento para la DM, cuyo objetivo fundamental es el de mejorar la calidad de vida de los pacientes diabéticos tipo 1, logrando un estado constante de normoglucemia y la independencia a la insulina exógena.⁸¹

No obstante, la respuesta inmunológica causante del daño funcional y estructural en el tejido trasplantado y que concluye con el rechazo y pérdida total del injerto, representa uno de los problemas más graves en el área del trasplante de órganos.

A pesar de la gran variedad de tratamientos inmunosupresores que existen en la actualidad, la gran mayoría de los injertos trasplantados son finalmente destruidos en un plazo relativamente largo sin que hasta el momento se disponga de tratamientos eficaces que lo eviten. Por lo que, la inducción de tolerancia al trasplante que permita que el injerto sea aceptado, persiste como el principal problema derivado del trasplante. Por ello, el interés prioritario en trasplante se centra en el descubrimiento de nuevas terapias inmunosupresoras y/o inmunomoduladoras que promuevan en el receptor del injerto un estado de tolerancia completo y permanente.⁸²

Es bien sabido, que los eventos inflamatorios no específicos que ocurren en el sitio del trasplante inmediatamente después del injerto, involucran la síntesis de citocinas, la producción de radicales libres y la activación de células endoteliales y sinusoidales, que contribuyen al daño de los islotes.⁸³ En este punto la melatonina juega un papel muy importante por su capacidad depuradora de radicales libres.

La melatonina considerada uno de los agentes antioxidantes más potentes, ha demostrado ser capaz de inhibir la concentración de TNF- α , así como de ON. Por lo que especulamos que la melatonina puede tener un efecto benéfico, desde el punto de vista inmunológico, en el alotrasplante de islotes pancreáticos vía intraportal. Por un lado, el TNF- α es capaz de estimular la producción de radicales libres de oxígeno

mitocondriales que favorecen los cambios en el estado redox citoplásmico que señala la activación de factores de transcripción sensibles al estado redox como el NFκB, el cual, regula una gran variedad de genes involucrados en la respuesta inflamatoria, incluyendo las citocinas TNF-α, IL-1β, IL-2 e IL-8, moléculas de adhesión (ICAM-1) y la iNOS. Este proceso puede ser atenuado con la disminución de TNF-α por la melatonina. Por otra parte, el radical OH funciona como un mensajero para la activación del NFκB y todos los antioxidantes que depuran el radical OH o sus precursores inhiben su activación.^{84, 85}

Hasta ahora no se había evaluado el efecto de la melatonina sobre estas citocinas en un modelo de alotrasplante de islotes pancreáticos vía intraportal. Sin embargo, el presente estudio no intenta demostrar que la melatonina sea capaz de provocar tolerancia inmunológica frente al injerto, puesto que debido a la complejidad de la respuesta inmune frente a los antígenos es obvio que son necesarias más determinaciones que soporten esta idea. Por lo que este trabajo marca el inicio para seguir investigando más sobre el efecto de la melatonina sobre otras citocinas y moléculas que son importantes en las respuestas de rechazo.

Los resultados de este estudio apoyan parcialmente la hipótesis planteada en este trabajo, acerca de que la melatonina exógena podría evitar el rechazo agudo en el alotrasplante de islotes pancreáticos, a través de la disminución de los niveles plasmáticos de IL-1β, TNF-α y ON. Sin embargo, diversas situaciones no permiten apreciar con claridad el efecto protector de la melatonina sobre estos mediadores solubles, por lo que a continuación se mencionan brevemente.

IL-1β

Los niveles plasmáticos de IL-1β en el grupo Tx- Mel, fueron más altos que lo esperado, comparados con los valores del grupo control, aunque sin significancia estadística (gráfica 1). Esto nos sugiere que los valores altos son debidos al azar o a algún problema del experimento, más que a un efecto directo de la melatonina sobre los niveles de la IL-1β. Por ejemplo, la solución de melatonina contiene un porcentaje de etanol, es posible que este vehículo pudiera causar alguna alteración y entonces

aparentar que la intervención quirúrgica, el trasplante de los islotes o la melatonina tienen un efecto negativo sobre la IL-1 β . Sin embargo, 7 días después del trasplante los niveles de IL-1 β disminuyeron significativamente comparado con su basal ($P= 0.021$), este era el efecto esperado. Esta observación refuerza la posibilidad de que hubo una alteración debido al etanol utilizado en la solución con melatonina en el grupo Tx-Mel, y es hasta los 7 días que hay un control en la producción de IL-1 β por el efecto de la melatonina.

La elevación de IL-1 β en el grupo Tx-Mel también puede ser explicada debido a que el alotrasplante lleva a la liberación y activación de una gran variedad de mediadores de lesión e inflamación. Estos elementos reaccionan con las células endoteliales para promover la producción y liberación de citocinas como IL-1 β en mayores cantidades al inicio y durante la inflamación, regulando junto con el TNF- α la expresión de otras citocinas que más tarde llegan al sitio de la lesión. Como se observa en la gráfica 1 los niveles disminuyen a los 3 y 7 días, por lo que podríamos decir, que la melatonina si tuvo un efecto benéfico, aunque no inmediato.

TNF- α

Esta bien demostrado que el trasplante de islotes se caracteriza por la liberación en la circulación sistémica de mediadores inflamatorios tales como TNF- α , IL-1 β y ON, además del daño funcional de las células endoteliales en el hígado. Por lo tanto, es probable que los altos niveles de TNF- α observados a los 60 min del grupo control comparado con su basal ($P= 0.008$) y a los 120 min del grupo Tx-Mel comparado con el grupo Sham ($P<0.001$), estén relacionados con una respuesta inflamatoria no específica desencadenada por la propia intervención quirúrgica.

Nuevamente, como se observa en la gráfica número 3 las concentraciones de TNF- α disminuyeron a los tres días después del trasplante en el grupo Tx-Mel, aunque sin significancia estadística. A pesar de que no se contó con los datos al séptimo día se hubiera esperado que los niveles de TNF- α continuaran disminuyendo. Estos resultados coinciden con los de otros autores que indican que la melatonina fue capaz de disminuir la secreción de TNF- α pero no de IL-1 β , sugiriendo que estas citocinas a pesar de tener

efectos similares, tienen diferentes vías de activación, lo cual pudiera justificar los altos niveles encontrados de esta citocina.⁸⁶

La presencia de sustancias biológicas y químicas que son necesarias en la separación y el aislamiento de islotes también podrían despertar la respuesta inmune y así proveer al menos una explicación parcial del fenómeno observado.

Por otro lado, en el grupo control el comportamiento fue el esperado, los niveles de TNF- α se elevaron a los 60 min, y luego disminuyeron. Ya es conocido que el pico máximo de TNF- α se observa aproximadamente a los 60 min.⁷⁴ A partir del tercer día postrasplante (gráfica 3) los niveles nuevamente comenzaron a aumentar, esto puede ser explicado como inicio de rechazo. Varios estudios sobre el trasplante de islotes vía intraportal, sugieren que las interacciones dinámicas entre los islotes trasplantados y el microambiente, son condición necesaria para la liberación de mediadores inflamatorios específicos y no específicos como parte del rechazo.

Nitritos

Varias líneas de investigación en roedores y seres humanos han indicado que el estrés oxidativo juega un papel muy importante en la activación de la muerte de los islotes y del tejido que los rodea, por lo que debido a su potente actividad antioxidante pensamos que la melatonina resultara una excelente opción para evitar la disfunción y pérdida de los injertos trasplantados.

De acuerdo con varias publicaciones el proceso de aislamiento de los islotes activa la cascada de eventos estresantes, que contribuyen a la activación de la apoptosis y necrosis en las células así como a la producción de moléculas proinflamatorias que influyen de manera negativa en la función de los islotes y que pueden tener un efecto perjudicial después del trasplante.⁸⁷

Conforme a diversos estudios, una de las principales vías responsables de las respuestas celulares al estrés que ocurren en las células pancreáticas durante el proceso de aislamiento y después del trasplante es la activación del NF- κ B, que lleva a la activación y liberación de citocinas y quimiocinas proinflamatorias. La activación del NF- κ B también contribuye a la disfunción de los islotes, debido a la amplificación de la cascada de estrés oxidativo. Este efecto puede explicar el aumento de los niveles

plasmáticos de nitritos en los grupos control y Tx-Mel que presentaron una elevación significativa a los 120 min después del trasplante comparados con el Sham ($P= 0.009$ y $P= 0.003$ respectivamente).⁸⁸

De acuerdo con varias publicaciones se ha demostrado que la melatonina inhibe eficientemente la unión del NF- κ B al DNA.⁸⁹ Otros reportes también han demostrado que el bloqueo del NF- κ B protege a las células β del efecto de la IL-1 β que induce la producción de ON.⁸⁶

El grupo Tx-Mel mostró diferencia significativa a los 120 min postrasplante comparado con su basal ($P= 0.021$).

Aunque los grupos control y Tx-Mel presentaron comportamientos similares (gráfica 4), se observó un decremento no significativo a los 3 días en el grupo Tx-Mel, y al igual que el TNF- α se esperaba que continuara disminuyendo.

En resumen, el comportamiento de los niveles de IL-1 β , TNF- α y ON fue muy similar en los grupos Tx-Mel y la tendencia es que a los siete días después del trasplante los niveles de estas moléculas disminuyeron en este grupo. Por lo que concluimos que el periodo de tiempo para este experimento debería incrementarse para así tener un mejor panorama del efecto de melatonina sobre estos mediadores solubles.

En cuanto a la sobrevida del injerto, de acuerdo con los resultados obtenidos en experimentos previos dedujimos que es muy probable que los islotes trasplantados hayan llegado al hígado y desempeñaran su función. En un estudio previamente realizado en el cual no se utilizó melatonina, los resultados mostraron que en el trasplante de islotes aplicados en la circulación intraportal, la funcionalidad y viabilidad fue mejor. Los resultados de los niveles séricos de glucosa, insulina, péptido C y de inmunohistoquímica apoyaron este hecho. Por esta razón no se contempló obligatorio tener los datos de histopatología para esta tesis, es decir, se dió por hecho que los islotes llegaron al hígado y funcionaron. Por lo tanto, los resultados de este trabajo se discutieron en torno a la respuesta inflamatoria e inmune⁹⁰.

En general la melatonina mostró el efecto esperado en las diferentes variables medidas, y entonces siendo los tres metabolitos medidos participantes de la respuesta inflamatoria se pudiera decir que la melatonina fue capaz de controlar esta respuesta. Sin embargo, no se puede afirmar que la melatonina actuó sobre la respuesta inmune ya que no se tuvieron datos de la IL-2 y siete días es un periodo insuficiente para saber si realmente la melatonina es capaz de suprimir la respuesta inmune. Los resultados señalan la conveniencia de continuar la investigación a mayor tiempo y considerando otras variables representantes de la respuesta inmune (como IL-2) y del funcionamiento del injerto en un modelo de diabetes (niveles de glucosa e insulina).

Se ha propuesto que el síndrome de isquemia/reperfusión puede directamente potenciar la activación de las células endoteliales sinusoidales, contribuyendo también a la iniciación de la respuesta inflamatoria no específica; el fenómeno de isquemia/reperfusión también ocurre en el sitio del trasplante seguido de la embolización de los islotes en los capilares presinusoidales.⁸⁶

La manipulación de la activación inmune no específica puede facilitar el aloinjerto de islotes intrahepáticos y la protección de los islotes a través de la inhibición de la producción de TNF- α , IL-1 β y ON por medio de la acción de la melatonina sobre estas tres moléculas.

CONCLUSIÓN

La producción de TNF- α , IL-1 β y ON contribuyen a la compleja red de eventos que finalmente llevan a la pérdida temprana del injerto.

La melatonina exógena disminuye las concentraciones séricas del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 (IL-1 β) y del óxido nítrico (ON).

Aunque se observó una tendencia a la disminución de las citocinas IL-1 β y TNF- α , así como del ON, los resultados de este trabajo no reflejan el efecto de la melatonina en el rechazo agudo. Por lo que es necesario realizar más pruebas que complementen estos resultados.

ABREVIATURAS

Ac.	Ácido
B7-1 o CD80	Es una molécula coestimuladora para los linfocitos T
B7-2 o CD86	Es una molécula coestimuladora para los linfocitos T
CD	<i>Cluster of differentiation.</i>
CPA	Células Presentadoras de Antígeno
CPH	Complejo Principal de Histocompatibilidad
D.O.	Densidad Óptica
ELISA	Análisis de Inmunoabsorción ligado a Enzimas
HBSS	Solución Salina Balanceada de Hanks
HLA	Antígeno Leucocitario Humano
HSR	Respuesta de Hipersensibilidad Retardada
IL	Interleucina
INF- γ	Interferón- γ
ICAM-1	Molécula de Adherencia Intercelular-1
KD	Kilo Daltón
LCT	Linfocitos T citotóxicos
LFA-1	Antígeno asociado a la Función Leucocítica-1
NADPH	Nicotina de Adenina difosfato
NaOH	Hidróxido de Sodio
NaNO ₂	Nitrito de Sodio
NFk-B	Factor Nuclear k-B
NH ₄ Cl	Cloruro de amonio
NK	Células Asesinas Naturales
nM	Nano Moles
ON	Oxido nítrico
rpm	Revoluciones por minuto
TNF- α	Factor de Necrosis tumoral- α
Th	Linfocitos T cooperadores
VLA-4	Moléculas de Activación muy Tardía-1
VCAM-1	Molécula de Adherencia Vascular-1

BIBLIOGRAFÍA

-
- ¹ Atkinson MA., Maclaren NK. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N. England Journal Med.* 1994; 331:1428-1436
- ² American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2005; 28: 37-42
- ³ Wild S., Roglic G., Green A., Sicree R., Ring H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care.* 2004; 27(5): 1047-1053. (Tomado de Diabetes Mellitus en poblacion adulta del IMSS, 2000)
- ⁴ Litvak J. La diabetes mellitus: un desafío para los países de la región, *Boletín de la oficina sanitaria panamericana.* 1975; 281-288
- ⁵ Zarate A., Diabetes Mellitus in México. *Diabetes Care.* 1991;14(3):672-675
- ⁶ Barquera S., Tovar-Guzman V., Campos- Nonato I., Gonzales-Villalpando C., Rivera-Dommarco J. Geografy of Diabetes Mellitus Mortality in Mexico: An epidemiologic transition analysis. *Arch. Med. Res.* 2003; 34(5): 407-414. (tomado de Diabetes Mellitus en poblacion adulta del IMSS, 2000)
- ⁷ Vázquez-Martínez J. L., Gómez-Dantes H., Fernández-Cantón S. Rev. Diabetes Mellitus en población adulta del IMSS: Resultados de la encuesta Nacional de Salud 2000. *Medica Institucional del Seguro Social.* 2006; 44(1): 1326
- ⁸ Afshin S., Muriel N. A review of types 1 and 2 Diabetes Mellitus and their Treatment with insulin. *American Journal of Therapeutics.* 2006; 13(4): 349-361

⁹ Clark Ch., Lee M. Prevention and treatment of the complications of diabetes mellitus. *N England J Med.* 1995;4:1210-1217

¹⁰ The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl J Med.* 1993; 329, 977-986.

¹¹ Kelly WD., Lillehei RC., Merkel FK., Ideziki Y., Goetz F. Allotransplant action of the pancreas and Duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy. 1967. *Surgery* 61: 827-837

¹² Larsen, L.J. Pancreas Transplantation: Indications and Consequences. *Endocrine Review.* 2004; 25(6): 919-946

¹³ Desai M. Niraj., Markmann F. Jannes., Mohana T. Kumar. Transplantation options for type 1 diabetes. *Scientific Communications.* 2003; 100-103

¹⁴ Robertson, PR. Islet Transplantation as a Treatment for Diabetes- A Work in Progress. *New England Journal of Medicine.* 2004; 350(7): 694-703

¹⁵ Edmon A, Rayan; et al. Successful Islet Transplantation: Continued Insulin Reserve Provides Long-Term Glycemic Control. 2002; 51: 2148-2157

¹⁶ Edmond AR; et al. Clinical Outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol. *American Diabetes association.* 2001; 50(4): 710-719

¹⁷ Daval AM. Mass and Replication of porcine and rat islet transplanted into diabetic nude mice. *Diabetes* 1995; 44:104-111

¹⁸ Alejandro R., Lehmann R., Ricordi C., et al. Long-Term function (6 years) of the islet allografts in type 1 diabetes. *American diabetes association* 1997; 46(12): 1983-1989

-
- ¹⁹ Ricordi C, Lacy PE, et al. Automated method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes* 1988, 37(4); 413-420
- ²⁰ Ricordi C, Finke EH, Lacy PE. A method for the mass isolation of islets from the adult pig pancreas. *Diabetes*, 1986, 35(6); 649,653
- ²¹ Shapiro AMJ; Lakey JRT, Ryan EA, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med*. 2000; 343: 230-238
- ²² Moskalewski, S. Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig. *Gen Comp Endocrinol*. 1965; 5: 342
- ²³ Lacy PE, Kostianovsky M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes*, 1967; 16:35
- ²⁴ Nelson, L. Comparison of various sites of islet autotransplantation in the canine model. *Transpl Proc* 1997; 29: 2095
- ²⁵ Miranda-Diaz A, Rodriguez-Reynoso S, Portilla de Buen E, Vazquez-Camacho, Garcia Ma.T, Gomez-Contreras PC, Aguilar-Elias C, Galvez-Gastelum FJ. Trasplante de islotes pancreáticos aplicados en circulación intraportal contra bolsa de epiplon. 2005. Trabajo en proceso de publicación.
- ²⁶ Abbas A.K., Lichtman A.H. Complejo principal de Histocompatibilidad. 2004, pp: 65-80
- ²⁷ Pamer E, Cresswell P. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Annu. Rev. Immunol*. 1998, 16:323-358
- ²⁸ Steinman R.M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunology*. 1991, 9:271-296

-
- ²⁹ Auchincloss H, Sultan H. Antigen processing and presentation in transplantation. *Curr. Op. Immunol.* 1991, 8:681-687
- ³⁰ Auchincloss H. JR., Mayer T., Ghobrial R., Winn HJ. T cell subsets, and the mechanism of allogeneic skin graft rejection. 1989. *Immunol. Res* 8:149-164
- ³¹ Womer KL, Nadim MK, Sayegh MH. T cell recognition of allograft target antigens. *Curr Opin Organ transplant.* 2000, 5; 23-28
- ³² Bevan MJ. Antigen presentation to cytotoxic T lymphocytes in vivo. *J. Exp. Med.* 1995. 182:915-922
- ³³ Lenschow D.J., Waluna T.L., Bluestone J.A. CD28-B7 system of T cell costimulation. *Annu. Rev. Immunol.* 1996, 14: 233-258
- ³⁴ Dallman, M.J. 1995 Cytokines and transplantation: Th1/Th2 regulation of the immune response to solid organ transplants in the adult. *Current Opinion in Immunology* 7, 632-638
- ³⁵ Strom T.B., Roy-Chaudhury P., Manfro R., Zheng X.X., Nickerson P.W., Wood K., Bushell A. The Th1-Th2 paradigm and the allograft response. *Curr. Op. Immunol.* 1996, 8:688-693
- ³⁶ Manilay J., Sykes M. Natural Killer cells and their role in allograft rejection. *Curr. Op. Immunol.* 10:532-538
- ³⁷ Radaev S, P Sun. 2002. Recognition of immunoglobulins by Fcγ receptors. *Molecular immunology* 38:1073-1083
- ³⁸ Cytokines: coordinator and inflammatory responses. 1990; 59, 783-836

-
- ³⁹ Arai K., Lee E., Miyajima A., et al. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Ann Rev Biochem.* 1990, 59:783-836
- ⁴⁰ Pober, J.S., and Contran, R.S. 1990 Cytokines and endothelial cell biology. *Physiological Reviews* 70, 427
- ⁴¹ Dinarello CA. 1988. Biology of interleukin-1. *FASEB J*, 2:108)
- ⁴² Old L.J. Tumor necrosis factor (TNF). 1986. *Science.* 230:630)
- ⁴³ Carswell, E.A., Old, L.J., y Casse, R.L. 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 72,3666-3670
- ⁴⁴ Stadler, J., Bentz, B., Harbrecht, B., Di Silvio, M., Curran, R.D., Billiar, T.R., Hoffman, R., y Simmons, R. (1992). Tumor necrosis factor alpha inhibits hepatocyte mitochondrial respiration. *Annals of surgery*, 21, 539-546
- ⁴⁵ Farney AC., Xenos E., Sutherland DER., et al. Inhibition of pancreatic islet beta cell function by tumor necrosis factor is blocked by a soluble tumor necrosis factor receptor. *Transplant Proc.* 1993; 25:865.
- ⁴⁶ Ignarro L. 1990. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 30, 535-560)
- ⁴⁷ Nussler, A.K., y Billiar, T.R. 1993. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *Journal of Leuk Biol*, 54,171-178)
- ⁴⁸ Doody D. P., Stenger K.S., Winn H.J. Immunological nonspecific mechanism of tissue destruction in the rejection of skin grafts. 1994. *J. Exp. Med.* 179:1645-1652

-
- ⁴⁹ Briscoe D.M., Alexander S.I., Lichtman A.H. 1998. Interactions between T lymphocytes and endothelial cells in allograft rejection. *Curr. Op. Immunol.* 10:525-531
- ⁵⁰ Hayry P. Intragraft events in allograft destruction. *Transplantation.* 1984, 38:1
- ⁵¹ Schmitz, L.M., Bacher, S., and Dienz, O. (2003) NF- κ B activation pathways induced by T cell costimulation. *FASEB* 17, 2187-2193
- ⁵² Kunkel EJ, EC Butcher. Chemoquinas and the tissue-specific migration of lymphocytes. *Immunity* 16: 1-4, 2002
- ⁵³ Hall BM. Cells mediating allograft rejection. *Transplantation.* 1991, 51:1141-1151
- ⁵⁴ Sanfilippo, F., Vaughn, W.k., and Bollinger, R.R. 1982 The comparative effects of pregnancy, transfusions and prior graft rejection on sensation and renal transcription. *FASEB Journal.* 10:709)
- ⁵⁵ Colvin RB. Cellular and molecular mechanisms of allograft rejection. *Ann Rev Med.* 1990, 41:361
- ⁵⁶ Mason Dw., Morris PJ. Effector mechanisms in allograft rejection. *Ann Rev Immunol.* 1986, 4:119
- ⁵⁷ Hutchinson IV. Cellular mechanisms of allograft rejection. *Current Opinion Immunol.* 1991, 3:722
- ⁵⁸ Hegde, S., Beauregard, C., Mayhew, E., Niederkorn, Y.J. (2005) CD4⁺ T cell-mediated mechanisms of corneal allograft rejection: role of Fas-Induced apoptosis. *Transplantation* 79 (1), 23-31

-
- ⁶⁷ Celso A., Munich A. Glucocorticoids inhibitions of lymphokine secretion by alloreactive T lymphocyte clones. *J Immunol.* 1984; 133:784
- ⁶⁸ Wildmann H. Manipulation of T-cell responses with monoclonal antibodies. *Ann Rev Immunol.* 1989; 7:407-444
- ⁶⁹ Whiting, P.H., Woo, J., Adam, B.J., et al. 1991. Toxicity of rapamycin a comparative and study with cyclosporine at immunotherapeutic doseage in the rat. *Tasplantation.* 52,203.
- ⁷⁰ Guerrero, M.J., and Reiter, J.R. (2002) Melatonin-Immune System Relationships. *Current topics in Medical Chemistry* 2 (2): 167-179.
- ⁷¹ Reiter, R.J., Tang L., Garcia, J.J., Munos-Hoyos, A., 1997. Pharmacological actions of melatonin in oxigen radical pathophysiology. *Life Sci.* 60, 2255-2271.
- ⁷² Saco, S., Aqulini, L., Ghezzi, P., Pinza, M., Guglielmotti, A. (1998) Mechanism of the inhibitory effect of melatonin on tumor necrosis factor production in vivo and in vitro. *Journal of Pharmacology* 343, 249-255.
- ⁷³ Carrillo A-V., Calvo JR., Abreu P., et al. Evidence of melatonin system by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and paracrine substance. 2004; 18:537-539
- ⁷⁴ Rodríguez-Reynoso, S., Leal, C., Portilla, E., Olivares, N., and Muñoz, J. (2001) Effect of exogenous melatonin on hepatic energetic status during ischemia-reperfusion: Possible role of TNF- α and nitric oxide. *Journal of surgical Research* 100: 141.
- ⁷⁵ Di Stefano, A., Paulesu, L., 1994. Innhybitory effect of melatonin on production of IFN- γ or TNF- α in peripheral blood mononuclear cells of soime blood donors. *J Pineal Res.* 17,164-169.

⁷⁶ Gilad, E., Wong, H.R., Zingarelli, B., Virag, L., O'Connor, M., Salzman, A.L., and Csabó C. (1998) Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: role of inhibition of NFκ-B activation. *FASEB Journal* 12, 685-693.

⁷⁷ Eugui EM., DeLustro B., Rouhafza S., et al. Some antioxidants inhibit, in a coordinate fashion, the production of TNF;alpha, IL-1beta and IL-6 by human peripheral blood mononuclear cells. *Int. Immunol.* 1994; 6: 409-422.

⁷⁸ 76.- Shaji, A.V., Kulkarni, S.K., Agrewala, J.N. (1998) Regulation of secretion of IL-4 and IgG1 isotype by melatonin-stimulate ovalbumin specific T cells. *Clin. Exp. Immunology* 111(1),181-185.

⁷⁹ Garcia-Maurino S, Gonzalez-Haba MG.,et al. Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gamma production by human circulating CD4 cells: a possible nuclear receptor mediated mechanisms involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. *J Immunol.* 1997;159:574-581

⁸⁰ Morear, A.L., Henry,M., and De La Varga. (2001) Seguridad en el uso de la melatonina. *Actas Esp Psiquiatr* 29(5), 334-337.

⁸¹ John CP. *Handbook of Diabetes*, 2004,Massachusetts, Oxford

⁸² Salama AD., RemuzziG., et al. Challenges to achieving clinical transplantation tolerance. *J Clin Invest.* 2001; 108:943-948

⁸³ Bottino, R., Fernandez, L.A., Ricordi, C., Lehmann, R., Tsan, M-F., Oliver. 1998. Transplantation of allogeneic islet of Langerhans in the rat liver: Effect of macrophage depletion on graft survival and microenvironment activation. *Diabetes.* 4:316-323

-
- ⁸⁴ Shi, X., Dong, Z., Huang, C., Ma, W., Liu, J., et al. 1999. The role of hydroxyl radical as a messenger in the activation of nuclear transcription factor NFκB. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 194:63-70.
- ⁸⁵ Clemens, J.A., (2000). Cerebral ischemia: gene activation, neuronal injury, and the protective role of antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*. 28,1523-1531
- ⁸⁶ Bonilla, E., Valero, N., Chacin-Bonilla, L., Pons, H., et al. (2003) Melatonin increases interleukin-1 (beta) and decreases tumor necrosis factor alpha in the brain of mice infected with the Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *Neurochemical Research* 28, 681-686.
- ⁸⁷ Fernandez, L.A., Ricordi, C., Lehmann, R., Bottino, R., Tsan, M-F., Oliver, 1998. Transplantation of allogeneic islet of Langerhans in the rat liver: Effect of macrophage depletion on graft survival and microenvironment activation. *Diabetes*. 47:316-323
- ⁸⁸ Balamurugan, A.N., Bottino, R., Tse, H., et al. 2004. Response of human islet to isolation stress and the effect of antioxidant treatment. *Diabetes* 53:2559-2568
- ⁸⁹ Chuang, J.I., Mohan, N., Meltz, M.L., Reither, R.J. 1996. Effect of melatonin on NFκB DNA-binding activity in the rat spleen. *Cell. Biol. Int.* 20, 687-692.
- ⁹⁰ Miranda-Diaz A, Rodriguez-Reynoso S, Portilla de Buen E, Vazquez-Camacho, Garcia Ma.T, Gomez-Contreras PC, Aguilar-Elias C, Galvez-Gastelum FJ. 2005.