



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

---

---

**POSGRADO EN CIENCIAS  
BOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**“PARTICIPACION DE LA RESPUESTA INMUNOLOGICA EN  
LA RECUPERACION DE LAS CELULAS BETA DEL  
PANCREAS INDUCIDA POR SILYMARINA EN UN  
MODELO MURINO DIABETES TIPO I”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**(ORIENTACION)**

**(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)**

**PRESENTA:**

**BIOL. CESAR ANTONIO ORTIZ MARTINEZ**

**DIRECTORA DE TESIS: DRA. ANAHI CHAVARRIA KRAUSER**

**MÉXICO, D.F.**

**NOVIEMBRE 2007**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo de tesis fue realizado en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Química y en el Laboratorio de Neuroinmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Anahí Chavarria Krauser y del Comité Tutoral: Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes y Dra. Maria Cristina Fernández Mejía. Durante el desarrollo de esta tesis se contó con una beca otorgada por el CONACYT con No de registro: 199360. Parte del trabajo fue apoyado con proyectos con No de registro: IN210605, IN205407 y con el proyecto del programa de fortalecimiento PFAMU con No de registro: PI200306.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Anahí Chavarria Krauser por su asesoría, enseñanza, paciencia, apoyo y sobre todo por su amistad, gracias.

A los miembros del Comité Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes y Dra. Maria Cristina Fernández Mejía. Gracias por su dirección y sus valiosas sugerencias durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes por abrirme las puertas de su Laboratorio. Por sus consejos y enseñanzas.

Al Dr. Ruy Pérez Tamayo por recibirnos en su Laboratorio. Por todo el apoyo brindado durante la realización de este proyecto.

A los Miembros del Jurado:  
Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes  
Dra. Marcia Hiriart Urdanivia  
Dra. Anahi Chavarria Krauser  
Dr. Guillermo Robles Diaz  
Dra. Maria Cristina Fernández Mejía  
Por su interés, tiempo y sus comentarios.

Al Jefe del Bioterio Ricardo Vargas y al MVZ. Daniel Sánchez por el apoyo brindado en el cuidado de los ratones.

A los integrantes del Departamento de cómputo, Tec. En Sist. Marco Gudiño e Ing. Omar Agni por su apoyo en la impresión de esta tesis.

A mis compañeros del Laboratorio: Jesús, Carlos, Miguel y Ernesto. Gracias por su amistad, consejos y apoyo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi alma mater y por la excelente formación que me ha brindado a lo largo de mi carrera profesional.

## **DEDICATORIA**

En memoria de mi Mamá:

Con todo el amor y agradecimiento que le tengo, por darme la oportunidad de crecer a su lado, por sus consejos y enseñanzas que me guiarán por siempre.

En memoria de mi Tía Leonor:

Por haberme apoyado cuando lo necesite, por sus consejos y por haberme permitido crecer junto a Alejandro.

A Valeria:

Por ser mi principal fuente de motivación y por ser lo mejor que me ha pasado en la vida.

A Daniel:

Por arrancarme la risa, con todo el cariño y amor que te tengo.

A Marlen:

Gracias por estar a mi lado, en los buenos y malos momentos, por tus consejos, apoyo y comprensión y sobre todo por el amor que existe entre nosotros. Te has convertido en parte de mi vida y espero que continúe así por mucho mas tiempo....**Te quiero mucho!!!!**.

A mi hermana Bárbara:

Por la suerte de haber compartido a mama, por la suerte de crecer a tu lado, por el apoyo incondicional que me das.

## INDICE

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCION</b>	5
	<b>1. Páncreas</b>	5
	1.1. <i>Páncreas exocrino</i>	5
	1.2. <i>Páncreas endocrino</i>	6
	1.2.1. <i>Síntesis y secreción de la insulina</i>	7
	1.2.2. <i>Regulación de la secreción de la insulina</i>	7
	<b>2. Diabetes Mellitus</b>	8
	<b>3. Diabetes Mellitus tipo 1</b>	8
	<b>4. Incidencia</b>	11
	<b>5. Fisiopatología</b>	11
	5.1. <i>Factores Genéticos</i>	11
	5.2. <i>Factores Ambientales</i>	13
	5.3. <i>Factores Inmunológicos</i>	14
	5.4. <i>Factores que participan en la destrucción de las células <math>\beta</math></i>	16
	5.4.1. <i>Citocinas</i>	17
	5.4.2. <i>Radicales libres de oxígeno y óxido nítrico</i>	18
	5.4.3. <i>Receptores Fas</i>	19
	5.5. <i>Deficiencia de la insulina en la DMT1</i>	20
	<b>6. Terapia Farmacológica</b>	21
	6.1. <i>Insulina</i>	22
	6.2. <i>Fármacos Inmunosupresores</i>	23
	6.3. <i>Transplante de Páncreas</i>	23
	6.4. <i>Inducción de Tolerancia</i>	24
	6.5. <i>Citocinas y anticuerpos</i>	25
	<b>7. La silymarina</b>	26
	7.1. <i>Efecto antioxidante, hepatoprotector y citoprotector</i>	28
	7.2. <i>Efecto anticarcinogénico</i>	29
	7.3. <i>Efecto antiviral</i>	31
	7.4. <i>Efecto Inmunomodulador</i>	32
<b>II.</b>	<b>JUSTIFICACION</b>	35
<b>III.</b>	<b>HIPOTESIS</b>	36
<b>IV.</b>	<b>OBJETIVO GENERAL</b>	36
<b>V.</b>	<b>OBJETIVOS ESPECIFICOS</b>	36
<b>VI.</b>	<b>MATERIALES Y METODOS</b>	39
	<b>1. Animales</b>	39
	<b>2. Tratamiento con silymarina</b>	39
	2.1. <i>Ratones ICR</i>	39
	2.2. <i>Ratones NOD</i>	40
	2.2.1 <i>NOD prediabéticos</i>	40
	2.2.2 <i>NOD diabéticos de reciente inicio</i>	40
	<b>3. Inmunohistoquímica</b>	40
	<b>4. Evaluación de la insulinitis</b>	42
	<b>5. Determinación de los niveles de glucosa</b>	42
<b>VII.</b>	<b>RESULTADOS</b>	43
	<b>1. Ratones ICR</b>	43
	1.1. <i>Expresión basal de citocinas en condiciones fisiológicas</i>	43

1.2. <i>La modulación de las citocinas anti-inflamatorias se da principalmente en el tratamiento a largo plazo</i>	44
1.3. <i>La silymarina incrementa la expresión de insulina</i>	46
<b>2. Ratones NOD prediabéticos</b>	47
2.1. <i>La silymarina disminuye los niveles de glucosa y afecta la sobrevivencia</i>	47
2.2. <i>La silymarina disminuye el daño</i>	48
2.3. <i>El tratamiento con silymarina modula la expresión de citocinas inflamatorias</i>	50
2.4. <i>La silymarina incrementa la expresión de TGF<math>\beta</math></i>	50
2.5. <i>La silymarina incrementa la expresión de insulina</i>	50
<b>3. Ratones NOD diabéticos</b>	54
3.1. <i>El tratamiento con silymarina reduce los niveles de glucosa sérica e incrementa la sobrevivencia de los ratones NOD diabéticos</i>	54
3.2. <i>La silymarina reduce el daño a los Islotes de Langerhans</i>	55
3.3. <i>La expresión de citocinas inflamatorias disminuye con silymarina a largo plazo</i>	57
3.4. <i>La silymarina induce la expresión de IL10 y TGF<math>\beta</math> en el tejido pancreático</i>	57
3.5. <i>La silymarina induce la expresión de IL10 y TGF<math>\beta</math> en células del infiltrado inflamatorio</i>	60
3.6. <i>La expresión de insulina es mayor en los ratones tratados</i>	62
<b>VIII. DISCUSION</b>	63
<b>IX. CONCLUSIONES</b>	68
<b>X. PERSPECTIVAS</b>	69
<b>XI. BIBLIOGRAFIA</b>	70

## RESUMEN

La diabetes mellitus es un problema de salud pública en México que genera altos costos al sistema de salud. En México la diabetes tipo 1 corresponde al 5-10% de los casos con diabetes mellitus y la prevalencia estimada en la población menor de 14 años es del 2.6%.

La diabetes mellitus tipo 1 es una enfermedad sistémica y crónica causada por una deficiencia en la secreción de la insulina y se caracteriza por la elevación anormal de la glucosa sérica. Tanto los factores ambientales, los factores genéticos como los factores inmunológicos contribuyen a la destrucción de las células  $\beta$  del páncreas. La respuesta inmunológica tiene un papel fundamental al generar una reacción inflamatoria tipo Th1 mediada por linfocitos T CD4+ y CD8+ autoreactivos, macrófagos, células natural killer, linfocitos B y autoanticuerpos dirigidos contra los islotes pancreáticos, la insulina y la descarboxilasa del ácido glutámico.

Hasta el momento, el manejo terapéutico de la diabetes tipo 1 se ha limitado principalmente a la administración de insulina y al control de la glucosa sérica, pero no al restablecimiento de la función del páncreas, por lo que los estudios destinados a modular la respuesta inmunológica y/o restablecer la función pancreática adquieren una gran importancia. La silymarina, un flavonoide obtenido de la planta *Silybum marianum*, tiene propiedades inmunomoduladoras en el bazo de ratones normales. También se ha observado que favorece los perfiles de tipo Th2 y que ayuda a recuperar la función pancreática en un modelo de diabetes farmacológica. Estas propiedades de la silymarina resultan ser de gran interés en el manejo terapéutico integral de la diabetes mellitus tipo 1. Finalmente, se vuelve de gran relevancia explorar estas propiedades en los tratamientos a largo plazo dado que la diabetes es una enfermedad crónica.

El objetivo de este trabajo de tesis fue evaluar la modulación de la respuesta inmunológica en el tejido pancreático de ratones normales ICR; así como su modulación y participación en la recuperación de la función de las células  $\beta$  del páncreas en ratones NOD prediabéticos y diabéticos de reciente inicio inducidas por el tratamiento a largo plazo con silymarina.

Nuestros resultados mostraron que los ratones ICR tratados con 250 mg/kg de silymarina a corto plazo presentaron un incremento en la expresión de MHCII, IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ , tanto en el tejido acinar como en los islotes, mientras que la IL10 únicamente se incrementó en los islotes de Langerhans. En contraste, los ratones tratados a largo plazo presentaron una

disminución de la expresión de MHCII, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  y un incremento importante de las citocinas antiinflamatorias (IL4, IL10 y TGF $\beta$ ) tanto en el tejido acinar como en los islotes. Mientras que la expresión de insulina incrementó significativamente únicamente en el tratamiento a largo plazo.

Los ratones NOD prediabéticos tratados presentaron una reducción en los niveles normales de glucosa, menor número de islotes con daño grado IV y menor sobrevida con respecto a los ratones prediabéticos no tratados. Los niveles de expresión de MHCII, IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  no mostraron diferencias en los acinos pancreáticos con respecto a los ratones no tratados, sin embargo la expresión de MHCII e IFN $\gamma$  incrementó en los islotes de Langerhans. De igual forma, los niveles de expresión de las citocinas anti-inflamatorias tampoco mostraron cambios en el tejido pancreático, sólo se observó un incremento en la expresión de TGF $\beta$  tanto en acinos como en islotes pancreáticos. Por otro lado, los niveles de expresión de insulina incrementaron significativamente en los ratones prediabéticos tratados con respecto a los no tratados.

Los ratones NOD diabéticos tratados presentaron por un lado niveles más bajos de glucosa sérica, menor número de islotes con daño grado IV y mayor sobrevida con respecto a los ratones diabéticos no tratados. En cuanto a la expresión de citocinas en el tejido pancreático, los ratones diabéticos tratados presentaron niveles similares de MHCII, IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  en los acinos pancreáticos con respecto a los ratones no tratados, sin embargo MHCII e IFN $\gamma$  se expresaron en menor cantidad en los islotes pancreáticos. Asimismo, el tratamiento a largo plazo en los ratones diabéticos indujo una mayor expresión de las citocinas antiinflamatorias tanto en los acinos como en los islotes pancreáticos. Los ratones diabéticos tratados presentaron una mayor expresión de insulina con respecto a los ratones diabéticos no tratados.

Estos resultados en conjunto, sugieren una modulación de la respuesta inmunológica y un efecto citoprotector inducidos por silymarina. Estas propiedades podrían estar influyendo no sólo en el control de la inflamación sino también en la inducción de citocinas antiinflamatorias, de células T reguladoras y/o células con un perfil TH2, de esta manera regular el daño a las células  $\beta$  y conservar su función. Estas propiedades inmunomoduladoras y citoprotectoras de la silymarina resultan ser de gran interés en el manejo terapéutico integral de la diabetes mellitus tipo 1, lo que podría llevar a la reducción

de las complicaciones asociadas a la diabetes mellitus y por lo tanto no sólo disminuir los costos para el sistema de salud sino mejorar la calidad de vida de los pacientes diabéticos tipo 1.

## **ABSTRACT**

The diabetes mellitus is a public health problem in Mexico that generates high costs to the health system. In Mexico diabetes mellitus type 1 patients correspond to 5-10% of the cases with diabetes mellitus and the prevalence in the population under 14 years is 2.6%. The diabetes mellitus type 1 is a systemic and chronic disease caused by the deficiency of insulin secretion and it is characterized by abnormal elevation blood glucose. Environmental, genetic as well immunological factors contribute to the destruction of the pancreatic beta cells. The immunological response has a fundamental participation generating a Th1 inflammatory response by autorreactive T CD4+ and CD8+ lymphocytes, macrophages, natural killer cells, B lymphocytes and autoantibodies directed against pancreatic islets, insulin and glutamic acid descarboxilase. Until the moment the principal therapeutic management of the diabetes type 1 has been limited mainly to insulin administration and control of blood glucose, but not to reestablish the pancreatic function, this is the main reason why studies destined to modulate the immunological response and/or restore the pancreatic function acquire a great relevance. Silymarin, a flavonoid of the plant *Silybum marianum*, has immune- modulatory properties in spleen lymphocytes of normal mice. It has also been observed that silymarin induces Th2 profiles and helps to recover the pancreatic function in a pharmacological model of diabetes type 1. These properties of the silymarina turn out to be of great interest in the integral therapeutic handling of diabetes mellitus type 1 patients. Finally, it becomes of great relevance to explore these properties in long term treatments since diabetes is a chronic disease.

The objective of this thesis was to evaluate the modulation of the immune response in the pancreatic tissue of normal ICR mice; as well its modulation and participation in the recovery of the beta cells function in pre-diabetic and diabetic NOD mice induced by long term treatment with silymarin. Our results showed that ICR mice short term treatment dealt with 250 mg/kg of silymarin displayed an increase in MHCII, IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  expression

in the acinar and islet tissue, whereas IL10 was increased only in the Langerhans islets. In contrast, long term treated mice displayed a decrease of MHCII, IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  expression and an important increase of anti-inflammatory cytokines (IL4, IL10 and TGF $\beta$ ) as much in the acinar as in the islets. Whereas, insulin expression significantly increased only in long term treated mice.

Treated pre-diabetic NOD mice presented reduced blood glucose levels, less islets with degree IV damage and less survival when compared to controls. The levels of MHCII, IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  expression did not show differences in the pancreatic acini when compared with the control group, nevertheless MHCII and IFN $\gamma$  expression was increased in the Langerhans islets of treated mice. Similarly, the levels of anti-inflammatory cytokines did not show differences in the pancreatic tissue, and only an increase in the expression of TGF $\beta$  was observed in pancreatic acini and islets. On the other hand, the levels of insulin expression were significantly increased in the treated pre-diabetic mice when compared to the control group.

Treated diabetic NOD mice displayed lower blood glucose levels, less islets with degree IV damage and better survival when compared to the control group. Treated diabetic mice presented similar levels of MHCII, IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  in the pancreatic acini when compared to non treated mice, nevertheless MHCII and IFN $\gamma$  were less expressed in the Langerhans islets. In addition, long term treatment in diabetic mice induced a higher expression of anti-inflammatory cytokines in pancreatic acini and islets. Treated diabetic mice displayed a higher insulin expression when compared with the diabetic control group. These results altogether suggest that silymarin modulates the immune response and has an additional cytoprotection effect. These properties could be influencing not only the control of inflammation but also the induction of anti-inflammatory cytokines, of regulatory T cells and/or TH2 cells, and in this way regulate the beta cells damage and preserve their function. These immune-modulatory and cytoprotective properties of silymarina turn out to be of great interest in the integral therapeutic handling of the diabetes mellitus type 1, which could lead to reduced complications associated to diabetes mellitus and therefore not only diminish the costs for the public health system but also improve the quality of life of the diabetic patients type 1.

## **I. INTRODUCCIÓN**

### **1. PANCREÁS.**

El páncreas está situado en la porción superior del abdomen, delante de la columna vertebral, detrás del estómago, entre el bazo y el asa duodenal, que engloba en su concavidad todo su extremo derecho. El páncreas es un órgano alargado dividido en tres partes: cabeza, cuerpo y cola. La cabeza se encuentra unida al duodeno, mientras que el cuerpo cruza la línea media del organismo y la cola se extiende hacia el bazo. El conducto principal pancreático recorre toda la glándula y desemboca en la segunda porción del duodeno, en la ámpula hepatopancreática de Vater (Ross 5<sup>ta</sup> Ed. 2007).

El páncreas es una glándula mixta que se divide en dos porciones, la porción endocrina y la exocrina. La porción exocrina del páncreas secreta un componente acuoso, rico en bicarbonato, que neutraliza el contenido duodenal y un contenido enzimático que ayuda a la digestión de carbohidratos, proteínas y grasas. La secreción exocrina del páncreas está regulada por los estímulos nerviosos y los hormonales dependientes de ácido y de moléculas que son productos de la digestión en el duodeno. Se sabe que la secretina participa en la secreción del componente acuoso mientras que la colecistoquinina estimula la secreción de las enzimas pancreáticas (Konturek et al., 2003).

La porción endocrina del páncreas se encuentra agrupada en islotes. Aunque los islotes constituyen menos del 2% del volumen del páncreas su secreción hormonal es fundamental para regular el metabolismo. La insulina, el glucagon, la somatostatina y el polipéptido pancreático son hormonas liberadas por las células de los islotes de Langerhans (Ross 5<sup>ta</sup> Ed. 2007).

La inervación del páncreas corre a cargo de las ramas preganglionares parasimpáticas del vago. Las fibras vagales hacen sinapsis con las neuronas colinérgicas que se encuentran en el interior del páncreas y que inervan tanto las células acinares como las de los islotes. Los nervios simpáticos postganglionares de los plexos celíaco y mesentérico superior inervan los vasos sanguíneos pancreáticos. La secreción de las enzimas pancreáticas y de la insulina es estimulada por la actividad del parasimpático e inhibida por la del simpático (Mayoral., 1<sup>a</sup> Ed. 1998).

#### ***1.1. Páncreas exocrino.***

La mayor parte del páncreas está formado por el tejido exocrino que libera enzimas hacia el duodeno. El tejido exocrino está constituido por células acinares (aproximadamente 84%), centroacinares y ductales (5%) (Konturek et al., 2003). Las células acinares sintetizan y secretan

enzimas digestivas como endopeptidasas y exopeptidasas proteolíticas, amilolíticas, lipasas y nucleolíticas. Estas enzimas son secretadas de forma inactiva en gránulos de secreción (zimógenos), localizados en la parte subapical de las células acinares. Los zimógenos son secretados al duodeno, donde son activados por las enzimas enterocinasas y la tripsina (Ross 5<sup>ta</sup> Ed. 2007).

La liberación enzimática es estimulada por varios secretagogos incluyendo neurotransmisores como acetilcolina, óxido nítrico y neuropéptidos como el péptido liberador de gastrina y el péptido intestinal vasoactivo (Koturek et al., 2003). Los receptores para estas moléculas se encuentran en la membrana basolateral de las células acinares, mientras que la región apical presenta microvellosidades que facilitan la exocitosis de los gránulos de zimógeno (Gorelick and Jamieson, 1994).

### ***1.2. Páncreas endocrino.***

El páncreas endocrino comprende el 1% del páncreas y secreta varias hormonas que regulan la concentración de la glucosa en sangre. Está conformado por agrupaciones celulares llamadas islotes de Langerhans que son de forma variable y se encuentran distribuidos en todo el órgano (Ross 5<sup>ta</sup> Ed. 2007). Los islotes de Langerhans están constituidos principalmente por cuatro tipos celulares: las células  $\alpha$ , las células  $\delta$ , las células PP y las células  $\beta$ . Las células  $\alpha$  se encuentran en la periferia del islote y constituyen entre el 15 y 20 % de las células del islote. Las células  $\alpha$  secretan la hormona glucagon, cuando las concentraciones de glucosa sérica disminuyen (Quesada et al., 2006).

Las células  $\delta$  representan el 10 % de las células del islote. Las células  $\delta$  secretan somatostatina, una hormona reguladora de la secreción de insulina y glucagon en los islotes (Quesada et al., 2006). Las células PP representan sólo el 3% de la población celular en el islote. Este tipo celular se encuentra principalmente en los islotes de Langerhans localizados en la cabeza del páncreas (Aguayo-Mazzucato et al., 2006). Las células PP secretan polipéptido pancreático en respuesta al incremento de nutrientes e inhibe la secreción de enzimas pancreáticas (Liu et al., 1999). Adicionalmente, el polipéptido estimula las células principales gástricas, inhibe la secreción de bilis y la motilidad intestinal e inhibe la secreción de bicarbonato de sodio (Ross 5<sup>ta</sup> Ed. 2007). También pueden secretar el neuropéptido Y (Koturek et al., 2003).

Las células  $\beta$  constituyen el 80 % de las células de los islotes y se localizan en el centro del mismo. Las células  $\beta$  sintetizan y secretan insulina en respuesta a los niveles elevados de glucosa

en sangre para restaurar los niveles normales (Quesada et al., 2006). La insulina es la secreción endocrina más abundante. Sus principales efectos se ejercen en el hígado, el músculo esquelético y el tejido adiposo, ya que induce la entrada de la glucosa en estos tejidos (Ross 5<sup>ta</sup> Ed. 2007). Además, las células  $\beta$  sintetizan el ácido gama amino butírico, el principal neurotransmisor que inhibe el sistema nervioso central (Sorenson et al., 1991).

### ***1.2.1. Síntesis y secreción de la insulina***

Las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos sintetizan insulina a partir de un precursor de cadena única de 110 aminoácidos (preproinsulina). La insulina en su forma madura esta compuesta de dos cadenas: la cadena  $\alpha$  formada por 21 aminoácidos y la cadena  $\beta$  de 30 aminoácidos. Ambas cadenas se sintetizan como parte de una sola proteína precursora, la preproinsulina, que contiene una secuencia de aminoácidos que las une, llamada péptido C y un péptido señal. Después de su translocación a la membrana del retículo endoplásmico rugoso, el péptido señal amino-terminal de 24 aminoácidos de la preproinsulina es translocado al lumen del retículo endoplásmico rugoso y se reanuda la traducción de la preproinsulina (De Meyts, 2004; Ionescu-Tîrgoviște et al., 2007). Durante este proceso, el péptido señal es removido por la peptidasa de señal formando así la proinsulina. Posteriormente, la molécula se pliega y se forman enlaces disulfuro para migrar al aparato de Golgi. Una vez en el Golgi, la proinsulina es agregada en gránulos de secreción, los cuales transportan a la proinsulina hacia la membrana plasmática. Durante el transporte, la proinsulina es convertida a insulina mediante la proteólisis de cuatro aminoácidos básicos y el conector restante o péptido C. Este proceso libera el péptido C de la insulina. Los gránulos secretores contienen además enzimas que participan en la maduración de la insulina y hormonas como la amilina (Gebre-Medhin et al., 2000). Por cada molécula de insulina secretada, una molécula del péptido C también se secreta. En la DMT1 los niveles de péptido C se pueden medir y usar como indicador para evaluar si las altas concentraciones de glucosa sanguínea son debido a una reducción en la producción y secreción de la insulina.

### ***1.2.2. Regulación de la secreción de la insulina.***

La regulación está mediada por diversos factores como nutrientes, hormonas gastrointestinales, hormonas pancreáticas y neurotransmisores del sistema nervioso autónomo. La glucosa, aminoácidos como la arginina y leucina, los cetoácidos y los ácidos grasos inician la secreción de insulina dependiendo de su concentración. El glucagon, la secretina, la pancreozimina, el péptido inhibidor gástrico y la acetilcolina potencian la secreción de la insulina, a través de la

activación de la adenilciclase e incrementan la concentración de AMP cíclico que a su vez activa a cinasas dependientes de AMP (Bastarrachea et al., 2005).

Los neurotransmisores como la adrenalina, noroadrenalina y somatostatina actúan como inhibidores de la secreción de la insulina. Ejercen su efecto modulando el metabolismo del inositol de la membrana, generando diacilglicerol y activando las proteínas cinasas. El sistema nervioso autónomo es un importante modulador de la secreción de la insulina. El parasimpático estimula la secreción de insulina mientras que el simpático la inhibe. El efecto adrenérgico es complejo, ya que la estimulación de los receptores  $\alpha$  inhibe la secreción mientras que los receptores  $\beta$  la incrementan (Konturek et al., 2003). Asimismo, se ha demostrado que ciertos neurotransmisores como el factor de crecimiento neuronal también regulan la secreción de insulina a través de una conexión autocrina/paracrina tanto en las células  $\beta$  de rata y de humano (Rosenbaum et al., 2001; Vidaltamayo et al., 2003).

La deficiencia en la secreción de la insulina altera la homeostasis de la glucosa lo que genera enfermedades metabólicas severas como la diabetes mellitus tipo 1, generada por la destrucción autoinmune de las células  $\beta$ , y la diabetes mellitus tipo 2, generada por la resistencia a la insulina. Este trabajo de tesis está enfocado a la diabetes mellitus tipo 1.

## **2. Diabetes Mellitus.**

La diabetes mellitus (DM) fue descrita hace más de dos mil años, la primera mención de la enfermedad se encuentra en un manuscrito de la cultura Egipcia correspondiente al siglo XV antes de Cristo. Sin embargo, fue hasta el siglo pasado que inició la investigación en la caracterización bioquímica de esta enfermedad, con el descubrimiento de la insulina se demostró que era necesaria para mantener los niveles normales de glucosa en sangre (Harris M y Zimmet P., 1997).

La DM es una enfermedad metabólica caracterizada por niveles elevados de glucosa en sangre e intolerancia a la glucosa como consecuencia de una deficiencia en la secreción de insulina, resistencia a la insulina o ambas (Harris M y Zimmet P., 1997). Los efectos de la DM incluyen el daño, la disfunción y falta de la función de varios órganos como ojos, riñones, corazón y vasos sanguíneos. La DM presenta síntomas característicos como poliuria, polifagia, polidipsia, pérdida progresiva de peso, pérdida de la visión y procesos infecciosos de repetición. En sus formas más severas puede presentar cetoacidosis o un estado hiperosmolar no cetónico

que puede conducir a estupor, coma diabético y en ausencia de tratamiento eficaz a la muerte. A largo plazo la DM lleva al desarrollo progresivo de complicaciones específicas como retinopatía, nefropatía que puede conducir a la falla renal y/o a neuropatía con el riesgo de presentar úlceras en pies con la consecuente amputación de la extremidad y la disfunción autonómica, incluyendo la disfunción sexual. Adicionalmente, los pacientes diabéticos están en riesgo de presentar enfermedades cardiovasculares prematuras y cerebro vasculares (Harris M y Zimmet P., 1997).

La DM se clasifica por los diversos procesos patológicos involucrados en el desarrollo de la enfermedad. Estos incluyen los procesos que dan lugar a la resistencia de la acción de la insulina o a una deficiencia en la secreción (Diabetes mellitus tipo 2), en los que se identifica por primera vez la hiperglicemia durante el embarazo (Diabetes gestacional), y los procesos autoinmunes que destruyen las células  $\beta$  del páncreas con la consecuente deficiencia de insulina (Diabetes mellitus tipo 1), entre otros tipos de diabetes (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de la Diabetes Mellitus.

Tipo de Diabetes	Etiología
Tipo 1	Destrucción de células $\beta$ mediada por autoinmunidad, se presenta entre los 5 y 20 años de edad.
Tipo LADA (Latent Autoimmune Diabetes in Adults)	Es una variante de la diabetes tipo 1, caracterizada por una destrucción lenta de las células $\beta$ y se presenta en adultos.
Tipo 2	Resistencia y defectos en la secreción de la Insulina.
Tipo MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young)	Es un subtipo heterogéneo de diabetes mellitus tipo 2 que se presenta por una alteración genética antes de los 25 años.
Gestacional	La hiperglucemia se identifica por primera vez durante el embarazo.

### 3. Diabetes Mellitus tipo 1

La diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) fue denominada autoinmune en 1974 cuando un suero de pacientes con enfermedad poliendocrina autoinmune, incluyendo DM, presentó anticuerpos contra las células de los islotes pancreáticos. También se observó la presencia de un infiltrado linfocítico en los islotes pancreáticos llamándose a este proceso inflamatorio “insulinitis” (Bottazzo et al., 1974).

La DMT1 es más común en niños, adolescentes y adultos jóvenes; presentándose con una mayor frecuencia entre los 5 y 20 años de edad, pero puede presentarse incluso después de los cuarenta años de edad. En la mayoría de los casos, la DMT1 se presenta entre los 9 y 13 años de edad. Es una excepción que se presente durante el primer año de vida, el porcentaje en este caso es menor del 1%, también es relativamente rara entre los dos y siete años (menos del 20%), y ocurre en igual porcentaje después de los 15 años (Barcelo et al., 2001).

Existen varios procesos patogénicos involucrados en el desarrollo de la DMT1, uno de ellos es la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  del páncreas con la subsiguiente pérdida de la secreción de insulina, por lo que los pacientes presentan hiperglicemia, por estas características la administración de insulina es esencial.

En la DMT1 el grado de destrucción de las células  $\beta$  del páncreas es variable, ya que inicia rápidamente en algunos individuos y de manera lenta en otros (Zimmet et al., 1994). La progresión rápida se presenta comúnmente en niños pero también puede ocurrir en los adultos (Humphrey et al., 1998). La progresión lenta generalmente se presenta en adultos y se nombra diabetes autoinmune latente de adultos (LADA, por sus siglas en inglés).

Algunos pacientes, particularmente niños y adolescentes, presentan cetoacidosis como primera manifestación de la enfermedad (Japan and Pittsburgh Childhood Diabetes Research Groups). Otros presentan hiperglicemia moderada que puede cambiar rápidamente a hiperglicemia severa y/o cetoacidosis en presencia de algún tipo de infección. En contraste, los adultos pueden llegar a conservar algunas células  $\beta$  funcionales, las suficientes para prevenir la cetoacidosis por muchos años (Zimmet PZ, 1995). Sin embargo, todos los pacientes con DMT1 dependen de la administración de insulina para su supervivencia ya que sin ella corren el riesgo de desarrollar hiperglicemias y cetoacidosis con la consecuente muerte (Willis et al., 1996).

## 4. Incidencia

Actualmente la DM es un problema de salud pública por su alta frecuencia, su alta prevalencia, morbilidad, mortalidad y por los altos costos que genera su tratamiento.

La DM afecta mundialmente a 194 millones de personas (International Federation of Diabetes). Aproximadamente del 5-10 % de los pacientes diabéticos corresponden a la DMT1. En el mundo hay un total de 1.8 millones de diabéticos tipo 1 (International Federation of Diabetes).

Las cifras de incidencia de DMT1 varían ampliamente en diversos países. En los países de Norte América como Estados Unidos y Canadá se reporta una incidencia anual del 10% (Diabetes Epidemiology Research International Group, 1988; Blanchard et al., 1997). Mientras que los países de América latina en general no rebasan la incidencia anual del 5%, únicamente en Puerto Rico se ha reportado una incidencia del 6.4% (Karvonen et al., 2000; Fraser et al., 1998). En contraste, en países como Finlandia y Cerdeña presentan una incidencia elevada del 30 al 40%, así como en Suecia se ha reportado una incidencia anual del 25%, y en países como Japón y China se reportan la incidencia anual del 1% (Green et al., 1990). Por otro lado, en un estudio epidemiológico realizado en la población de origen africano del caribe se reportó una incidencia del 10.1%; se considera que la alta incidencia es debido a las mezclas genéticas con europeos así como a la exposición de factores ambientales (Fraser et al., 1998).

En México como ocurre en casi todo el mundo, la incidencia de la enfermedad es muy baja (1.5 casos por 100 mil por año). Los primeros reportes epidemiológicos confiables datan a partir de 1984, hasta ese año se reportaba una incidencia menor del 2%, entre la población de 0 a 14 años. Fue hasta 1995 que se reportó un incremento en la incidencia del 2.6% entre la población de 0 y 14 años de edad (Federación Mexicana de Diabetes; International Federation of Diabetes).

## 5. Fisiopatología

La DMT1 es una enfermedad multifactorial donde participan tanto los factores genéticos, los inmunológicos como los factores ambientales.

### 5.1. Factores Genéticos.

Los estudios genéticos permiten estudiar de manera eficaz la susceptibilidad a la aparición de diversas enfermedades autoinmunes como la DMT1. Se ha demostrado que la predisposición genética es uno de los factores más importantes en la aparición de esta enfermedad.

Las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) están presentes en todas las especies de vertebrados estudiadas hasta la fecha. En humanos se denomina antígeno de leucocitos de humano (HLA) por haber sido encontrado inicialmente en leucocitos. Los factores genéticos asociados a la DMT1 incluyen el MHC localizado en el brazo corto del cromosoma 6, en la región de las moléculas del HLA. La región HLA es una región polimórfica que contiene genes relacionados con la predisposición a desarrollar enfermedades autoinmunes como la DMT1. Este polimorfismo la hace importante para identificar los genotipos asociados con la enfermedad (Rodríguez et al, 1998; Granados et al., 1996).

Este grupo de genes codifican glucoproteínas que interactúan con péptidos antigénicos y se expresan en la superficie de las células presentadoras de antígeno (linfocitos B, células dendríticas, células de Langerhans, macrófagos) así como en linfocitos T y en células endoteliales (Lambert et al., 2004). Los alelos HLA de clase II de mayor susceptibilidad en la DMT1 son: DR, DQ y DP. Los haplotipos DR3 y DR4 son los marcadores genéticos más conocidos, están presentes en el 95% de los diabéticos de raza caucásica y en el 40-50% de la población general; en la población japonesa también es prevalente el haplotipo DR9. Los alelos DQ de clase II como DQ $\beta$ : 0302, 0201 y DQA: 0301,0501 son los más fuertemente asociados a la diabetes. La asociación entre ciertos haplotipos DR y DQ confiere la susceptibilidad a la DMT1 (Bilbao et al, 1996; Giralt et al., 2003). La susceptibilidad también está asociada a polimorfismos en una posición determinada en la secuencia de aminoácidos del DQ $\beta$ . La secuencia de aminoácidos del DQ $\beta$  contiene un ácido aspártico en la posición 57, este aminoácido forma un puente disulfuro a través del extremo de la hendidura de unión al péptido de la molécula DQ. La sustitución del ácido aspártico por valina, serina o alanina en la misma posición correlaciona con la susceptibilidad a la DMT1. Por otro lado, se ha observado que pacientes portadores del haplotipo DQA1 presentan una sustitución de arginina en la posición 52 de la cadena  $\alpha$ , esta sustitución también está relacionada con el incremento en la susceptibilidad a la enfermedad (Todd et al., 1987; Khalil et al., 1990).

En la población mexicana se han asociado los haplotipos DRB1\*0404/\*0401-DQA1-\*0301-DQB1\*0302, así como los alelos HLA B18 y B21 (Gorodezky et al., 2006; Rodríguez et al., 1998).

## 5.2. Factores Ambientales

Diversos factores ambientales se han asociado al dano observado en el pancreas endocrino, contribuyendo a la aparicion de la DMT1. Ejemplos de estos factores son ciertos tipos de alimentación y algunas enfermedades virales. Datos epidemiológicos han mostrado que las enfermedades virales como la influenza han aumentado el número de pacientes con DMT1 principalmente en la población infantil (Foulis et al., 1997). La infección congénita por el virus de la rubéola incrementa la frecuencia de la DMT1, ya que se ha reportado que el 20% de los niños desarrollan la enfermedad después de una infección prenatal (Forrest et al., 1971; Foulis et al., 1997). Otras infecciones involucradas son las causadas por *Coxsakiavirus*, *Citomegalovirus*, *Echovirus*, *Rotavirus* y el virus de la varicela (Olsson et al., 2005, Karjalainen et al., 1988, Pak et al., 1988).

Se han sugerido diversos mecanismos por los cuales los virus contribuyen a la inducción de la diabetes mellitus autoinmune: 1) infección directa a células  $\beta$ ; 2) infección del páncreas exocrino, en ambos casos las células  $\beta$  pueden ser dañadas por radicales libres como el óxido nítrico e  $IFN\gamma$ , ambos producidos y liberados como consecuencia de la infección viral y del proceso inflamatorio; 3) infección de la mucosa intestinal generando un incremento en la permeabilidad de la misma a componentes diabetogénicos con pérdida de la regulación inmunológica y la generación de células T diabetogénicas; 4) estimulación de células T con superantígenos; y 5) mimetismo molecular entre proteínas virales y antígenos propios de las células  $\beta$  (Harrison LC, 2005; Karjalainen et al., 1988). El mimetismo molecular se basa en la homología que presentan ciertas proteínas virales como la proteína 2 de *Rubéola*, la proteína 2C de *Coxsakiavirus*, la proteína 7 de *Cytomegalovirus* y la proteína VP7 de *Rotavirus* con la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) y la proteína fosfatasa de tirosina (IA-2) de la célula  $\beta$ , lo que desencadena la destrucción autoinmune de las células (Vreugdenhill et al., 1998).

Las practicas alimenticias en niños se han asociado al desarrollo de la DMT1. Diversos reportes han mostrado que la administración temprana de leche de vaca en la dieta predispone al desarrollo de la DMT1 en individuos con susceptibilidad genética, esto se debe al alto contenido de proteínas como la seroalbúmina bovina y la  $\beta$ -lactoglobulina (Saukkonen et al., 1994; Bodington et al., 1994; Cambranis-Rodríguez et al., 2002; Berdanier et al., 1995). En una población infantil finlandesa, con reciente diagnóstico de DMT1, se encontraron anticuerpos IgG contra un fragmento de la albúmina sérica bovina de 17 aminoácidos (ABBOS, por sus siglas en

inglés). Los anticuerpos contra dicho péptido reaccionan con algunas proteínas de la superficie de las células  $\beta$  (p69) lo que sugiere otro ejemplo de mimetismo molecular. En otro reporte se demostró que la administración de proteínas de la leche de vaca a ratas genéticamente susceptibles a la DMT1 acelera el desarrollo de la enfermedad. Por otro lado, se ha identificado una homología entre el péptido ABBOS y la estructura primaria de las subunidades  $\beta$  de las proteínas DQ, DR e I-A (Saukkonen et al., 1994; Bodington et al., 1994).

### **5.3. Factores Inmunológicos**

Los factores inmunológicos contribuyen a la destrucción de las células  $\beta$  del páncreas mediante una reacción inflamatoria generada por linfocitos T CD4+ y T CD8+ autoreactivos, macrófagos, células natural killer, linfocitos B y autoanticuerpos (Bottazo et al., 1985; Lacy et al., 1994; Savinov et al., 2003; Covarrubias-Espinoza, 2006).

El uso de ratones diabéticos no obesos (NOD) y de ratas Biobreeding (BB) ha permitido el estudio con más detalle de la participación de la respuesta inmunológica en la fisiopatología de la DMT1. Los modelos experimentales de DMT1 se asemejan a la enfermedad del humano ya que desarrollan de manera espontánea la diabetes al presentar la misma alteración genética que los humanos en el MHC. Los ratones NOD inician entre las 3 y 4 semanas de edad con peri-insulitis que progresa a una insulitis destructiva a partir de las 8 semanas de edad. La presentación clínica de la enfermedad inicia desde las 12 hasta las 16 semanas de edad (edad equivalente a la de los adolescentes humanos), y se caracteriza por hiperglicemias, glucosuria, hipercolesterolemia, cetonuria, poliuria y polifagia (Like et al., 1982; Jaramillo et al., 1994).

En los humanos al igual que en los ratones NOD, en estadios avanzados de la enfermedad se han encontrado principalmente linfocitos T CD8+ en el infiltrado inflamatorio y únicamente en los ratones NOD se ha demostrado que los linfocitos T CD4+ son esenciales para iniciar la destrucción de las células  $\beta$  pancreáticas, mientras que los linfocitos T CD8+ potencian el efecto (Jaramillo et al., 1994). En los pacientes diabéticos con trasplante de páncreas se ha observado que la recurrencia de la enfermedad está relacionada con una infiltración de células autoreactivas en el injerto pancreático, principalmente de linfocitos T CD8+ citotóxicos (Roep et al., 1996; Berdanier et al., 1995).

La participación de los linfocitos T es esencial en el proceso de destrucción de las células  $\beta$ ; en ratones NOD la timectomía neonatal previene el desarrollo de la enfermedad, mientras que

la diabetes puede ser inducida en ratones NOD neonatos y jóvenes mediante la transferencia adoptiva de linfocitos T CD4+ y CD8+ diabetogénicos (Roep et al., 1996). En los ratones NOD la destrucción de las células  $\beta$  no es mediada por contacto directo entre el linfocito T CD4+ y la célula  $\beta$ , sino que es el resultado del proceso inflamatorio inducido por los linfocitos T CD4+ autoreactivos y es dependiente de la presencia de macrófagos (Jaramillo et al., 1994).

Los linfocitos T CD4+ se dividen en dos subgrupos con diferentes actividades biológicas. La clasificación se basa en la producción de citocinas después de una respuesta inmunológica. Los linfocitos T CD4+ tipo Th1 se caracterizan por la producción de citocinas pro-inflamatorias como IL2, IL18 e IFN $\gamma$ , las cuales inducen una respuesta inmunológica celular. Mientras que los linfocitos T CD4+ tipo Th2 producen citocinas anti-inflamatorias como IL4, IL6, IL10 e IL13 asociadas con la inducción de una respuesta humoral (Chtanova et al., 2001).

El proceso inflamatorio tipo Th1 es mediado predominantemente por las quimiocinas CXCL10, CCL19, CCL21, que actúan principalmente como quimioatrayentes de monocitos y linfocitos T autoreactivos (Rabinovitch et al., 1996). También las citocinas de tipo Th1 (IL2, IFN $\gamma$  e IL18) activan a macrófagos, linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+ citotóxicos, permitiendo de esta manera la infiltración de estas células dentro de los islotes pancreáticos (Thomas et al., 2002). Asimismo, las citocinas pro-inflamatorias IL1 $\beta$  y TNF $\alpha$  desencadenan cascadas de señalización en las células  $\beta$  con la consecuente producción de radicales libres de oxígeno causando daño celular y finalmente la muerte celular (Oikawa et al., 2003; Bouma et al., 2005; Cantor et al., 2005; Ott et al., 2005a; Rhode et al., 2005; Shigihara et al., 2006).

La respuesta de tipo Th2 es de menor intensidad durante el proceso del daño pancreático, sin embargo, se sabe que en la enfermedad también se generan linfocitos Th2 autoreactivos siendo su función principal regular a los linfocitos Th1 autoreactivos. Adicionalmente se ha observado una anergia de linfocitos Th2 asociada al desarrollo de la DMT1 (Gallichan et al., 1999).

En los procesos inflamatorios, además de la participación de los linfocitos Th2 en la regulación de éstos, se ha observado que los linfocitos T reguladores también tienen un papel central y de gran relevancia en la regulación de las enfermedades autoinmunes. Hasta el momento se han descrito 3 tipos de linfocitos T reguladores: los naturales que son inducidos en el timo, los adaptativos o TH3 y los Tr1. La diferencia entre estas poblaciones son esencialmente los marcadores y las citocinas que expresan. Las células T reguladoras naturales son

CD4+CD25+FoxP3+ productoras de TGF $\beta$  e IL10; mientras que las TH3 son CD4+CD25-FoxP3+ productoras de TGF $\beta$  y finalmente las Tr1 que son CD4+CD25+FoxP3- y productoras de IL10 (Jonuleit et al., 2003; Chatila, 2005). En los ratones NOD se ha observado que el funcionamiento adecuado de los linfocitos T reguladores es esencial para evitar la progresión de la peri-insulinitis a insulinitis destructiva, siendo un punto de control importante que evita el avance a la diabetes (Ott et al., 2005b). Aunado a esto se ha observado que con la edad el número de linfocitos T reguladores productores de TGF $\beta$  disminuye en los nódulos linfáticos pancreáticos y en los islotes, resaltando no sólo la relevancia en el control de la autoinmunidad sino la importancia del TGF $\beta$  en el mantenimiento, expansión y funcionamiento de este tipo celular (Du et al., 2006; Pop et al., 2006).

Hasta el momento se desconoce en que momento se presentan auto-anticuerpos, sin embargo, en niños los primeros anticuerpos en aparecer están dirigidos principalmente contra la insulina (Yu L et al., 1996; Ziegler et al., 1999). Los anticuerpos contra los islotes pancreáticos (ICA) suelen ser de la clase IgG dirigidos contra un monogangliosido pancreático (GM2-1), y son detectados mediante inmunofluorescencia directa por su unión a células de los islotes en cortes de páncreas no fijados (Lendrum et al., 1975). Asimismo, se han detectado anticuerpos dirigidos contra la proteína relacionada con la sub-unidad catalítica de la glucosa-6-fosfato específica de islotes (IGRP) (Lieberman et al., 2003). En la gran mayoría de los pacientes diabéticos estos anticuerpos están presentes hasta nueve años antes de que aparezcan los síntomas y desaparecen paulatinamente después del primer año de inicio de la enfermedad (Kukko et al., 2005; Bingley et al., 1994). Aunados a estos auto-anticuerpos, se han detectado anticuerpos dirigidos contra la enzima GAD y contra la proteína IA-2, que actualmente son los principales marcadores de predicción para la DMT1 (Lu et al., 1996).

#### ***5.4. Factores que participan en la destrucción de las células $\beta$***

La destrucción autoinmune de las células  $\beta$  del páncreas es el fenómeno final en el desarrollo de la DMT1. Múltiples moléculas de señalización y citocinas están involucradas en este proceso incluyendo citocinas proinflamatorias, el óxido nítrico, las especies reactivas del oxígeno, las perforinas y granzimas, el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF, la lipoperoxidación, el estrés del retículo endoplásmico y la vía Fas/Fas ligando (FasL), una de las principales vías implicadas (Rabinovitch et al., 1998; Suarez-Pinzon et al., 2001).

### 5.4.1 Citocinas.

Las citocinas implicadas en la destrucción de las células  $\beta$  se expresan a nivel de gen, proteína o ambos, entre las células del infiltrado inflamatorio y en el páncreas de ratones NOD, ratas BB y en pacientes con DMT1 (Rabinovitch et al., 1994). En células mononucleares del infiltrado inflamatorio la expresión del RNA mensajero de  $\text{IFN}\gamma$  correlaciona con la destrucción de las células  $\beta$  del páncreas de ratones NOD (Rabinovitch et al., 1998; Muir et al., 1995). También,  $\text{IFN}\gamma$  e  $\text{IL1}\beta$  se han detectado en los linfocitos T del infiltrado inflamatorio de pacientes con DMT1 (Foulis et al., 1991; Uno et al., 2007). Adicionalmente, se encontró incrementada en la expresión del RNA mensajero y la proteína de  $\text{IFN}\alpha$  en el páncreas y en células  $\beta$  de pacientes con DMT1 con respecto al páncreas de humanos controles (Rabinovitch et al., 1998; Huang et al., 1995). En ratas BB, la expresión de  $\text{IFN}\alpha$  precede la insulinitis (Huang et al., 1994), mientras que la expresión transgénica de  $\text{IFN}\alpha$  en ratones normales induce la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  (Stewart et al., 1993).  $\text{IFN}\alpha$  puede ser producida por muchas células infectadas con virus por lo que estas evidencias sugieren que un estímulo inicial, posiblemente viral, pudiera inducir la producción de  $\text{IFN}\alpha$ , el cual puede reclutar células del sistema inmunológico y en consecuencia estas células pueden dañar a las células  $\beta$  productoras de  $\text{IFN}\alpha$ .

Por otro lado, se ha observado que el tratamiento *in vitro* con  $\text{IL1}\beta$  e  $\text{IFN}\gamma$  reduce los niveles del RNA mensajero de la insulina, la secreción de la insulina en respuesta a la glucosa y la viabilidad en células  $\beta$  de rata y de islotes pancreáticos de humano (Matsuda et al., 2005). De forma similar, la presencia de  $\text{IL1}\beta$  e  $\text{IFN}\gamma$  estimula la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible en islotes pancreáticos de humano, lo cual induce un incremento en la concentración de óxido nítrico, inhibiendo la secreción de insulina en respuesta a la glucosa (Matsuda et al., 2005).

Otra citocina proinflamatoria implicada en la destrucción de las células  $\beta$  es  $\text{TNF}\alpha$ , a bajas concentraciones induce muerte celular mediante la vía del óxido nítrico, mientras que a altas concentraciones induce apoptosis por vías independientes (Daunger et al., 1996). El tratamiento con  $\text{TNF}\alpha$  activa cascadas de señalización induciendo apoptosis mediante la activación de caspasas en las células  $\beta$  de ratón que expresan receptores para TNF y Fas (Ishizuka et al., 1999). Adicionalmente, se ha reportado que  $\text{IFN}\gamma$  y  $\text{TNF}\alpha$  inducen apoptosis a través de la

activación de factores de transcripción como STAT1 y del factor regulador de IFN1 en células  $\beta$  y en islotes de ratones NOD (Suk et al., 2001). Las citocinas proinflamatorias IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , TNF $\beta$  e IFN $\gamma$  se unen a receptores específicos en las células  $\beta$  e inducen la activación de diferentes vías de señalización que llevan a la muerte celular, sin embargo no están totalmente caracterizadas.

Las citocinas proinflamatorias contribuyen a la destrucción de las células  $\beta$  de manera indirecta, promoviendo el desarrollo de la insulinitis a través de la inducción de las quimiocinas CXCL10, CCL19 y CCL21, que actúan principalmente como quimioatrayentes de monocitos y linfocitos T autoreactivos (Rabinovitch et al., 1996). También, inducen la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I y II incrementando la presentación de antígenos propios de las células  $\beta$  e inducen la expresión de moléculas de adhesión tipo ICAM-1 (Walter et al., 2003). Los efectos que ejercen las citocinas proinflamatorias incrementan la susceptibilidad de las células  $\beta$  al ataque de los linfocitos T autorreactivos e indirectamente contribuyen con su muerte.

#### ***5.4.2 Radicales libres del oxígeno y óxido nítrico.***

Existen diversos reportes que han demostrado que los radicales libres de oxígeno y el óxido nítrico afectan la función de las células  $\beta$  e inducen su destrucción en la DMT1. Las células  $\beta$  pancreáticas son altamente vulnerables al daño por los radicales libres, como los que se generan por alloxano (Malaisse et al., 1982), esto se ha atribuido, al menos en parte, a la baja actividad de enzimas antioxidantes (e.g. superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa) en células de islotes pancreáticos de ratas BB y ratones NOD (Rabinovitch et al., 1998). Además, se ha observado que el tratamiento con antioxidantes (deferroxamina, nicotinamida, superóxido dismutasa,  $\alpha$ -tocoferol, probucol y lazaroides) confieren protección contra el desarrollo de la diabetes mellitus en ratones NOD y ratas BB (Rabinovitch et al., 1998). Adicionalmente, se reportó que los antioxidantes protegen a las células  $\beta$  de los efectos citotóxicos inducidos por las citocinas proinflamatorias (Rabinovitch et al., 1998).

En otros estudios se ha reportado que las citocinas IL1, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ , solas o en combinación, inducen un incremento en la lipoperoxidación y la destrucción de islotes de Langerhans de rata y humano (Rabinovitch et al., 1992; Rabinovitch et al., 1996). Asimismo, se ha reportado que estas citocinas inhiben la liberación de insulina sin incrementar la lipoperoxidación en islotes de rata (Rabinovitch et al., 1992). Recientemente, se reportó que la

combinación de las citocinas IL1, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  induce la formación de un amplio espectro de aldehídos en islotes pancreáticos de rata, estos aldehídos resultan altamente tóxicos a las células  $\beta$  (Suarez-Pinzon et al., 1996). En conjunto, estas evidencias sugieren que la destrucción de las células  $\beta$  inducida por las citocinas proinflamatorias involucra la producción de radicales libres de oxígeno, la lipoperoxidación y la generación de aldehídos que son tóxicos para las células  $\beta$ .

Por otro lado, se ha reportado que el óxido nítrico inducido por IL1 $\beta$  bloquea la secreción de insulina en islotes de rata (Southern et al., 1990). También, las citocinas proinflamatorias IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  inducen la expresión de la enzima del óxido nítrico sintasa y la producción de óxido nítrico en macrófagos, células endoteliales y en células  $\beta$  de ratones NOD (Rabinovitch et al., 1998). El uso de inhibidores específicos de la enzima óxido nítrico sintasa previene la inhibición de la oxidación de la glucosa, la inhibición de la secreción de insulina, ambas inducidas por IL1 $\beta$ , también previene la inhibición de la actividad de la enzima aconitasa inducida por IL1 $\beta$  en islotes de Langerhans y en células  $\beta$  de rata (Corbett et al., 1991; Corbett et al., 1992). Estos reportes sugieren que el mecanismo por el cual el óxido nítrico inducido por IL1 $\beta$  inhibe la liberación de insulina podría ser, al menos en parte, a través de la inhibición de enzimas mitocondriales esenciales para la oxidación de la glucosa y la liberación de la insulina como la aconitasa. En conjunto estos reportes demuestran que el óxido nítrico producido extra e intracelularmente es citotóxico para las células  $\beta$  pancreáticas.

### **5.4.3 Receptores Fas**

Fas y su ligando Fas L, pertenecen a la familia de las proteínas TNF, que participan principalmente en la inducción de apoptosis. La unión de Fas a FasL resulta en la apoptosis en las células que expresan Fas, por medio de la activación de la vía de las caspasas generando la fragmentación del ADN y posteriormente la muerte celular ( Pearl-Yafe et al., 2007).

Las células  $\beta$  son capaces de expresar Fas en respuesta al ataque de los linfocitos T citotóxicos autoreactivos (Rabinovitch et al., 1998). Se ha observado que cuando islotes pancreáticos son transplantados a ratones NOD, las células  $\beta$  expresan Fas y son destruidas rápidamente por células del infiltrado inflamatorio (Suarez-Pinzon et al., 1999). También, las citocinas proinflamatorias IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , TNF $\beta$  e IFN $\gamma$  liberadas por células del infiltrado inflamatorio inducen la expresión de Fas en células  $\beta$  de ratones NOD, induciendo la apoptosis

mediada por FasL ( Pearl-Yafe et al., 2007). Además, se ha reportado que Fas se expresa en células  $\beta$  de pacientes con DMT1, adicionalmente se encontró la expresión de Fas en células  $\beta$  sólo en los islotes con infiltrado inflamatorio mas no en islotes sin infiltrado inflamatorio, lo que sugiere que las células que infiltran el islote pancreático inducen la expresión de Fas en células  $\beta$  (Moriwaki et al., 1999). Se ha observado que únicamente las células  $\beta$  tratadas *in vitro* con citocinas proinflamatorias mueren por apoptosis (Pearl-Yafe et al., 2007). También, se ha reportado que los linfocitos T CD4 autoreactivos destruyen específicamente a células  $\beta$  tratadas previamente con citocinas proinflamatorias y que expresan Fas (Amrani et al., 2000). Estos reportes en conjunto, sugieren que la destrucción de las células  $\beta$  por Fas/FasL es dependiente de las citocinas proinflamatorias.

Los factores producidos y liberados por las células del infiltrado inflamatorio, principalmente citocinas proinflamatorias, especies reactivas del oxígeno y nitrógeno, tienen la capacidad de inducir la destrucción de las células  $\beta$  de una manera inespecífica. Los macrófagos activados producen radicales libres de oxígeno y nitrógeno; estos radicales libres pueden dañar la membrana plasmática de las células  $\beta$  y causar daño intracelular. Además, los macrófagos y linfocitos T activados producen IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , TNF $\beta$  e IFN $\gamma$ . Estas citocinas proinflamatorias se unen a receptores específicos en células  $\beta$  activando diferentes vías de señalización. Una de las cuales, activa a fosfolipasas induciendo un incremento en la formación de radicales libres de oxígeno. Las citocinas IL1 $\beta$ , TNF e IFN $\gamma$  activan la síntesis de la óxido nítrico sintasa e incrementan la producción del óxido nítrico. Los radicales libres de oxígeno y del nitrógeno pueden actuar de manera conjunta o separada. Estos radicales libres pueden inactivar proteínas citosólicas y mitocondriales, disminuyendo la glicólisis y llevando a una disminución de los niveles de ATP, como consecuencia se ve afectada la secreción de la insulina. Altas concentraciones o la producción prolongada de radicales libres puede incrementar el daño a fosfolípidos de membrana, enzimas (aconitasa, esencial para la degradación de la glucosa y liberación de la insulina) y al DNA, esenciales para la sobrevivida, lo que resulta en la muerte de las células  $\beta$  productoras de la insulina, desencadenando así el cuadro clínico de la DMT1.

### **5.5. Deficiencia de la insulina en la DMT1.**

La deficiencia en la secreción de la insulina conlleva a complicaciones metabólicas severas como la hiperglicemia y la cetaoacidosis. La hiperglicemia se origina debido a una incapacidad de las

células para capturar y usar la glucosa en ausencia de la insulina. La pérdida de la secreción de la insulina induce un incremento de las hormonas contra-reguladoras, desviando el metabolismo hacia la hiperglicemia, acidosis y cetoacidosis. El aumento en la producción de glucosa hepática y la disminución en la captura periférica de glucosa son las principales causas de hiperglicemia vistas en la diabetes.

En ausencia de la insulina, el glucagon es la principal hormona para el metabolismo de los carbohidratos a nivel hepático. El glucagon estimula la liberación de glucosa en el hígado a partir de la inducción de la gluconeogénesis y glucogenólisis. El glucógeno hepático es transformado a glucosa y liberado al torrente sanguíneo. La deficiencia de insulina y el aumento del glucagon aumentan la producción de glucosa hepática a partir de las grasas y las proteínas. La oxidación de ácidos grasos lleva a la formación de cuerpos cetónicos e inhibe la conversión de acetil coenzima A por la acetil coenzima A carboxilasa a malonil coenzima A, el cual es el primer intermediario en la vía de la lipogénesis. Esta inhibición origina que los ácidos grasos no puedan entrar al ciclo del ácido cítrico y en su lugar penetran la mitocondria, donde son oxidados con la consecuente formación de cuerpos cetónicos (acetoacetato y betahidroxibutirato) (Fleckman et al., 1993). La deficiencia de insulina y el aumento de las hormonas contra-reguladoras incrementan la degradación de proteínas, proporcionando así aminoácidos para aumentar la gluconeogénesis.

La insulina inhibe la acción lipolítica del cortisol y de la hormona del crecimiento. Por lo tanto, la deficiencia de insulina afecta los niveles en circulación de ácidos grasos. Éstos son metabolizados por vías metabólicas alternativas. El exceso de ácidos grasos y de ácido láctico contribuye a disminuir el pH. La principal alteración que se observa en la cetoacidosis es el aumento en los niveles de ácido beta-hidroxibutirico más que acetona o acetoacetato (Delaney et al., 2000).

## **6. Terapia farmacológica**

Como se mencionó previamente, la DMT1 es una enfermedad autoinmune generada por destrucción de las células  $\beta$  del páncreas productoras de insulina. La deficiencia en la secreción de insulina, por lo tanto no es una enfermedad que tenga un tratamiento curativo. Sin embargo, existen tratamientos para el manejo de esta enfermedad.

### **6.1. Insulina**

El tratamiento actual en humanos es la administración exógena de insulina y la aplicación de diferentes medidas para controlar los niveles de glucosa en circulación, y de esta manera poder prevenir las complicaciones futuras y la muerte. Las medidas preventivas son: 1) mantener niveles de glucemia en ayuno entre 90 y 110 mg/dl; 2) evitar situaciones de hiperglucemia, hipoglucemia, cetosis y cetoacidosis; 3) mantener un estado psicológico saludable logrando un desarrollo y crecimiento normales; 4) prevenir el desarrollo de complicaciones tardías como la retinopatía, neuropatía, nefropatía y enfermedad macrovascular (Zúñiga et al., 1995).

El descubrimiento de la insulina por Banting y colaboradores (Banting et al., 1921), marcó el inicio del tratamiento de una enfermedad que se creía terminal y no tratable. A partir de 1926 se comenzó a utilizar insulina de origen animal para el tratamiento de la DM. En 1922 Abel y colaboradores aisló y purificó los cristales de insulina en presencia de iones de zinc y a esta insulina se le llamó insulina cristalina, insulina soluble o insulina regular. Por muchos años, la insulina que se utilizó para el tratamiento de la diabetes fue obtenida y purificada de origen animal (bovino, porcino). Para la década de los 80's, se obtuvieron dos formas de insulina recombinante idéntica a la humana por medio de Ingeniería Genética (Rosenfeld et al., 2002). Actualmente la administración de insulina es por vía subcutánea, sin embargo, recientemente se ha reportado que la insulina inhalada también normaliza los niveles de glucosa en humanos con DM tipo 1 y 2 (Skyler et al., 2005; Quattrin et al., 2004).

A nivel experimental la administración oral de insulina reduce la incidencia de la diabetes, prolonga la supervivencia en ratones NOD y confiere protección contra la diabetes en ratas BB (Harrison et al., 1996; Hartman et al., 1997; Zhang et al., 1991; Gotfredsen et al., 1985). El efecto protector de la insulina oral puede ser potenciado mediante la administración conjunta de IL10, antígenos bacteriales como OM-89 o antígenos de *Schistosoma sp*, los cuales generan una respuesta protectora de tipo Th2 (Harrison LC, 2005). Por otro lado, la fusión de la insulina a la subunidad B de la toxina del cólera (CTB) confiere protección contra el desarrollo de la diabetes en ratones NOD. Asimismo, la administración oral de insulina y CTB-insulina en ratones NOD induce un cambio de una respuesta patogénica tipo Th1 a una respuesta protectora tipo Th2 asociada a la inducción de células TCD4+ reguladoras (Bergerot et al., 1997; Ploix et al., 1999). Adicionalmente, la administración de papas transgénicas que expresan el conjugado CTB-insulina protegen de la diabetes a los ratones NOD (Arakawa et al., 1998).

### **6.2. Fármacos Inmunosupresores**

El uso de fármacos inmunosupresores como la Azatioprina, Ciclosporina A (CsA), Tacrolimus (FK506), Rapamicina y Prednisolona, ofrecen buenos resultados, sin embargo, estos tratamientos sólo retrasan la progresión de la diabetes en algunos pacientes. No se ha observado un efecto a largo plazo y la interrupción del tratamiento causa la recurrencia del proceso autoinmune. Se ha observado que los pacientes que reciben una combinación de fármacos como Prednisolona y CsA presentan remisiones mayores. Además, la inmunosupresión farmacológica siempre tiene un riesgo debido a los efectos secundarios incluyendo la supresión en la función de la médula ósea, formación de úlceras, neumonitis, deterioro de la función renal, edema periférico, diarrea, pérdida de peso, fatiga y recientemente se ha reportado que el uso prolongado de fármacos inmunosupresores incrementa el riesgo a desarrollar cáncer (Boitard et al., 1991; Roep et al., 1996; Rother et al., 2004; Bosmans et al., 2007; Gutierrez-Dalmau et al., 2007).

### **6.3. Transplante de Páncreas**

El transplante de páncreas tiene como objetivo el llevar al paciente diabético a una situación de insulino-independencia, disminuir o prevenir las complicaciones evolutivas de la diabetes y mejorar la calidad de vida de los pacientes. Se ha observado que el doble transplante páncreas-riñón presenta mejores resultados, la sobrevida es significativamente mayor en los pacientes con el doble transplante (65%), que los pacientes que solamente recibieron el transplante de páncreas (26%) (Ruso, 1999; Rother et al., 2004).

Los pacientes con transplante de páncreas, como en cualquier otro tipo de transplante, deberán de someterse de por vida al tratamiento con fármacos inmunosupresores para prevenir el rechazo del órgano transplantado. Aunque el transplante de páncreas mejora la calidad de vida de los pacientes con DMT1, existen pacientes que controlan la progresión de la enfermedad autoinmune con el tratamiento de insulina, mientras que otros desarrollan complicaciones secundarias al tratamiento con CsA después del transplante. Adicionalmente, existe un alto riesgo de perder el órgano transplantado (Ruso, 1999; Rother et al., 2004).

Para un porcentaje importante de pacientes el transplante de páncreas representa la mejor manera de controlar o regular la DMT1, evitando así las complicaciones relacionadas con esta enfermedad. En este sentido, el transplante de islotes pancreáticos es otra alternativa para el

tratamiento de la DMT1. Este procedimiento consiste en extraer islotes de Langerhans del páncreas del donante para luego ser transplantados en el hígado del paciente diabético dentro de una cápsula renal, restaurando así la capacidad de producir insulina (Rother et al., 2004; Shapiro et al., 2000). A diferencia del trasplante de páncreas, el trasplante de islotes es un procedimiento quirúrgico relativamente sencillo, económico y más seguro, sin embargo, los receptores de trasplantes de islotes también deben someterse a un tratamiento de insulina y fármacos inmunosupresores para evitar el rechazo (Rother et al., 2004; Shapiro et al., 2000)

A nivel experimental recientemente se reportó que el xenotrasplante de islotes pancreáticos de cerdo normaliza los niveles séricos de glucosa en los ratones NOD. Este tipo de trasplante ofrece una nueva alternativa para el tratamiento de la DMT1, ya que durante más de 60 años los humanos DMT1 fueron tratados con insulina de origen porcino (Rother et al., 2004). Adicionalmente, los islotes pancreáticos de cerdo responden a la glucosa en el mismo rango fisiológico que los islotes de humano (Rother et al., 2004). Sin embargo, el xenotrasplante de islotes de cerdo en humanos aun no ha sido explorado debido a que los humanos expresan altos títulos de anticuerpos contra la galactosa  $\alpha$  y los islotes de cerdo presentan residuos de galactosa, lo que generaría un rechazo agudo. Aunado a lo anterior, las células de cerdo contienen retrovirus endógenos lo que podría generar una posible infección a células humanas (Eventov-Friedman et al., 2006).

#### ***6.4. Inducción de Tolerancia.***

Diversas evidencias a nivel experimental sugieren que la modulación inmunológica a través de diversas metodologías puede prevenir, revertir o disminuir la destrucción de las células  $\beta$  pancreáticas y podría ser utilizada en humanos.

El desarrollo de autoinmunidad en ratones NOD puede ser prevenida al inducir una estimulación inmunológica selectiva mediante la administración de antígenos propios. Esta prevención se asocia a la inducción de tolerancia específica a estos antígenos (Raz et al., 2006).

Aunque algunas moléculas tienen un papel importante en la patogenia de la diabetes autoinmune, el antígeno propio responsable de iniciar la diabetes permanece sin ser identificado. Entre los antígenos candidatos propuestos están la sub-unidad B de la insulina y la sub-unidad catalítica de la glucosa-6-fosfato que son específicas de las células  $\beta$ , la GAD que se expresan tanto en las células  $\beta$  como en otros tejidos, y la proteína de choque térmico 65 (Hsp65) que se

distribuye extensamente en todas las células. Adicionalmente, se ha encontrado que estas moléculas pueden ser el blanco de auto-anticuerpos y células T autoreactivas patogénicas (Raz et al., 2005).

La inmunización intermitente con la cadena  $\beta$  de la insulina reduce la diabetes en los ratones NOD y las ratas BB (Muir et al., 1995; Liu et al., 2005; Rabinovitch et al., 1998). En contraste, ensayos similares en humanos utilizando una terapia intensiva de insulina oral o parenteral no han mostrado ningún efecto sobre la progresión de la diabetes ni sobre el proceso autoinmune (Raz et al., 2005). Sin embargo, se ha reportado que en estudios clínicos en fase I la inmunización con un péptido modificado de la cadena  $\beta$  de la insulina, NBI-6024, modula el perfil Th1 hacia una respuesta protectora tipo Th2 en los pacientes diabéticos tipo 1 (Alleva et al., 2006). La importancia de estos resultados sobre el estado clínico de la diabetes está actualmente bajo investigación en un estudio clínico fase II.

Por otro lado, el tratamiento con péptidos derivados de GAD (el péptido GAD65, la isoforma GAD67, entre otros), plásmidos de DNA y virus que expresan GAD reducen la severidad de la insulinitis y previenen el desarrollo de la diabetes en ratones NOD (Raz et al., 2005). En pacientes con diabetes tipo LADA se ha reportado la eficiencia y seguridad del péptido recombinante GAD65 (Agardh et al., 2005). Por otro lado la inyección de p277, un péptido derivado de Hsp65, previene la insulinitis y la diabetes en ratones NOD y ratones diabéticos inducidos por streptozotocina (Raz et al., 2005). La administración del péptido DiaPep277 mantuvo la secreción endógena de insulina, disminuyó la necesidad de insulina exógena y preservó la función de las células  $\beta$  en humanos con reciente diagnóstico de diabetes (Raz et al., 2007).

### **6.5. Citocinas y anticuerpos**

El proceso inflamatorio al inicio de la diabetes autoinmune es causado por el efecto de los linfocitos Th1 y propagado por la secreción de las citocinas pro-inflamatorias como IL1 $\beta$ , IL2, IL18, TNF $\alpha$  e INF $\gamma$  (Rabinovitch et al., 1998). Se ha reportado que este proceso puede ser controlado por citocinas anti-inflamatorias tipo Th2 como IL4 e IL10. El tratamiento con citocinas recombinantes de humano (IL4, IL10 e IL13) previene la diabetes en ratones NOD y en ratas BB, también revierten la destrucción de células  $\beta$  pancreáticas inducida por estreptozotocina en ratones BALB/c (Cameron et al., 1997; Pennline et al., 1994; Tominaga et al., 1998; Zaccone et al., 1999; Wood et al., 1999). Por otro lado, la administración de plásmidos y vectores virales

que expresan IL4 e IL10 confieren protección contra la diabetes en ratones NOD y en ratas BB (Lee et al., 2002; Hayashi et al., 2003; Zipris et al., 2002; Wolfe et al., 2002; Goudy et al., 2001). Asimismo, el trasplante de células dendríticas transfectadas que expresan IL4 induce un perfil tipo Th2 en las células T, previniendo de esta manera la diabetes en ratones NOD (Feili-Hariri et al., 2003). Sin embargo, el efecto de las citocinas antiinflamatorias, como IL4 e IL10 en el tratamiento de la DMT1 en humanos aún no se ha explorado.

Adicionalmente, se ha observado que el tratamiento con anticuerpos anti-CD3 previene y revierte el desarrollo de la diabetes en los ratones NOD y las ratas BB (Herold et al., 2003; Chatenoud et al., 1994). Igualmente en humanos el tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-CD3 durante un año incrementa la secreción de insulina en pacientes diabéticos tipo 1 (Herold et al., 2002).

## 7. La silymarina

Hasta el momento el manejo terapéutico de la DMT1 se ha limitado principalmente a la administración de insulina y al control de la glucosa sérica, pero no a la recuperación de la función del páncreas por lo que es necesario encontrar nuevas terapias farmacológicas. Entre los fármacos en estudio se ha propuesto a la silymarina para el tratamiento de esta enfermedad.

La silymarina es un flavonoide polifenólico obtenido de las semillas y frutos de la planta *Silybum marianum* (también conocido como *Cardus marianus*). Las semillas se han utilizado desde hace 2000 años para tratar diversas enfermedades hepáticas, como cirrosis inducida por alcohol, hepatitis viral crónica, hepatitis viral aguda, colestiasis crónica, envenenamiento por químicos y toxinas ambientales, incluyendo mordidas de serpientes, insectos y envenenamiento por hongos (Wellington et al., 2001). El uso de esta planta medicinal fue registrado por Theoprastus por primera vez en el siglo 4 A.C. bajo el nombre de “Pternix”, más tarde fue mencionada por Dioskurides en sus escritos de “Materia médica” y por Plinius en el siglo 1 D.C. Posteriormente, en el siglo 16 se vuelve a mencionar en todos los herbarios medicinales escritos por diversos autores de Europa central como Hildegarda von Bingen (1098-1179), Hyeronimus Bock (1593), Jacobs Theodorus (1664), Mattioli (1626), Valentín (1719) y Von Haller (1755). Actualmente se continúa usando como planta medicinal (Morazzoni et al., 1995; Kren et al., 2005; Wellington et al., 2001).



Figura 1. Estructura química de los principales flavonoides de la silymarina (Sonnenbichler et al., 1999).

### **7.1. Efecto antioxidante, hepatoprotector y citoprotector**

La silymarina confiere protección contra el estrés oxidativo inducido por diversos agentes tóxicos como  $\alpha$ -amanita, pallocidina, tetracloruro de carbono, fumonisina B<sub>1</sub>, concanavalina A, paracetamol, D-galactosamina, ciclosporina A y etanol; este efecto protector es principalmente a través de sus propiedades antioxidantes (Tabla 3).

Los mecanismos de acción del efecto hepatoprotector y citoprotector involucran diversos eventos bioquímicos. Se ha observado que la silymarina incrementa la transcripción del RNA ribosomal, la síntesis de ribosomas y subsecuentemente la biosíntesis de proteínas con actividad enzimática antioxidante (e.g. superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa) (Wellington et al., 2001, Soto et al., 2003). Igualmente incrementa la estabilidad de la membrana celular a través de la depuración de radicales libres inducidos por el estrés oxidativo (Conti et al., 1992; Wellington et al., 2001; Pascual et al., 1993; Soto et al., 2003).

A nivel clínico y farmacológico la silymarina se ha utilizado ampliamente para el tratamiento de enfermedades hepáticas. Diversos estudios muestran que el tratamiento con silymarina incrementa significativamente la expresión y la actividad enzimática de superóxido dismutasa en linfocitos y eritrocitos de pacientes con cirrosis hepática crónica (Feher et al., 1987; Feher et al., 1990). Además, la silymarina mostró un incremento en los niveles de glutatión y glutatión peroxidasa en suero de pacientes con cirrosis hepática crónica (Feher et al., 1986; Feher et al., 1998; Müzes et al., 1991). Adicionalmente se observó que la administración de silymarina reduce los niveles séricos de malondialdehído en pacientes tratados con drogas psicotrópicas (Palasciano et al., 1994).

En pacientes con DM tipo 2 con cirrosis ha reportado que el tratamiento con la silymarina durante 12 meses redujo la lipoperoxidación en hepatocitos, la resistencia a la insulina, disminuyó los niveles séricos de glucosa y la glucosuria; también disminuyó significativamente la sobreproducción endógena de insulina y la necesidad de administración exógena de insulina (Velussi et al., 1997; Lirussi et al., 2002).

## ***7.2. Efecto anticarcinogénico***

En cuanto al efecto anticarcinogénico se ha demostrado que el tratamiento con silybina o silymarina inhibe el crecimiento e induce la apoptosis de las células de carcinoma de piel, de cérvix, de próstata, de colon, de ovario y de mama, tanto de origen murino como de humano (Zhao et al., 1999; Provinciali et al., 2007). Asimismo, silybina potencia el efecto protector de doxorubicina, cisplatina y carboplatina en células de humano con carcinoma de pecho dependientes e independientes de estrógenos (Bokemeyer et al., 1996). Adicionalmente se ha demostrado que silybina es capaz de inhibir la activación constitutiva de NFκB y la activación inducida por TNFα (Dhanalakshmi et al., 2002). También se ha reportado que silybina induce apoptosis e inhibe la angiogénesis, un fenómeno esencial para el crecimiento de tumores y metástasis (Yoo et al., 2004). Por otro lado, se ha reportado que la administración de silymarina confiere protección contra la carcinogénesis en diferentes modelos animales e inhibe el crecimiento del cáncer ovárico humano transplantado en ratones a tímicos (Katiyar et al., 1997; Kren et al., 2005; Lahiri-Chatterjee et al., 1999; Gallo et al., 2003).

Tabla 2. Efectos farmacológicos *in vitro* de la silymarina (modificado de Wellington et al., 2001).

Compuesto	Dosis	Efecto
silymarina	0.05 $\mu\text{mol/L}$	Reduce la toxicidad inducida por paracetamol en hepatocitos y células epidermales de humano (Wellington et al., 2001).
silymarina	25 y 50 mg/L	Inhibe la activación del receptor del factor de crecimiento epidermal humano inducida por el ligando sin afectar los niveles de esta proteína (Wellington et al., 2001).
silymarina	50 $\mu\text{mol/L}$	Suprime la activación de NF- $\kappa$ B, cinasa N-terminal c-Jun y la apoptosis inducida por TNF en linfocitos de humano (Manna et al., 1999)
silymarina	75, 100 y 150 $\mu\text{g/ml}$	Inhibe el crecimiento, actividad de cinasas dependientes de ciclina y arresta el ciclo celular en G1 en células de humano con carcinoma de próstata (Zi et al., 1998b).
silymarina	100 $\mu\text{mol/L}$	Confiere protección contra la citotoxicidad inducida por IL1 $\beta$ e IFN $\gamma$ en islotes pancreáticos y restablece la secreción de insulina en células $\beta$ de humano (Matsuda et al., 2005).
silymarina	0.5 mmo/L	Inhibe la expresión y liberación de TNF $\alpha$ , IL1 $\alpha$ e IL6 inducida por etanol y metotrexato en hepatocitos de rata y humanos (Neumen et al., 1999).
silymarina, silybina	100 $\mu\text{mol/L}$	Inhiben el crecimiento y la síntesis de DNA en células de humano con carcinoma de próstata, pecho y cérvico (Wellington et al., 2001).
silybina	100, 200 y 300 $\mu\text{mol/L}$	Inhibe el crecimiento, citotoxicidad, actividad de cinasas dependientes de ciclinas, arresta el ciclo celular en G1 e induce apoptosis en células de humano con carcinoma hepatocelular (Varghese et al., 2005).
silybina	50, 100 $\mu\text{g/ml}$	Inhibe el crecimiento, actividad de cinasas dependientes de ciclinas, arresta el ciclo celular en G1 y G2 e induce apoptosis en células de humano con carcinoma de colon (Agarwal et al., 2003).
silybina	10mg/ml	Inhibe la liberación de histamina inducida por anticuerpos IgE y el péptido f-met en basófilos de humano (Wellington et al., 2001).
silybina	25 mg/L	Inhibe la blastogenesis inducida por anticuerpos monoclonales anti-CD3 en linfocitos de humanos (Wellington et al., 2001).
silybina	10 <sup>-4</sup> mol/L	Inhibe la proliferación y transformación de hepatocitos estelares de rata (Wellington et al., 2001).
silybina	50 mg/L	Triplica la síntesis del RNA ribosomal en hepatocitos de rata (Wellington et al., 2001).

El mecanismo por el cual la silymarina ejerce su efecto anti-carcinogénico no está totalmente comprendido, pero se ha demostrado que podría ser a través de la inhibición de la activación de receptores cinasas de tirosina, cinasas dependientes de ciclina, proteínas de cinasa activadas por mitógenos (MAPK), la expresión de TNF $\alpha$  y la activación de factores de transcripción como NF- $\kappa$ B inducido por TNF- $\alpha$  (Manna et al., 1999; Zi et al., 1998a; Zi et al., 1998b; Zi et al., 1997; Dhanalakshmi et al., 2002). Adicionalmente se ha reportado que la silybina causa un cambio en la expresión de Bax/Bcl2 favoreciendo la apoptosis; también induce

la liberación del citocromo C, la activación de las caspasas 3 y 9, y la fragmentación de poly-ADP-ribosa polimerasa (PARP) (Yoo et al., 2004). En conjunto, estos reportes sugieren que la silymarina ejerce sus efectos anti-carcinogénicos, al menos en parte, a través de la inducción de apoptosis vía modulación de NF- $\kappa$ B, de proteínas de la familia Bcl-2 y de caspasas.

### ***7.3. Efecto antiviral***

La silymarina es utilizada en pacientes con hepatitis viral, pero su eficacia permanece desconocida. El efecto antiviral de la silymarina se ha evaluado en diferentes ensayos clínicos con diferentes resultados.

El tratamiento de tres semanas con silymarina reduce significativamente los niveles en suero de aspartato y bilirrubina en pacientes con hepatitis A o B (Magliulo et al., 1978). Otro estudio reportó la disminución de los niveles séricos de alanina aminotransferasas en pacientes con hepatitis viral crónica tratados con silymarina (Tanasescu et al., 1988). También se ha reportado que el tratamiento de ocho meses con la silymarina en combinación con ácido ursodeoxycólico reduce significativamente los niveles en suero de aspartato, alanina aminotransferasa y  $\gamma$ -glutamilttransferasa en pacientes con hepatitis viral crónica (Mori et al., 1995). El tratamiento por dos meses con silybina disminuyó significativamente los niveles en suero de aspartato en pacientes con hepatitis C tratados (Mayer et al., 2005). También se ha observado que el tratamiento con la silymarina disminuye los niveles de alanina aminotransferasas y aspartato en pacientes con cirrosis hepática e infectados con hepatitis B (Mayer et al., 2005). Adicionalmente, el tratamiento con silybina disminuye los niveles séricos de transaminasas,  $\gamma$ -glutamilttransferasa y bilirrubinas en pacientes con hepatitis B y C (Buzzelli et al., 1993).

Estos reportes en conjunto muestran que el tratamiento con la silymarina ejerce su efecto sobre los niveles séricos de transaminasas, pero no presenta ningún efecto sobre la carga viral ni modifica la histología hepática en pacientes con hepatitis viral. Sin embargo, recientemente se reportó que la silymarina inhibe la infección por el virus de la hepatitis C en células de humano y potencia el efecto antiviral de IFN $\alpha$  (Polyak et al., 2007). Estos resultados sugieren que la administración de silymarina en combinación con IFN $\alpha$  podría ser utilizada para el tratamiento de pacientes con hepatitis C crónica, sin embargo, no ha sido investigado a nivel clínico.

Tabla 3. Efecto farmacológico *in vivo* de silymarina (modificado de Wellington et al., 2001).

Compuesto	Dosis	Efecto
silymarina	200 mg/kg	Incrementa el estado redox y el contenido de glutatión en hígado, intestino y estómago de rata (Wellington et al., 2001).
silymarina	100 mg/kg	Reduce la hepatotoxicidad inducida por talio en ratas (Wellington et al., 2001).
silymarina	150 mg/kg	Confiere protección contra el daño hepático inducido por tetracloruro de carbono en ratas (Wellington et al., 2001).
silymarina	750 mg/kg	Confiere protección contra el daño hepático inducido por Fumonisina B <sub>1</sub> en ratones (He et al., 2004).
silymarina	200 mg/kg	Reduce la lipoperoxidación hepática inducida por intoxicación aguda por etanol en ratas (Wellington et al., 2001).
silymarina	100mg/kg	Incrementa la síntesis de sales biliares hepatoprotectoras en ratas (Wellington et al., 2001).
silymarina	70 mg/kg	Incrementa la concentración de RNA y DNA en hígado y medula ósea de ratas irradiadas con rayos gamma (Wellington et al., 2001).
silymarina	50 mg/kg	Confiere protección contra la lipoperoxidación hepática y la depleción de glutatión inducida por paracetamol en ratas (Wellington et al., 2001).
silymarina	200mg/kg	Confiere protección contra la lipoperoxidación hepática y hemólisis inducida por fenilhidrazina en ratas (Wellington et al., 2001).
silymarina	100mg/kg	Previene úlceras gástricas inducidas por estrés en ratas (Wellington et al., 2001).
silymarina	100mg/kg	Reduce el daño en mucosas inducido por isquemia en ratas (Wellington et al., 2001).
silymarina	660mg/kg	Inhibe el desarrollo de la hipercolesterolemia inducida por dieta en ratas (Wellington et al., 2001).
silymarina	500 mg/kg	Protege contra la muerte por una dosis letal de microcistina-LR en ratones (Wellington et al., 2001).
silybina	10 mg/kg	Confiere protección contra la citotoxicidad por Ciclosporina A en el páncreas de ratas (von Schönfeld et al., 1997).
silybina	25 mg/kg	Confiere protección contra el daño hepático por Concanavalina A en ratones (Schümann et al., 2003).

#### 7.4. Efecto Inmunomodulador

Las propiedades moduladoras de la respuesta inmunológica de la silymarina participan protegiendo en el daño hepático y la fibrosis inducidos por diferentes agentes tóxicos como tetracloruro de carbono, palloidina y concanavalina A (Shi et al., 1997; Schümann et al., 2003; Jonson et al., 2002). Se ha demostrado que los linfocitos T son importantes en el inicio y durante la fase de reparación en el daño hepático inducido por tetracloruro de carbono y concanavalina A (Shi et al., 1997; Schümann et al., 2003). El tratamiento *in vitro* con silymarina incrementa la proliferación de los linfocitos T murinos, de los linfocitos T de pacientes con cirrosis alcohólica y de linfocitos T de rata (Agoston et al., 2001, Lang et al., 1988, Lang et al., 1990a; Lang et al.,

1990b, Wilasrusmee et al., 2003). También se observó que la administración de silymarina en ratones BALB/c incrementó la proliferación tanto de linfocitos T CD4+ como T CD8+ obtenidos de timo y de bazo (Johnson et al., 2002; Johnson et al., 2003). Sin embargo, también se ha reportado que el tratamiento *in vitro* con silybina inhibe la proliferación de linfocitos T de humano, de linfocitos T de pacientes con cirrosis alcohólica (Deak et al., 1990, Meroni et al., 1988). Adicionalmente, se observó que el tratamiento con silymarina inhibe la migración de linfocitos T en diferentes modelos de inflamación aguda (de la Puerta et al., 1996).

Por otro lado, las dosis bajas de silymarina tiene un efecto inhibitor sobre la proliferación y la función de los linfocitos T en ratones BALB/c normales (Johnson et al., 2003). También se ha reportado que el tratamiento con la silymarina reduce el porcentaje de linfocitos T CD8+ y suprime su citotoxicidad en pacientes con cirrosis alcohólica (Lang et al., 1988, Lang et al., 1990a; Lang et al., 1990b).

La silymarina también puede ejercer sus efectos inmunomoduladores sobre otro tipo de células. Recientemente se reportó que la administración de silymarina inhibe tanto *in vitro* como *in vivo* el proceso de maduración de las células dendríticas y su capacidad de inducir linfocitos Th1 en ratones normales (Lee et al., 2007). Por otro lado, también se sabe que silymarina puede inhibir la producción y expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina inducidas por TNF $\alpha$  en células endoteliales de humano (Kang et al., 2003).

Adicionalmente, se ha reportado que la silymarina modula la producción y expresión de citocinas inflamatorias y anti-inflamatorias *in vitro* e *in vivo*. El tratamiento con silymarina incrementa la producción de citocinas como IL4, IL10 e IFN $\gamma$  en linfocitos T *in vitro* e indujo un incremento en la síntesis de IL10 en el daño hepático inducido por concanavalina A (Schüman et al., 2003, Wilasrusmee et al., 2003). Por otro lado, la administración de silymarina a ratones normales induce la expresión del RNA mensajero de TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  e IL6 en linfocitos T y de TGF $\beta$  en hepatocitos (Johnson et al., 2003; He et al., 2002).

Diversos reportes han mostrado un fuerte efecto antiinflamatorio de silymarina en varios modelos de daño tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, el tratamiento con la silymarina inhibe la expresión del RNA mensajero y bloquea las secreciones de TNF $\alpha$ , IL6 e IL8 inducidas por etanol y metotrexate tanto en hepatocitos de rata como de humanos (Neuman et al., 1999). Asimismo, la silymarina puede inhibir la producción y expresión del RNA mensajero de TNF $\alpha$  inducida por anticuerpos anti-CD3 en células mononucleares de humano (Polyak et al., 2007).

También ha sido descrito que la silymarina inhibe la producción de citocinas inflamatorias (IL1 $\beta$ , IFN $\gamma$  e IFN $\alpha$ ) inducidas por lipopolisacáridos en macrófagos y linfocitos T (Kang et al., 2004; Cho et al., 2000). Igualmente se ha reportado que el tratamiento con la silybina inhibe la expresión de citocinas pro-inflamatorias (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL2) y antiinflamatorias como IL4 en el daño hepático inducido por concanavalina A o por fumonicina B<sub>1</sub> (He et al., 2004, Schüman et al., 2003). Adicionalmente, la administración de silymarina disminuye la expresión del RNA mensajero de IL2 e IL4 en linfocitos T de timo y bazo en ratones normales (Johnson et al., 2002; Johnson et al., 2003). Recientemente se reportó que la administración de silybina inhibe la producción de citocinas como IL4, IL12 e IFN $\gamma$  inducidas por lipopolisacáridos en células dendríticas de ratones normales (Lee et al., 2007).

Estos efectos inmunomoduladores que presenta la silymarina podrían ser ejercidos a través de la supresión de algunas vías de señalización. Recientemente se ha reportado que la silymarina inhibe la activación de MAPKs cinasas, cinasa terminal N c-Jun, cinasa Janus, transductores de señales y vías de transcripción, la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, la apoptosis inducida por TNF $\alpha$  e inhibe la fosforilación y degradación de I $\kappa$ Ba, una proteína inhibidora de NF- $\kappa$ B (Manna et al., 1999; Schüman et al., 2003; Matsuda et al., 2005). Aunque, las bases moleculares del efecto inmunomodulador que presenta la silymarina aún no se comprenden completamente, los reportes sugieren que podrían estar relacionadas con la inhibición de NF- $\kappa$ B y las cinasas, los cuales regulan y coordinan la transcripción y expresión de varios genes involucrados en los procesos inflamatorios.

## II. JUSTIFICACIÓN

La DM es un problema de salud pública en México que genera altos costos al sistema de salud. En México la diabetes tipo 1 corresponde al 5-10% de los casos con diabetes mellitus y la prevalencia estimada en la población menor de 15 años es del 2.6% (Federación Internacional de Diabetes).

La DMT1 es una enfermedad sistémica y crónica causada por una deficiencia en la secreción de la insulina y se caracteriza por la elevación anormal de la glucosa sérica. Tanto los factores ambientales, los factores genéticos como los factores inmunológicos contribuyen a la destrucción de las células  $\beta$ . La respuesta inmunológica tiene un papel fundamental en la destrucción de las células  $\beta$  del páncreas al generar una reacción inflamatoria predominantemente de tipo Th1 mediada por linfocitos T CD4+ y CD8+ autoreactivos, macrófagos, células natural killer, linfocitos B y autoanticuerpos dirigidos contra los islotes pancreáticos, la insulina y la descarboxilasa del ácido glutámico (BoTTazo et al., 1985; Lacy et al., 1994; Savinov et al., 2003).

Hasta el momento, el manejo terapéutico de la DMT1 se ha limitado principalmente a la administración de insulina y al control de la glucosa sérica, pero no al restablecimiento de la función del páncreas, por lo que los estudios destinados a modular la respuesta inmunológica y/o restablecer la función pancreática adquieren una gran importancia. La silymarina, es un flavonoide de la planta *Silybum marianum*, tiene propiedades inmunomoduladoras en linfocitos de bazo de ratones normales. También se ha observado que favorece los perfiles de tipo Th2 y que ayuda a recuperar la función pancreática en un modelo de diabetes farmacológica (He et al., 2002; Johnson et al., 2003; Schuman et al., 2003; Soto et al., 2004; Wilasrusmee et al., 2003).

Estas propiedades de la silymarina resultan ser de gran interés en el manejo terapéutico integral de la DMT1 no solo en los ratones ya con destrucción de las células  $\beta$  sino también en aquellos que aun están en un estado prediabético. Finalmente, se vuelve de gran relevancia explorar estas propiedades en los tratamientos a largo plazo dado que la diabetes es una enfermedad crónica.

### **III. HIPÓTESIS**

Por sus propiedades moduladoras de la respuesta inmunológica la Silymarina pudiera revertir el perfil Th1 a Th2 al inducir la expresión de citocinas anti-inflamatorias en el tejido pancreático de ratones ICR, ratones NOD prediabéticos y diabéticos con tratamientos a corto y largo plazo; de esta manera la silymarina pudiera favorecer una regulación de la respuesta inmunológica y contribuir a la recuperación de la función pancreática en el modelo murino de diabetes mellitus tipo 1.

### **IV. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la modulación de la respuesta inmunológica inducida por Silymarina con tratamientos a corto y largo plazo en el tejido pancreático de ratones normales ICR; así como su modulación y participación en la recuperación de la función de las células  $\beta$  del páncreas en ratones NOD prediabéticos y diabéticos de reciente inicio.

### **V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**1.1** Evaluar la modulación de la respuesta inmunológica en el tejido pancreático de ratones normales ICR inducida por el tratamiento a corto (5 días) y largo plazo (60 días) con silymarina.

**1.1.1** Estudiar la expresión de MHCII, citocinas inflamatorias ( $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$ ) en el tejido pancreático de ratones normales tratados durante 5 y 60 días con 250 mg/kg de peso de silymarina y ratones normales no tratados, utilizando las técnicas de inmunohistoquímica y análisis digital de imágenes.

**1.1.2** Estudiar la expresión de citocinas antiinflamatorias ( $\text{IL}10$ ,  $\text{IL}4$  y  $\text{TGF}\beta$ ) en el tejido pancreático de ratones normales tratados durante 5 y 60 días con 250 mg/kg de peso de silymarina y ratones normales no tratados, utilizando las técnicas de inmunohistoquímica y análisis digital de imágenes.

**1.1.3** Analizar los niveles de expresión de insulina en islotes del páncreas de ratones normales tratados durante 5 y 60 días con 250 mg/kg de peso de silymarina y ratones normales no tratados, utilizando las técnicas de inmunohistoquímica y análisis digital de imágenes.

**1.2** Evaluar la modulación de la respuesta inmunológica en el tejido pancreático y su participación en la recuperación de la función de las células  $\beta$  del páncreas en ratones NOD prediabéticos inducidas por el tratamiento a largo plazo con silymarina.

**1.2.1** Estudiar la expresión de MHCII, citocinas inflamatorias en el tejido pancreático de ratones NOD prediabéticos tratados 30 días con 250 mg/kg de peso de silymarina y ratones NOD prediabéticos no tratados, utilizando las técnicas de inmunohistoquímica y análisis digital de imágenes.

**1.2.2** Estudiar la expresión de citocinas antiinflamatorias en el tejido pancreático de ratones NOD prediabéticos tratados 30 días con 250 mg/kg de peso de silymarina y ratones NOD prediabéticos no tratados, utilizando las técnicas de inmunohistoquímica y análisis digital de imágenes.

**1.2.3** Evaluar la insulinitis en el páncreas de ratones NOD prediabéticos tratados 30 días con 250 mg/kg de peso de silymarina y ratones NOD prediabéticos no tratados, utilizando la tinción con hematoxilina eosina y análisis digital de imágenes.

**1.2.4** Evaluar los niveles de glucosa sérica en ratones NOD prediabéticos tratados 30 días con 250 mg/kg de peso de silymarina y ratones NOD prediabéticos no tratados, utilizando un glucómetro estándar.

**1.2.5** Evaluar la función de las células  $\beta$  del páncreas determinando los niveles de expresión de insulina en el tejido pancreático de ratones NOD prediabéticos tratados 30 días con 250 mg/kg de peso de silymarina y ratones NOD prediabéticos no tratados, utilizando las técnicas de inmunohistoquímica y análisis digital de imágenes.

**1.3** Evaluar la modulación de la respuesta inmunológica en el tejido pancreático y su participación en la recuperación de la función de las células  $\beta$  del páncreas de ratones NOD diabéticos de reciente inicio inducidas por el tratamiento a largo plazo con silymarina.

**1.3.1** Estudiar la expresión de MHCII, citocinas inflamatorias en el tejido pancreático de ratones NOD diabéticos tratados 60 días con 250 mg/kg de peso de silymarina y ratones NOD diabéticos no tratados, utilizando las técnicas de inmunohistoquímica y análisis digital de imágenes.

**1.3.2** Estudiar la expresión de citocinas antiinflamatorias en el tejido pancreático de ratones NOD diabéticos tratados 60 días con 250 mg/kg de peso de silymarina y ratones NOD diabéticos no tratados, utilizando las técnicas de inmunohistoquímica y análisis digital de imágenes.

**1.3.3** Evaluar la insulinitis en el páncreas de ratones NOD diabéticos tratados 60 días con 250 mg/kg de peso de silymarina y ratones NOD diabéticos no tratados, utilizando la tinción con hematoxilina eosina y análisis digital de imágenes.

**1.3.4** Evaluar los niveles de glucosa sérica en ratones NOD diabéticos tratados 60 días con 250 mg/kg de peso de silymarina y ratones NOD diabéticos no tratados, utilizando un glucómetro estándar.

**1.3.5** Evaluar la función de las células  $\beta$  del páncreas determinando los niveles de expresión de insulina en el tejido pancreático de ratones NOD diabéticos tratados 60 días con 250 mg/kg de peso de silymarina y ratones NOD diabéticos no tratados, utilizando las técnicas de inmunohistoquímica y análisis digital de imágenes.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Animales

Se utilizaron ratones hembra de la cepa ICR (CD1) de 16 semanas de edad, ratones hembras NOD prediabéticas de 8 semanas de edad y diabéticas de reciente inicio (aproximadamente de 15 a 20 semanas de edad). Los ratones fueron mantenidos en un ciclo luz:oscuridad 14:10, con agua y comida *ad libitum*. La administración de la silymarina fue intraperitoneal siguiendo el esquema abajo descrito. El sacrificio de los ratones se realizó con una sobredosis de pentobarbital sódico (20 mg/kg de peso corporal) administrado vía intraperitoneal. Se siguieron las disposiciones planteadas por la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) en el manejo de los animales. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina donde se realizó el trabajo.

### 2. Tratamiento con la silymarina

#### 2.1 Ratones ICR.

El fármaco fue administrado vía intraperitoneal en dosis de 250 mg/kg de peso corporal de silymarina en 300  $\mu$ l de PBS a de ratones ICR hembras de 16 semanas de edad (n=5/grupo), con un peso aproximado de 30-35 g. El grupo a corto plazo (5 días) recibió 5 administraciones diarias, mientras que el grupo a largo plazo (60 días) recibió 5 administraciones diarias y posteriormente una semanal hasta completar ocho semanas de tratamiento (Tabla 4). Los grupos control únicamente se les administró el vehículo, PBS, siguiendo el mismo esquema de tratamiento.

Tabla 4. Ratones ICR controles y tratados con la silymarina.

Grupos	Silymarina Dosis (mg/kg)	Tratamiento
Control corto plazo (n=5)	–	1 dosis diaria por 5 días
Tratados corto plazo (n=5)	250	1 dosis diaria por 5 días
Control largo plazo (n=5)	–	1 dosis diaria por 5 días y 1 dosis semanal hasta completar 8 semanas (60 días)
Tratados largo plazo (n=5)	250	1 dosis diaria por 5 días y 1 dosis semanal hasta completar 8 semanas (60 días)

## 2.2 Ratones NOD

### 2.2.1 NOD prediabéticos

La silymarina fue administrada por vía intraperitoneal a ratones NOD hembras prediabéticas de ocho semanas de edad (4/grupo), en dosis diarias durante 5 días y posteriormente una administración semanal hasta completar ocho semanas de tratamiento en dosis de 250 mg/kg de peso corporal de silymarina en 300 µl de PBS (Tabla 5). Los grupos control únicamente se les administró el vehículo, PBS, siguiendo el mismo esquema de tratamiento.

### 2.2.2 NOD diabéticos de reciente inicio

Se determinó semanalmente la presencia de glucosuria en las ratonas NOD para establecer el cuadro diabético, el cual se corroboró con dos mediciones consecutivas de la glucosa sérica con un glucómetro estándar (>120mg/dl en ayuno). La silymarina fue administrada por vía intraperitoneal a ratones NOD hembras diabéticas de reciente inicio (6/grupo), aproximadamente de 15 a 20 semanas de edad, en dosis diarias durante 5 días y posteriormente una administración semanal hasta completar ocho semanas de tratamiento en dosis de 250 mg/kg de peso corporal de silymarina en 300 µl de PBS (Tabla 5). Los grupos control únicamente se les administró el vehículo, PBS, siguiendo el mismo esquema de tratamiento.

Tabla 5. Ratones NOD controles y tratados con silymarina.

Grupos	Silymarina Dosis (mg/kg)	Tratamiento
<b>Control Pre-diabéticos</b> (n=4)	–	1 dosis diaria por 5 días y 1 dosis semanal hasta completar 4 semanas (30 días)
<b>Tratados Pre-diabéticos</b> (n=6)	250	1 dosis diaria por 5 días y 1 dosis semanal hasta completar 4 semanas (30 días)
<b>Control Diabéticos</b> (n=4)	–	1 dosis diaria por 5 días y 1 dosis semanal durante 8 semanas
<b>Tratados Diabéticos</b> (n=6)	250	1 dosis diaria por 5 días y 1 dosis semanal durante 8 semanas

## 3. Inmunohistoquímica

Los ratones de los diferentes grupos se sacrificaron al término del tratamiento, se obtuvo el páncreas y se congeló en fresco por inmersión en 2-metilbutano pre-enfriado con hielo seco, los

tejidos congelados se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Se realizaron cortes seriados de  $5\ \mu\text{m}$  de espesor cada  $50\ \mu\text{m}$  a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  utilizando un criostato. Los cortes se colocaron en laminillas cubiertas con gelatina y se fijaron durante 1 hora en paraformaldehído al 4 %. Posteriormente, se inactivó la actividad de peroxidasa endógena en el tejido con 3 % de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en buffer de fosfatos (PB; 0.1M, pH 7.4) durante 20 minutos y se lavaron 2 veces por 3 minutos con PB. Las laminillas fueron incubadas con una solución de bloqueo (3 % de albúmina sérica bovina, 0.3 % de tritón X-100) a temperatura ambiente durante 90 minutos. Se agregó el anticuerpo primario rata anti-TNF $\alpha$  de ratón, conejo anti-TGF $\beta$  de ratón, rata anti-IL4 de ratón, rata anti-IL10 de ratón (todos de Serotec; a una dilución 1:50, excepto TGF $\beta$  a una dilución 1:250), o rata anti-MHCII de ratón, rata anti-IFN $\gamma$  de ratón (Chemicon; a una dilución 1:500), ratón anti-insulina biotinilado (Abcam; dilución 1:500), diluidos en la solución de bloqueo. El anticuerpo primario se incubó durante 16 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ . Al día siguiente las laminillas se lavaron 2 veces por 5 minutos con solución de lavado (0.3% de tritón X-100). Posteriormente, las laminillas se incubaron por 90 minutos a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios biotinilados dirigidos contra IgGs de rata (Chemicon, a una dilución 1:500) o conejo (Vector, a una dilución 1:500), en correspondencia con los anticuerpos primarios utilizados, a excepción de las laminillas para insulina las cuales se incubaron con avidina/peroxidasa para su revelación (ver más adelante). Una vez concluido el tiempo de incubación, se retiró el exceso de anticuerpo y las laminillas se lavaron dos veces por 5 minutos con la solución de lavado. Las laminillas se incubaron con el complejo avidina-peroxidasa (Elite AB Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) por 90 minutos a temperatura ambiente, se lavaron dos veces con PB, y la actividad de peroxidasa se reveló con un kit de 3,3- diaminobencidina y peróxido de hidrógeno de acuerdo al protocolo recomendado por el proveedor (Vector Laboratories). Como control de los experimentos se omitió el anticuerpo primario y se incubó con el anticuerpo secundario. Se realizó una contra-tinción con hematoxilina acuosa (Biomedica) por 3 minutos, se lavaron con agua corriente para quitar el exceso de colorante, se colocaron en carbonato de litio al 40 % durante unos segundos. Posteriormente las laminillas fueron deshidratadas en soluciones crecientes de etanol. Finalmente se montaron con Cytoseal y se observaron en un microscopio Nikon de campo claro. Se capturaron imágenes con una cámara digital (Nikon DXM1200F) y fueron convertidas a escala de grises con el programa Adobe Photoshop. Estas fotografías fueron utilizadas para analizar la expresión de citocinas en los acinos e islotes pancreáticos. Para ello, se determinó el

nivel de expresión para cada uno de los antígenos y se determinó su densidad utilizando el software Imagen J, la expresión de la marca se reportó como densidad integrada en píxeles sobre  $\mu\text{m}^2$ . Los datos obtenidos fueron contrastados estadísticamente utilizando una t de Student fijando la significancia estadística en una  $p < 0.05$ .

#### ***4. Evaluación de la insulitis***

El grado de insulitis fue evaluado en al menos 20 islotes de Langerhans de cortes pancreáticos seriados de 5  $\mu\text{m}$  de grosor teñidos con hematoxilina-eosina.

Se usaron los siguientes parámetros para determinar el grado de insulitis:

0. Sin infiltración, islotes intactos.
- I. Menos de 10 células linfoides peri-insulares, islotes intactos.
- II. De 10 a 20 células linfoides peri- e intra-insulares, islotes intactos.
- III. Más de 20 células linfoides peri- e intra-insulares, pero menos del 50% del islote remplazado o destruido.
- IV. Con infiltrado linfoide masivo, más del 50% del islote remplazado o destruido.

#### ***5. Determinación de los niveles de glucosa***

Los ratones NOD prediabéticos y diabéticos estuvieron 4 horas en ayuno (de 08:00 a 12:00 hrs.), la obtención de sangre fue a través del sangrado de la base de la cola. Una vez iniciado el tratamiento con silymarina, se determinaron los niveles de glucosa sanguínea semanalmente con una gota de sangre usando un glucómetro estándar.

## VII. RESULTADOS

### 1. Ratones ICR

#### 1.1. Expresión basal de citocinas en condiciones fisiológicas

En condiciones fisiológicas detectamos una expresión basal de MHCII,  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$ , IL10 y  $TGF\beta$  principalmente en los acinos pancreáticos (Fig. 2. A, D, G; Fig. 3 A; Fig. 4 y Fig. 5), mientras que la expresión de IL4 fue escasa en el tejido acinar (Fig. 3. D y G; Fig. 5). En contraste, la expresión de todas las citocinas y el MHCII en los islotes fue muy baja (Fig. 2; Fig. 3; Fig. 4 y Fig. 5). Los controles de 5 días no mostraron diferencias significativas en la densidad de expresión de las citocinas y el MHCII que los controles de 60 días, por lo que en la figura 2 y 3 se muestran únicamente los controles de 5 días (Fig. 4).

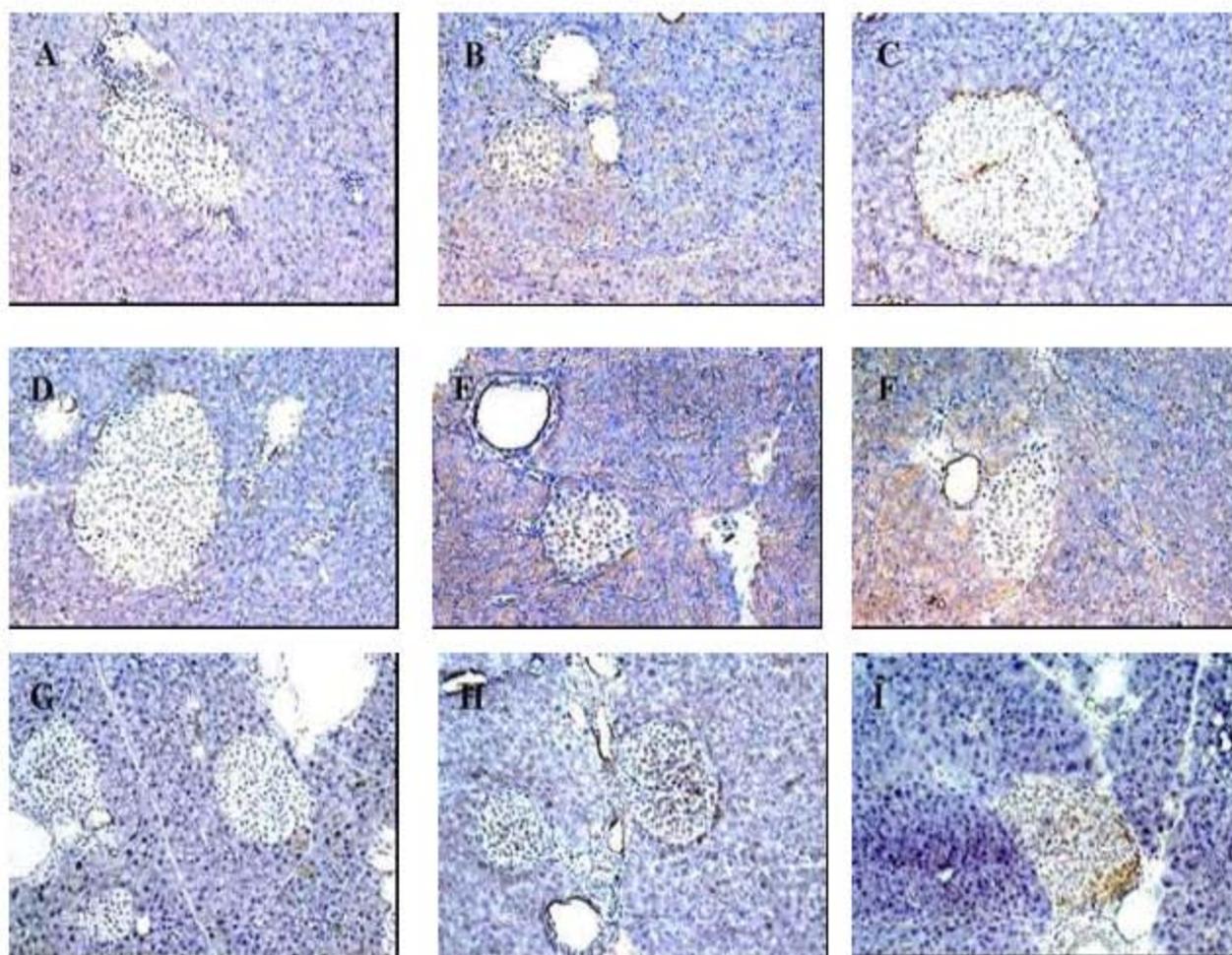


Fig. 2. Expresión de MHCII y de citocinas inflamatorias en el páncreas de ratones ICR controles (A, D, G) y de ratones tratados con 250 mg/kg de peso de silymarina durante 5 (B, E, H) y 60 días (C, F, I). A-C muestran la expresión de MHCII; D-F de  $IFN\gamma$ ; G-I de  $TNF\alpha$ . Las imágenes fueron tomadas a 10x.

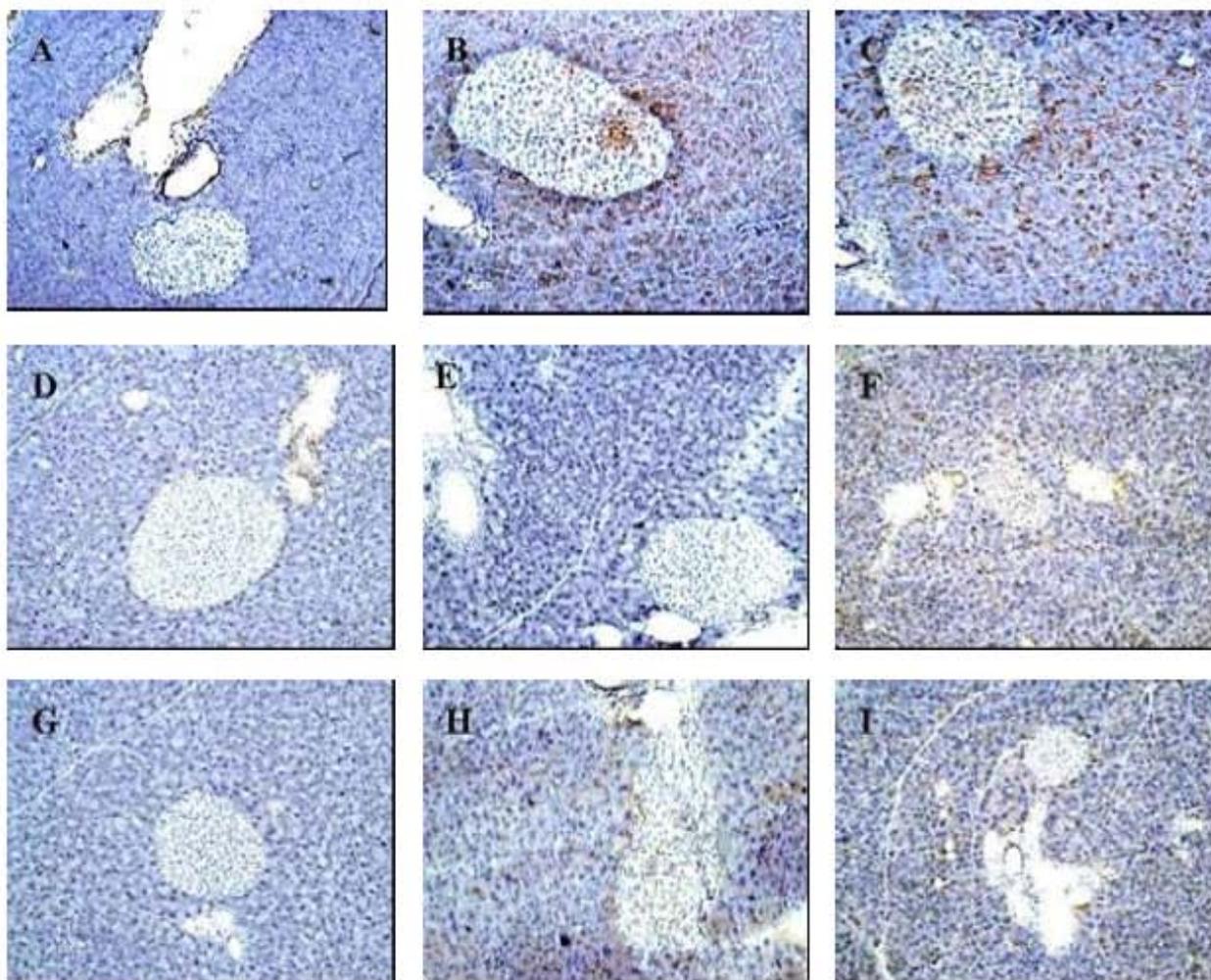


Fig. 3. Expresión de citocinas antiinflamatorias en el páncreas de ratones ICR controles (A, D, G) y de ratones tratados con 250 mg/kg de peso de silymarina durante 5 (B, E, H) y 60 días (C, F, I). A-C muestran la expresión de IL10; D- F de TGF $\beta$ ; G-I de IL4. Las imágenes fueron tomadas a 10x.

### ***1.2. La modulación de las citocinas antiinflamatorias se da principalmente en el tratamiento a largo plazo***

El tratamiento con silymarina a corto plazo induce principalmente la expresión de IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  tanto en los acinos pancreáticos como en los islotes, aunque la expresión es mayor en el tejido acinar (Fig. 2 E y H; Fig. 4). La expresión de MHCII mostró un perfil similar (Fig. 2 B; Fig. 4). En contraste, no detectamos la expresión de las citocinas anti-inflamatorias IL4 y TGF $\beta$  (Fig. 3 E y H; Fig. 5), mientras que la IL10 estaba presente tanto en los acinos pancreáticos como en los islotes de Langerhans (Fig. 3 B; Fig. 5). El incremento en la expresión de las citocinas

inflamatorias, IL10 y el MHCII en los islotes y en los acinos pancreáticos fue estadísticamente significativo al ser comparados con el grupo control de 5 días, mientras que TGF $\beta$  únicamente denotó una diferencia estadísticamente significativa en los islotes (Fig. 4; Fig. 5).

En contraste con el tratamiento a corto plazo, a largo plazo se inducen predominantemente las citocinas antiinflamatorias. Tanto la expresión de IL4, IL10 como de TGF $\beta$  se incrementó significativamente tanto en los acinos como en los islotes, aunque su expresión fue mayor en el tejido acinar (Fig. 3 C, F e I; Fig. 5). Por el otro lado, tanto en los islotes como en los acinos pancreáticos la expresión de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  y de MHCII disminuyó a los niveles basales de los controles a excepción de TNF $\alpha$  que disminuyó su expresión en los islotes pero no llegó a los niveles basales (Fig. 2 C, F e I; Fig. 4). La disminución de la expresión de IFN $\gamma$  y el MHCII fue estadísticamente significativa al ser comparados con el grupo tratado de 5 días tanto en los acinos como en los islotes, mientras que TNF $\alpha$  únicamente fue significativa su disminución en los acinos ya que en los islotes permanece elevada estadísticamente significativa con respecto a los controles de 60 días (Fig. 4). El aumento en la expresión de las citocinas antiinflamatorias fue estadísticamente significativo al ser comparado con los controles de 60 días y con el grupo tratado de 5 días.

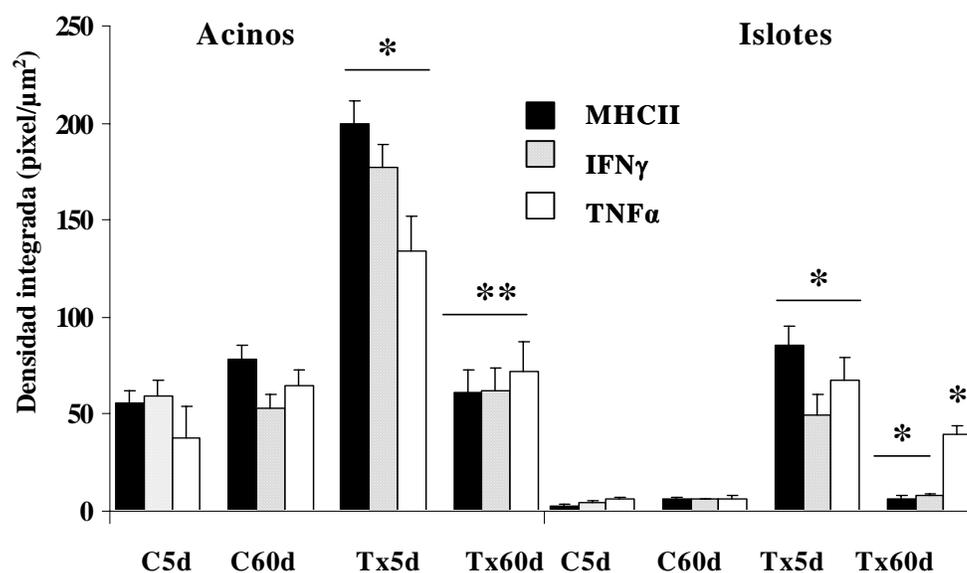


Fig. 4. Cuantificación de la expresión de MHCII y de las citocinas inflamatorias en ratones ICR controles y tratados a 5 y 60 días con 250 mg/kg de silymarina. Los resultados son presentados como densidad integrada de la marca (media  $\pm$  desviación estándar) de 5 ratones por grupo. Las diferencias fueron estadísticamente significativas con una  $p < 0.05$  cuando se comparó el grupo tratado con el grupo control (\*), y cuando se comparó entre los grupos tratados (\*\*).

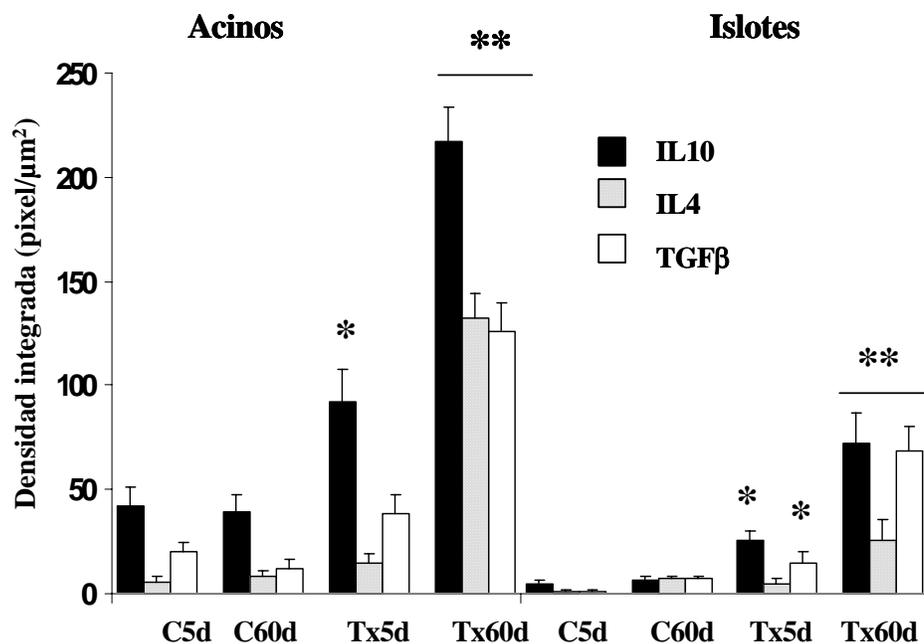


Fig. 5. Cuantificación de la expresión de citocinas antiinflamatorias en ratones ICR controles y de ratones tratados a 5 y 60 días con 250 mg/kg de silymarina. Los resultados son presentados como densidad integrada de la marca (media  $\pm$  desviación estándar) de 5 ratones por grupo. Las diferencias fueron estadísticamente significativas con una  $p < 0.05$  cuando se comparó el grupo tratado con el grupo control (\*), y cuando se comparó entre los grupos tratados (\*\*).

### 1.3. La silymarina incrementa la expresión de insulina

El tratamiento a corto plazo no mostró diferencias en la expresión de insulina con respecto a sus controles no tratados de 5 días (Fig. 6. A, B y D). En contraste, el tratamiento a largo plazo incrementó significativamente la expresión de insulina con respecto al grupo tratado de 5 días (Fig. 6 C y D).

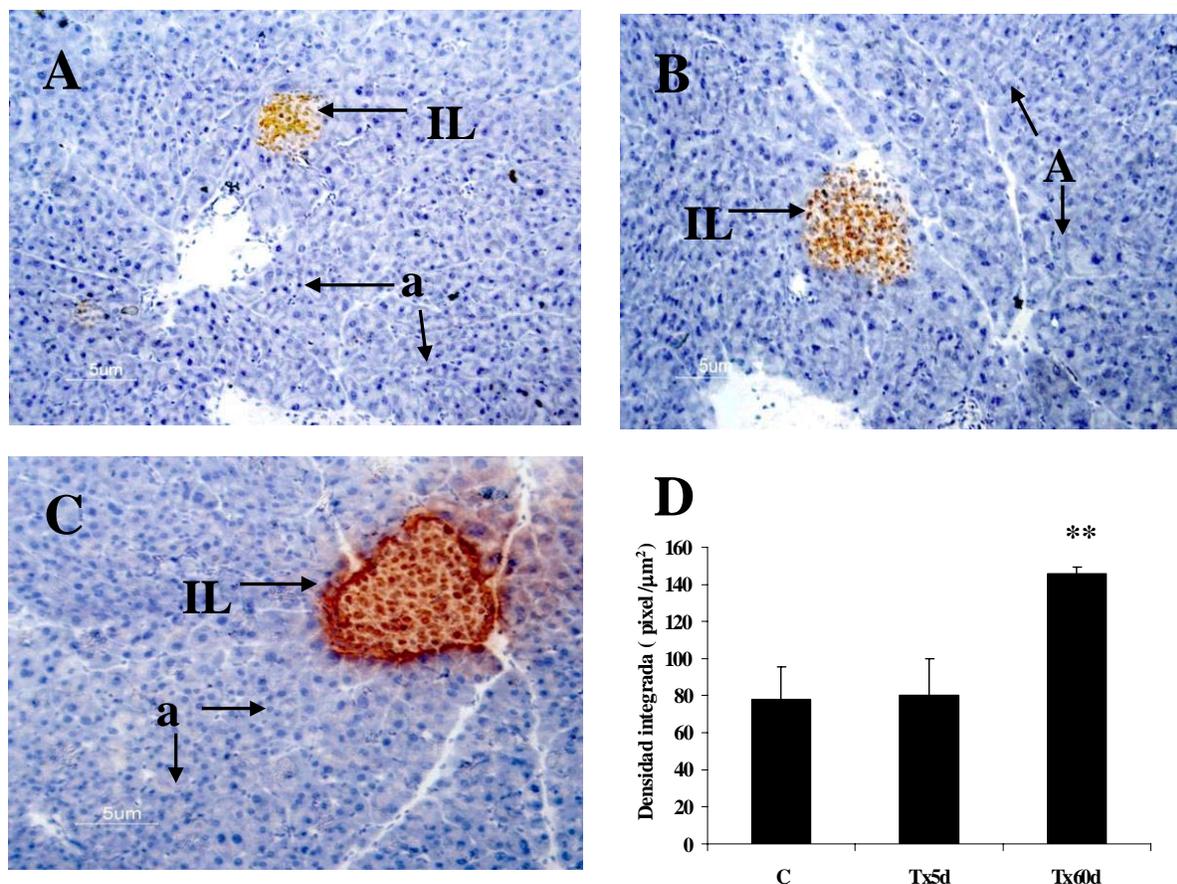


Fig. 6. Expresión (A-C) y cuantificación (D) de insulina en ratones ICR controles (A), tratados durante 5 (B) y 60 días (C) con 250 mg/kg de peso de silymarina. El asterisco (\*\*) señala los resultados que son estadísticamente significativos con una  $p < 0.05$ , cuando se comparó entre los grupos tratados.

## 2. Ratones NOD prediabéticos

### 2.1. La silymarina disminuye los niveles de glucosa y afecta la sobrevivencia

Al inicio del tratamiento las concentraciones de glucosa sanguínea fueron de  $86 \pm 14$  mg/dl y de  $83 \pm 9$  mg/dl en el grupo control y en el grupo tratado respectivamente (Fig. 7. A). A la semana del tratamiento ambos grupos incrementaron las concentraciones de glucosa a  $123 \pm 6$  mg/dl, este aumento se mantuvo en los ratones control en tanto que los ratones del grupo tratado con la silymarina redujeron las concentraciones de glucosa ( $99 \pm 9$  mg/dl) a partir de la segunda semana, observándose reducciones significativas a la tercera y cuarta semana de tratamiento (Fig. 7. A).

Por otro lado, los ratones prediabéticos tratados presentaron únicamente un 50% de sobrevida con respecto a los ratones controles que presentaron un 100 % (Fig. 7. B), motivo por el cual el tratamiento fue interrumpido al finalizar las 4 semanas de tratamiento.

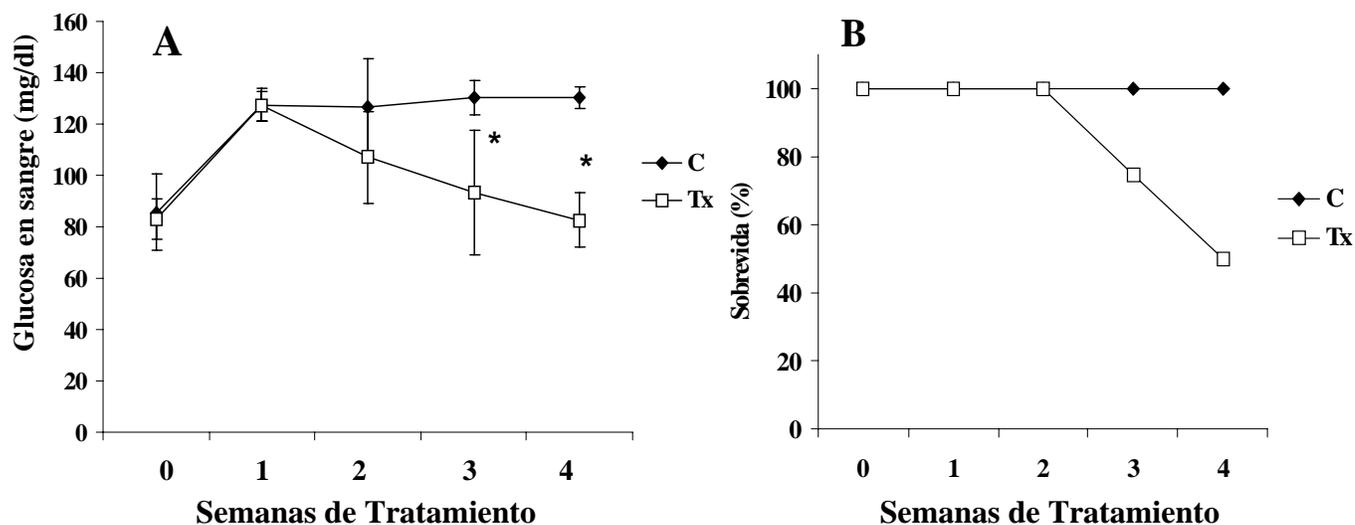


Fig. 7. Niveles de glucosa sérica (A) y porcentaje de sobrevida (B) en ratones NOD prediabéticos controles y tratados con 250 mg/kg de peso de silymarina durante 4 semanas. C: grupo control, Tx: grupo tratado con silymarina. El asterisco (\*) señala los resultados que son estadísticamente significativos con una  $p < 0.05$ , cuando se comparó entre los grupos tratados.

## 2.2. La silymarina disminuye el daño

El nivel del daño de los islotes pancreáticos se analizó en cortes histológicos del tejido pancreático tanto de los ratones NOD prediabéticos controles como de los tratados. En la figura 8 A y B se muestra un corte histológico representativo del páncreas de un ratón prediabético control y uno tratado. En los cortes se distinguen los conductos pancreáticos, acinos pancreáticos rodeando los islotes de Langerhans, los vasos sanguíneos los islotes rodeados por un infiltrado inflamatorio. Se evaluó el grado de insulitis en al menos 20 islotes de Langerhans teñidos con hematoxilina y eosina. Al realizar la determinación de la insulitis se observó que los ratones tratados con 250 mg/kg de silymarina durante 4 semanas presentaron sólo un 20% de islotes con daño grado IV, mientras que los ratones control presentaron hasta 40% de islotes con insulitis grado IV (Fig. 8C).

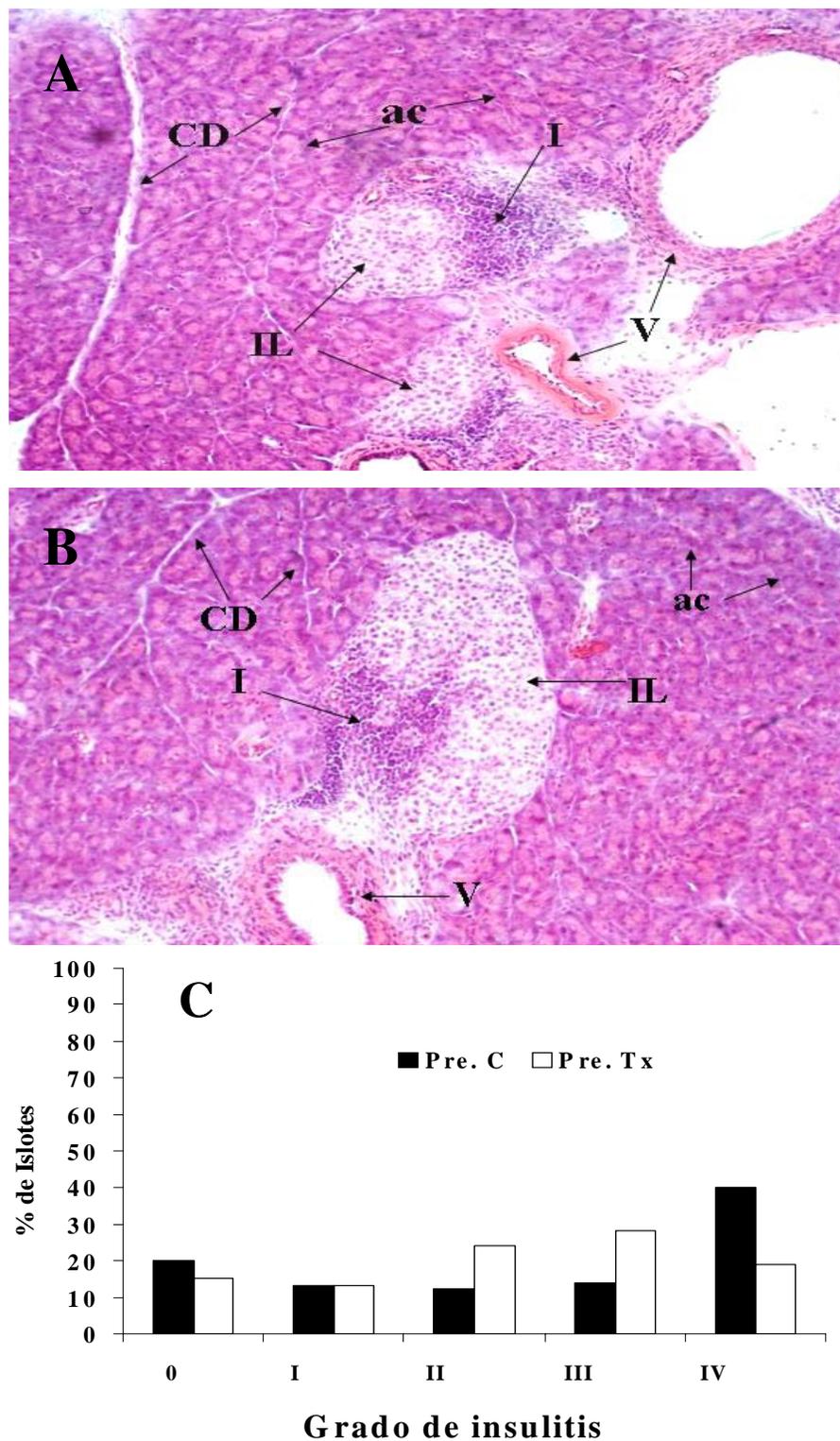


Fig. 8. Tejidos pancreáticos con procesos inflamatorios teñidos con hematoxilina y eosina de ratones NOD prediabéticos control (A) y tratados con 250 mg/kg de peso de silymarina por 4 semanas (B). Porcentaje de insulitis en los islotes de ratones NOD prediabéticos controles y tratados (C), en las barras negras se representan los ratones prediabéticos controles y en las blancas los tratados. ac: Acinos pancreáticos; CD: Conductos pancreáticos; IL: Islotes de Langerhans; I: Infiltrado inflamatorio; V: vasos sanguíneos. Imágenes tomadas al aumento 10X.

### ***2.3. El tratamiento con la silymarina modula la expresión de citocinas inflamatorias***

El tratamiento de 4 semanas con la silymarina no indujo cambios en la expresión de MHCII e IFN $\gamma$  en los acinos pancreáticos de los ratones NOD prediabéticos tratados con respecto a los controles (Fig. 9 A-D). Sin embargo, se observó una mayor intensidad de la marca de MHCII e IFN $\gamma$  en la periferia y dentro de los islotes (Fig. 9 A-D), así como entre las células del infiltrado inflamatorio (Fig. 9 D). La diferencia en expresión fue estadísticamente significativa en los islotes (Fig. 11). Por otro lado, TNF $\alpha$  se expresó significativamente más en los acinos de los ratones prediabéticos tratados con respecto a los controles pero no en los islotes (Fig. 9 E y F; Fig. 11).

### ***2.4. La silymarina incrementa la expresión de TGF $\beta$***

No hubo diferencias significativas en la expresión de IL10 e IL4 en el tejido pancreático de los ratones NOD prediabéticos tratados con respecto a los controles (Fig. 10 A y B, E y F; Fig. 12), únicamente se observó un incremento en la expresión de TGF $\beta$  (Fig. 11. C y D). Este incremento de TGF $\beta$  fue estadísticamente significativo tanto en los acinos como en los islotes pancreáticos de los ratones NOD prediabéticos tratados con respecto a los controles (Fig. 12).

### ***2.5. La silymarina incrementa la expresión de insulina***

La expresión de insulina en los islotes de los ratones prediabéticos tratados incrementó significativamente con respecto a los controles (Fig. 13).

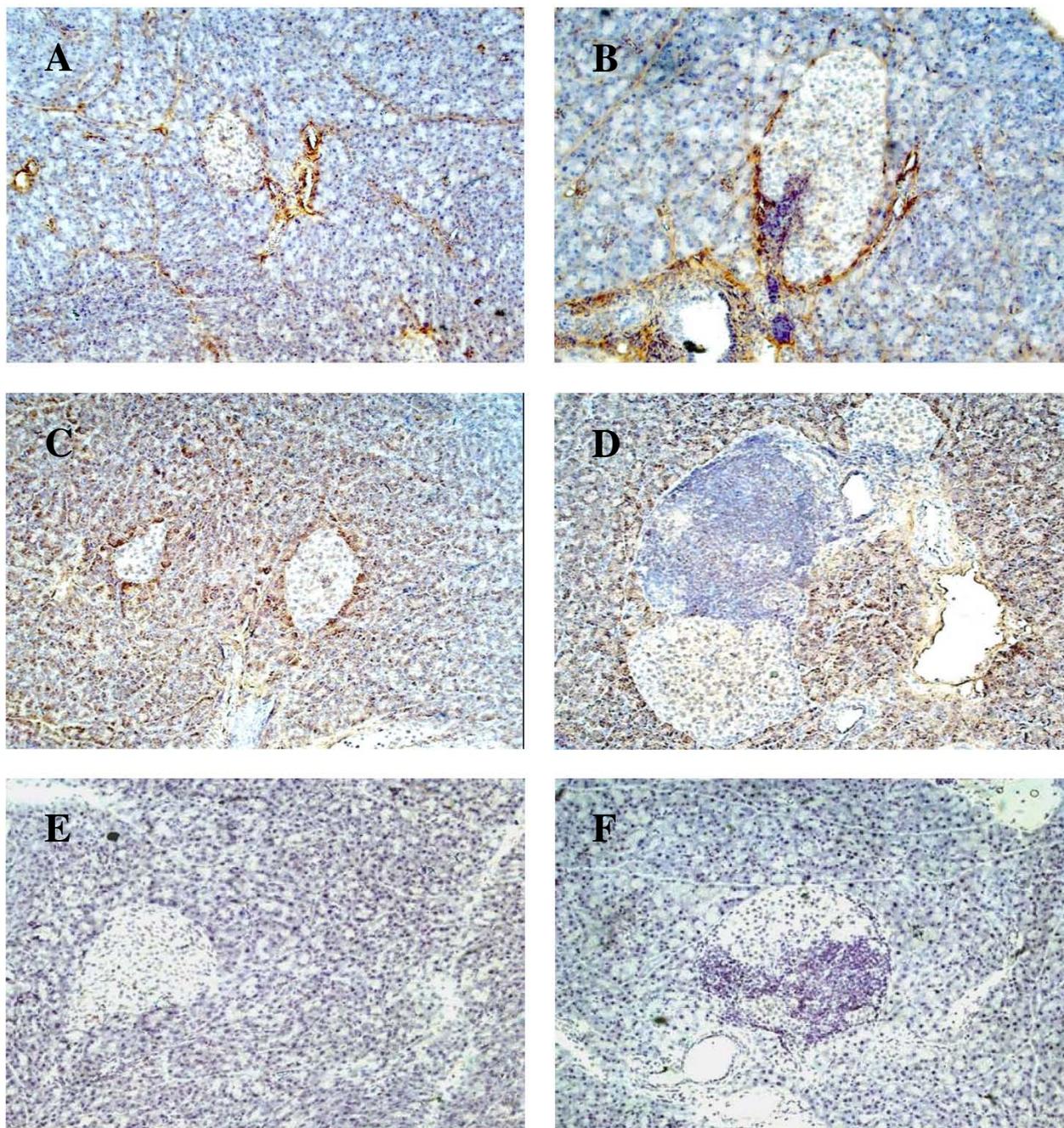


Fig. 9. Expresión de MHCII y citocinas proinflamatorias en el páncreas de ratones prediabéticos controles (A, C, E) y prediabéticos tratados con 250 mg/kg de peso de silymarina durante 4 semanas (B, D, F). A y B muestran la expresión de MHCII; C y D de IFN $\gamma$ ; E y F de TNF $\alpha$ . Imágenes tomadas a 10x.

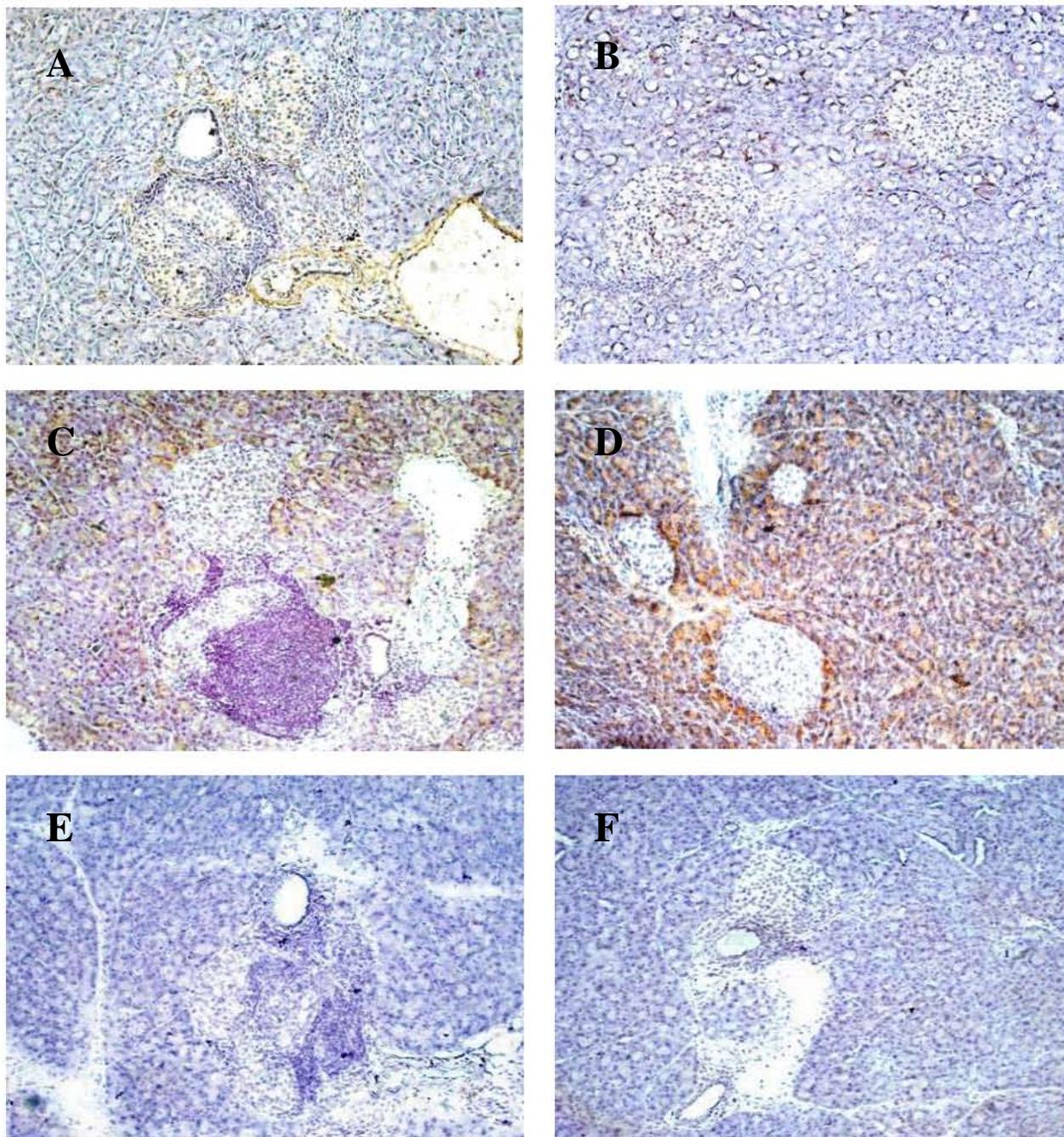


Fig. 10 Expresión de citocinas anti-inflamatorias en el páncreas de ratones pre-diabéticos controles (A, C, E) y pre-diabéticos tratados con 250 mg/kg de peso de silymarina durante 4 semanas (B, D, F). A y B muestran la expresión de IL10; C y D de TGFβ; E y F de IL4. Las imágenes fueron tomadas a 10x.

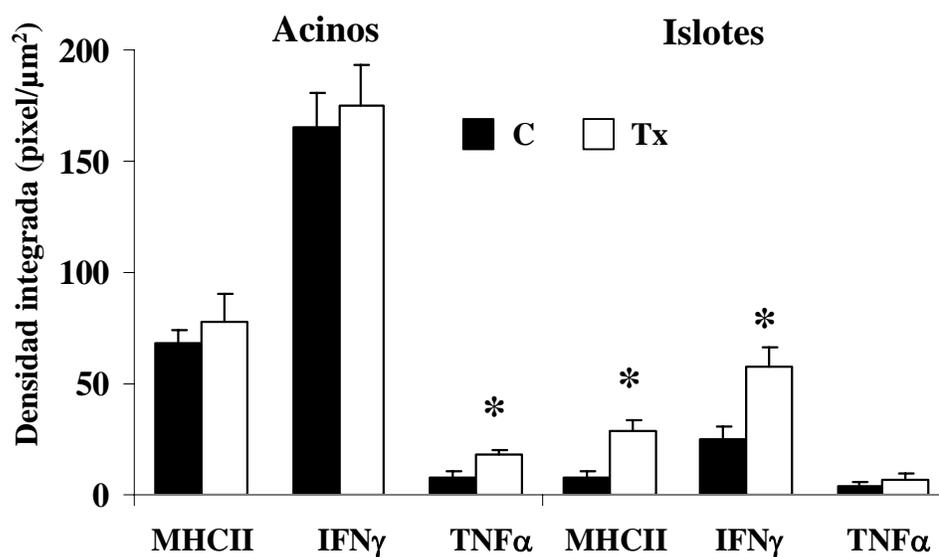


Fig. 11 Cuantificación de la expresión de MHCII, IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  en el tejido pancreático de ratones NOD prediabéticos controles y tratados con 250 mg/kg de silymarina durante 4 semanas. (\*) Los resultados son estadísticamente significativos con una  $p < 0.05$ , cuando se comparó el grupo tratado con el control.

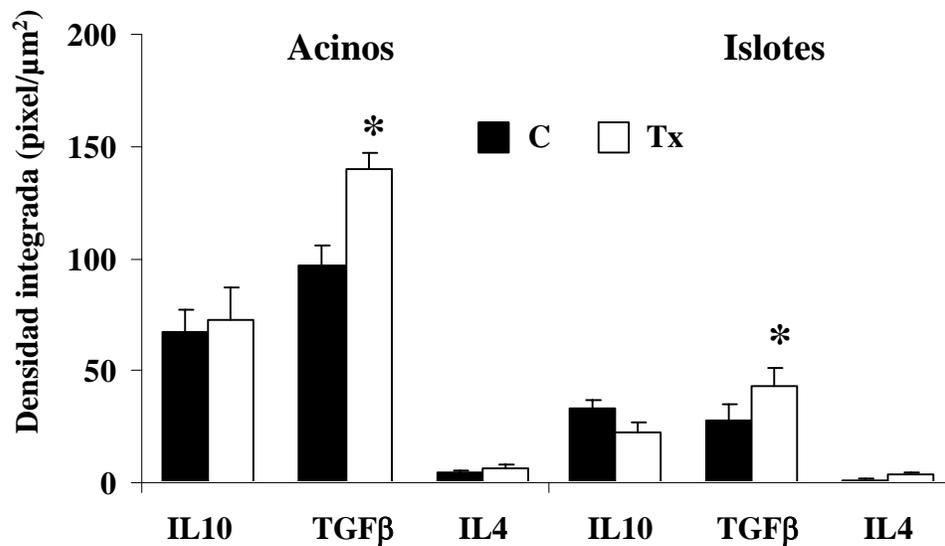


Fig. 12. Cuantificación de la expresión de IL10, TGF $\beta$  y de IL4 en tejido pancreático de ratones NOD prediabéticos controles y tratados con 250 mg/kg de peso de silymarina durante 4 semanas. (\*) Los resultados son estadísticamente significativos con una  $p < 0.05$ , cuando se comparó el grupo tratado con el control.

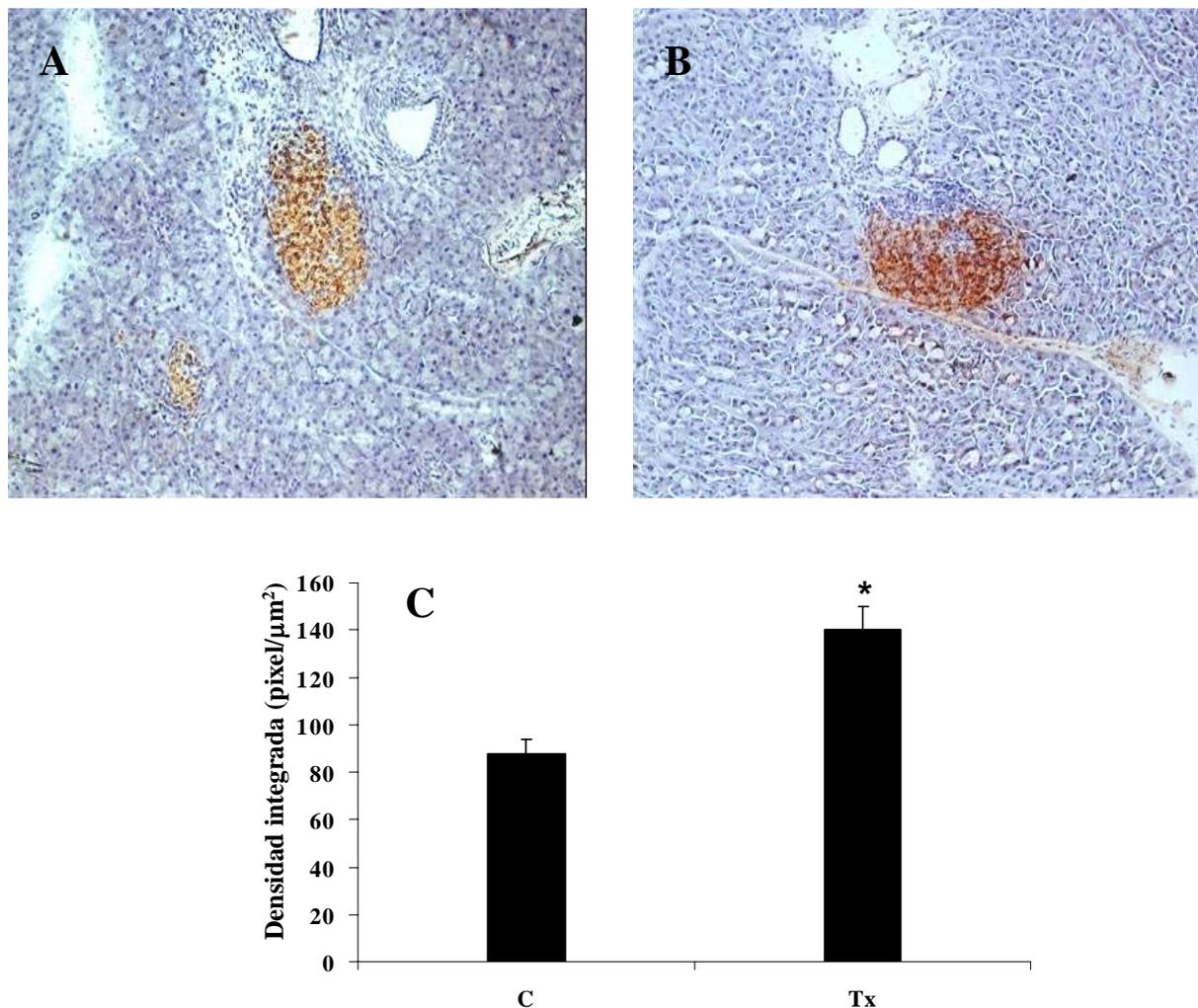


Fig. 13. Expresión (A y B) y cuantificación (C) de insulina en el páncreas de ratones NOD prediabéticos controles (A) y tratados con 250 mg/kg de peso de silymarina durante 4 semanas (B). C: ratones pre-diabéticos controles y Tx: ratones prediabéticos tratados. (\*) Los resultados son estadísticamente significativos con una  $p < 0.05$ , cuando se comparó el grupo tratado con el control.

### 3. Ratones NOD diabéticos

#### 3.1. El tratamiento con la silymarina reduce los niveles de glucosa sérica e incrementa la sobrevivencia de los ratones NOD diabéticos

Los niveles de glucosa en sangre de los ratones NOD diabéticos tratados no mostraron diferencias significativas con el grupo control al inicio del tratamiento. Ambos grupos presentaron una concentración de glucosa en sangre de  $154 \pm 4$  mg/dl al inicio del tratamiento. El

grupo control presentó un incremento en la concentración de la glucosa sérica a partir de la primera semana del tratamiento ( $161 \pm 5$  mg/dl), al término del tratamiento los niveles de glucosa en sangre superaron los  $248 \pm 1.19$  mg/dl (Fig. 14 A). En contraste, los ratones NOD tratados presentaron una disminución en los niveles de glucosa a partir de la primera semana ( $128.33 \pm 6$  mg/dl) y se mantuvo así hasta finalizar el tratamiento ( $135 \pm 13$  mg/dl) (Fig 14 A).

Por otro lado, los ratones NOD diabéticos control presentaron un 80% de sobrevida a partir de la sexta semana del tratamiento, mientras que el 100% del grupo de los ratones tratados sobrevivió (Fig. 14 B).

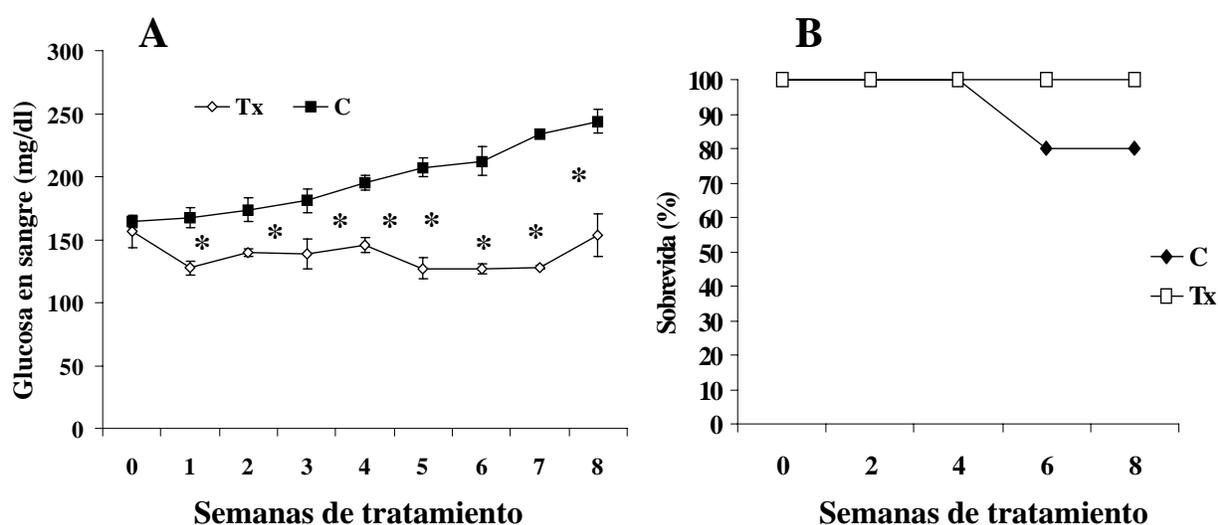


Fig. 14. Niveles de glucosa sérica en ayuno (A) y porcentaje de sobrevida (B) de ratones NOD diabéticos de reciente inicio controles (C) y tratados con 250 mg/kg de silymarina durante 8 semanas (Tx). (\*) Los resultados son estadísticamente significativos con una  $p < 0.05$ , cuando se comparó el grupo tratado con el grupo control.

### 3.2. La silymarina reduce el daño a los islotes de Langerhans

En la figura 15 A y B se muestran los cortes histológicos representativos del páncreas de un ratón NOD diabético control y uno tratado. En el corte del tejido pancreático del ratón control se puede observar como los islotes de Langerhans han sido sustituidos casi por completo por el infiltrado inflamatorio (Fig. 15 A), mientras que los ratones tratados presentan menos infiltrado inflamatorio. Al cuantificar el grado de insulinitis, los ratones controles presentaron el 50% de sus islotes con grado IV, a diferencia de los ratones tratados que sólo presentaron un 20% de islotes con grado IV (Fig. 17C).

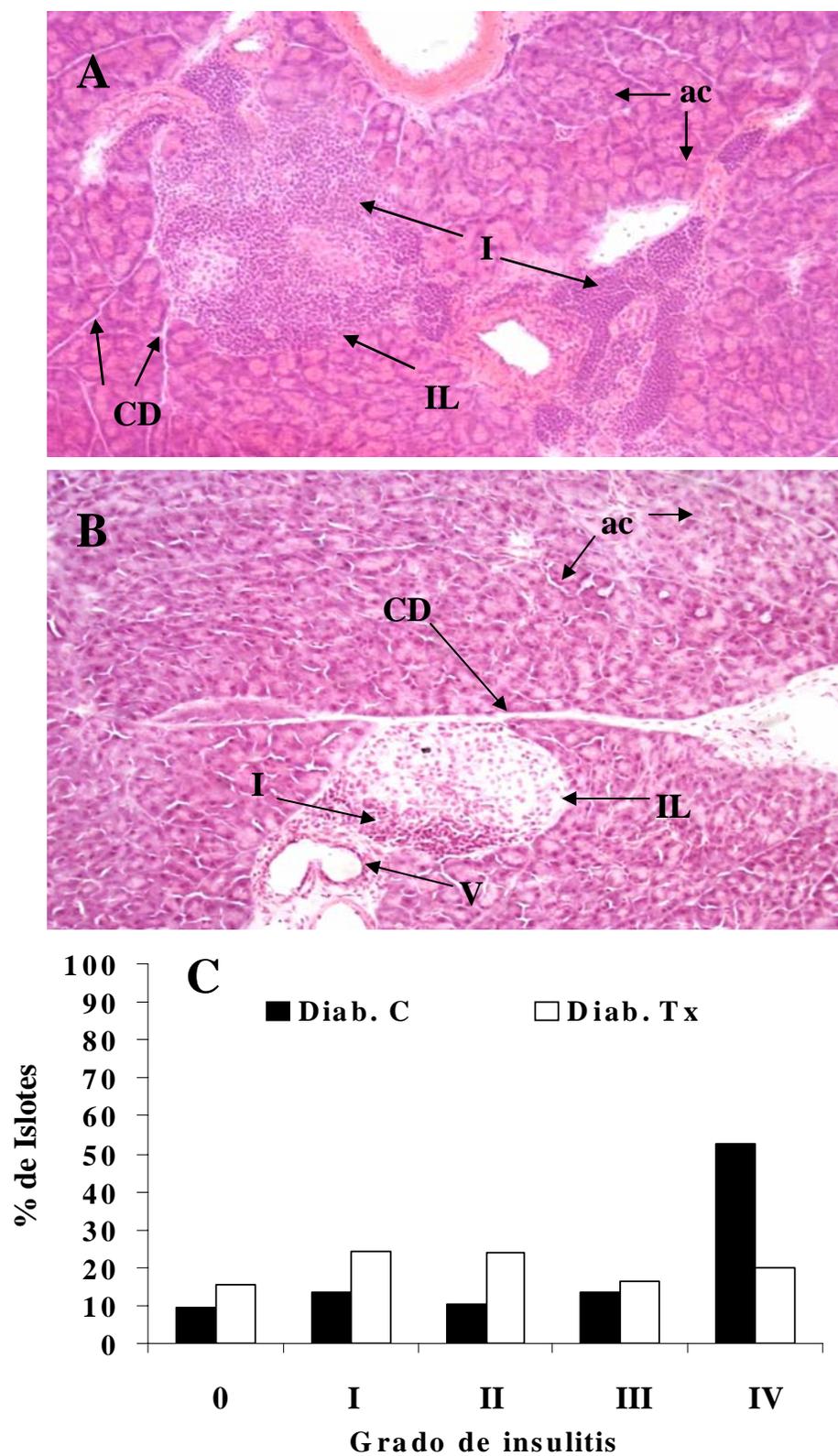


Fig. 15 Tejidos pancreáticos con procesos inflamatorios teñidos con hematoxilina y eosina de ratones NOD diabéticos control (A) y tratados con 250 mg/kg de peso de silymarina por 8 semanas (B). Porcentaje de insulinitis en los islotes de ratones NOD diabéticos controles y tratados (C), en las barras negras se representan los ratones pre-

diabéticos controles y en las blancas los tratados. ac: Acinos pancreáticos; CD: Conductos pancreáticos; IL: Islotes de Langerhans; I: Infiltrado inflamatorio; V: vasos sanguíneos. Imágenes tomadas al aumento 10X

### ***3.3. La Expresión de citocinas inflamatorias disminuye con la silymarina a largo plazo***

En cuanto a la expresión de MHCII, el tratamiento con silymarina disminuyó significativamente los niveles en los islotes pancreáticos de los ratones tratados, mientras que en el tejido acinar su expresión fue similar a los ratones no tratados (Fig. 16 A y B; Fig. 18). La expresión de MHCII en ambos grupos fue mayor en los acinos pancreáticos que en los islotes (Fig. 16 A y B). Similar a la expresión del MHCII, la expresión de IFN $\gamma$  no se modificó por el tratamiento con la silymarina en los acinos pancreáticos mientras que en los islotes disminuyó significativamente (Fig. 16 C y D, Fig. 18). En ambos grupos hay un poco más de expresión de esta citocina en el tejido acinar con respecto a los islotes (Fig. 16 C y D). Por otro lado, se detectó una similar y baja expresión de TNF $\alpha$  en ambos grupos tanto en los acinos como en los islotes, siendo al igual que IFN $\gamma$  la expresión mayor en los acinos pancreáticos que en los islotes (Fig. 17 E y F, Fig. 18).

### ***3.4. La silymarina induce la expresión de IL10 y TGF $\beta$ en el tejido pancreático***

El tratamiento a largo plazo incrementó significativamente los niveles de IL10 tanto en los islotes como en los acinos pancreáticos de los ratones tratados con respecto a los ratones no tratados (Fig. 17 A y B, Fig. 19). La expresión de IL10 en ambos grupos fue mayor en los acinos pancreáticos que en los islotes (Fig. 17 A y B). Adicionalmente, la expresión de TGF $\beta$  aumentó de manera significativa tanto en los acinos pancreáticos como en los islotes con el tratamiento de silymarina (Fig. 17 C y D, Fig. 19). En ambos grupos hubo mayor expresión de esta citocina en el tejido acinar con respecto a los islotes (Fig. 17 C y B). También se detectó un incremento significativo en la expresión de IL4 tanto en los acinos como en los islotes, siendo al igual que la expresión de IL10 y TGF $\beta$  mayor su expresión en los acinos pancreáticos que en los islotes (Fig. 17 E y F, Fig. 19).

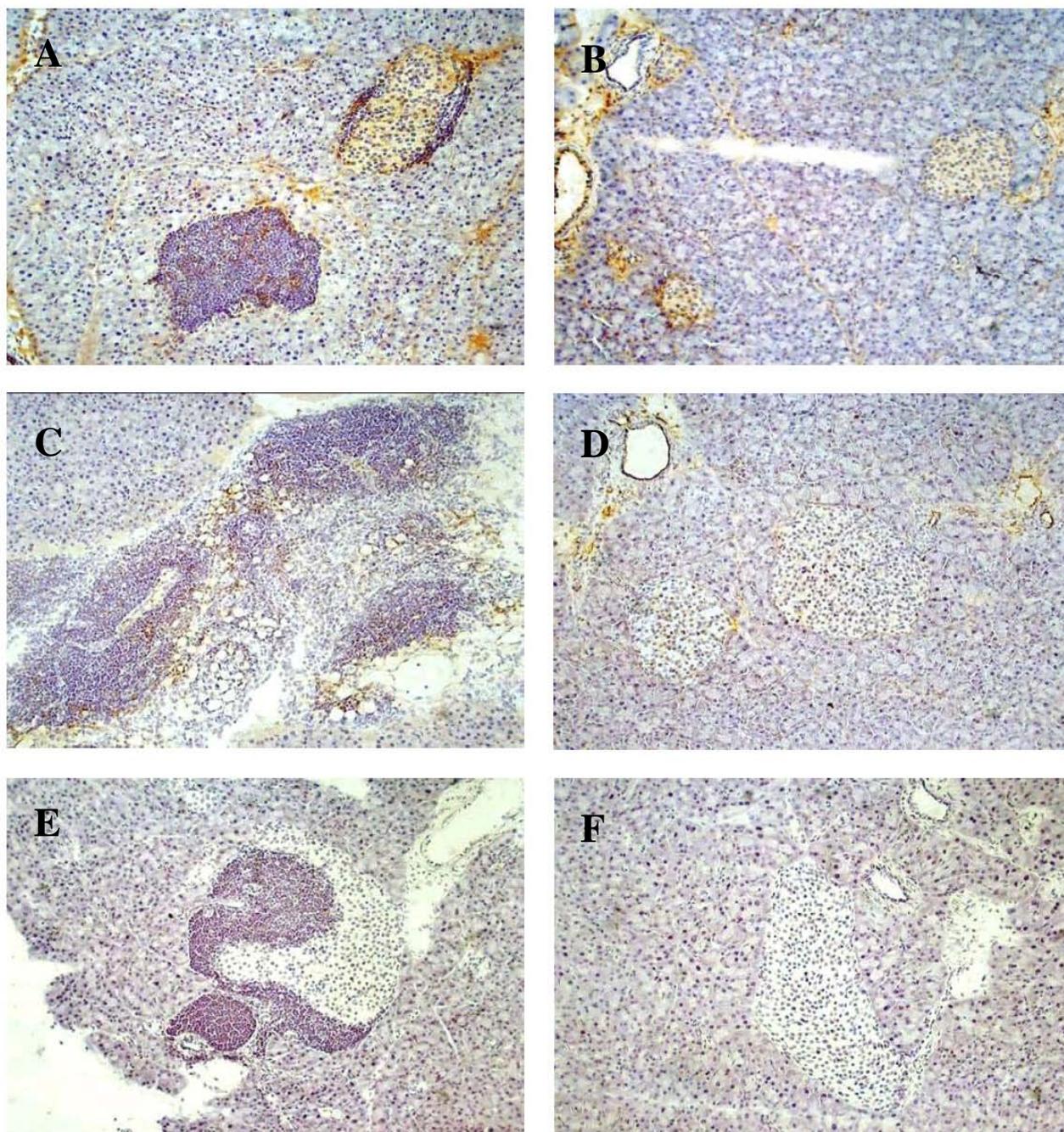


Fig. 16 Expresión de MHCII y de las citocinas inflamatorias en el páncreas de ratones diabéticos controles (A, C, E) y de ratones diabéticos tratados con 250 mg/kg de peso de silymarina durante 8 semanas (B, D, F). A y B muestran la expresión de MHCII; C y D de  $IFN\gamma$ ; E y F de  $TNF\alpha$ . Las imágenes fueron tomadas a 10x.

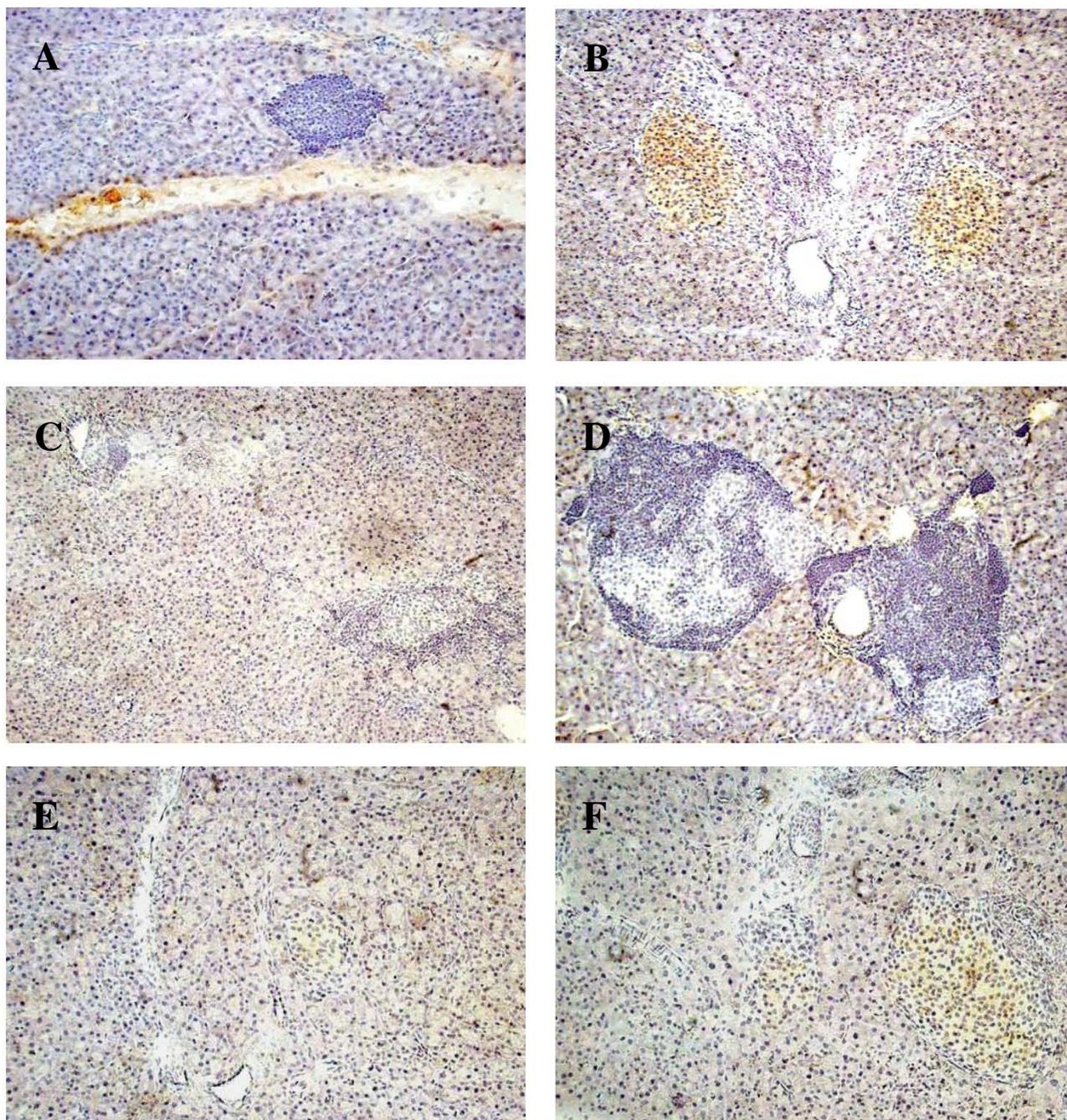


Fig.17 Expresión de las citocinas antiinflamatorias en el páncreas de ratones NOD diabéticos controles (A, C, E) y tratados con 250 mg/kg de peso de silymarina durante 8 semanas (B, D, F). A y B muestran la expresión de IL10; C y D de TGF $\beta$ ; E y F de IL4. Las imágenes fueron tomadas a 10x.

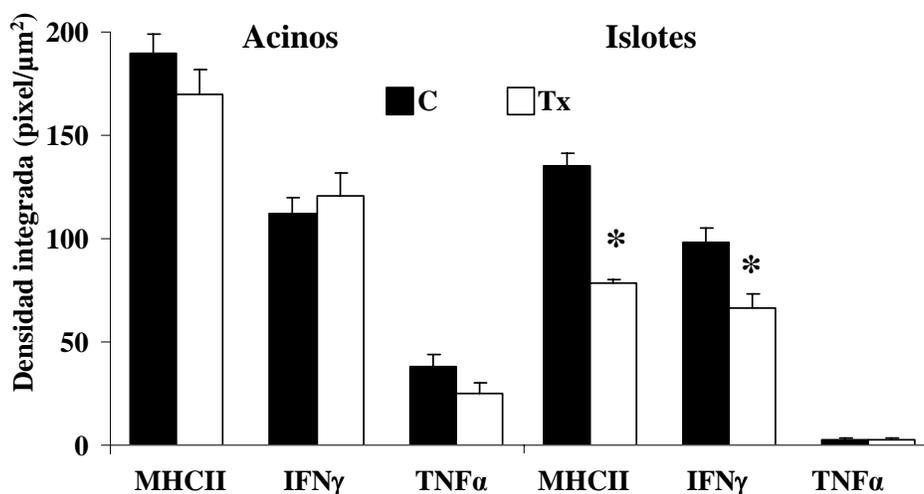


Fig. 18 Cuantificación de la expresión de MHCII, IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  en el páncreas de ratones NOD diabéticos controles (barras negras) y tratados con 250 mg/kg de silymarina durante 8 semanas (barras blancas). (\*) Los resultados son estadísticamente significativos con una  $p < 0.05$  cuando se comparó el grupo tratado con el control.

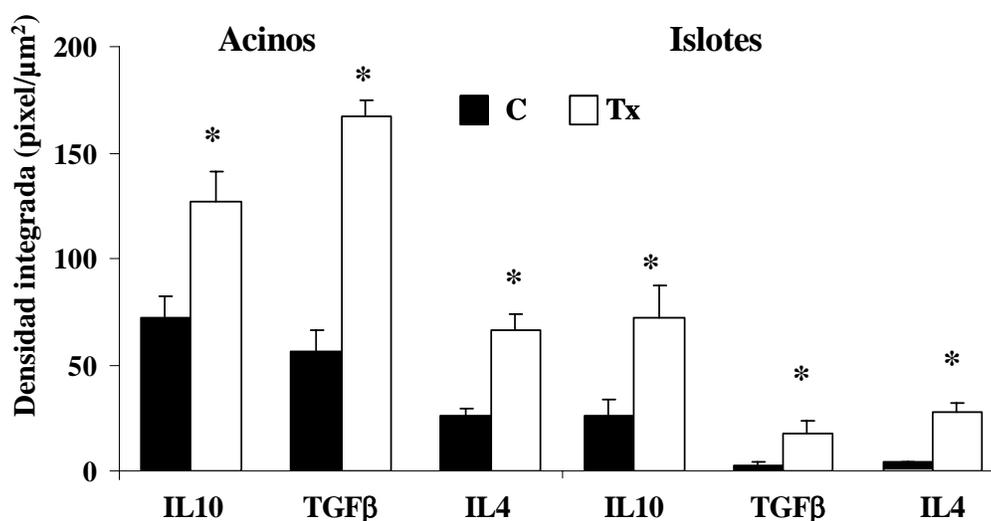


Fig. 19 Cuantificación de la expresión de IL10, TGF $\beta$  y de IL4 en tejido pancreático de ratones NOD diabéticos controles (barras negras) y tratados con 250 mg/kg de silymarina durante 8 semanas (barras blancas). (\*) Los resultados son estadísticamente significativos con una  $p < 0.05$  cuando se comparó el grupo tratado con el control.

### 3.5. La silymarina induce la expresión de IL10 y TGF $\beta$ en células del infiltrado inflamatorio

Al analizar a mayor aumento la expresión de las citocinas antiinflamatorias en el páncreas de ratones NOD tratados con la silymarina observamos que algunas células del infiltrado inflamatorio fueron positivas para IL10 (Fig. 20 C y D) y TGF $\beta$  (Fig. 20 G y H). En contraste, el grupo control no presentó células del infiltrado inflamatorio que expresaran IL10 (Fig. 20 A y B)

ni TGF $\beta$  (Fig. 20 E y F). En estas imágenes también se puede apreciar que la expresión de IL10 (Fig. 20C y D) y de TGF $\beta$  (Fig. 20 G y H) es en el islote de Langerhans.

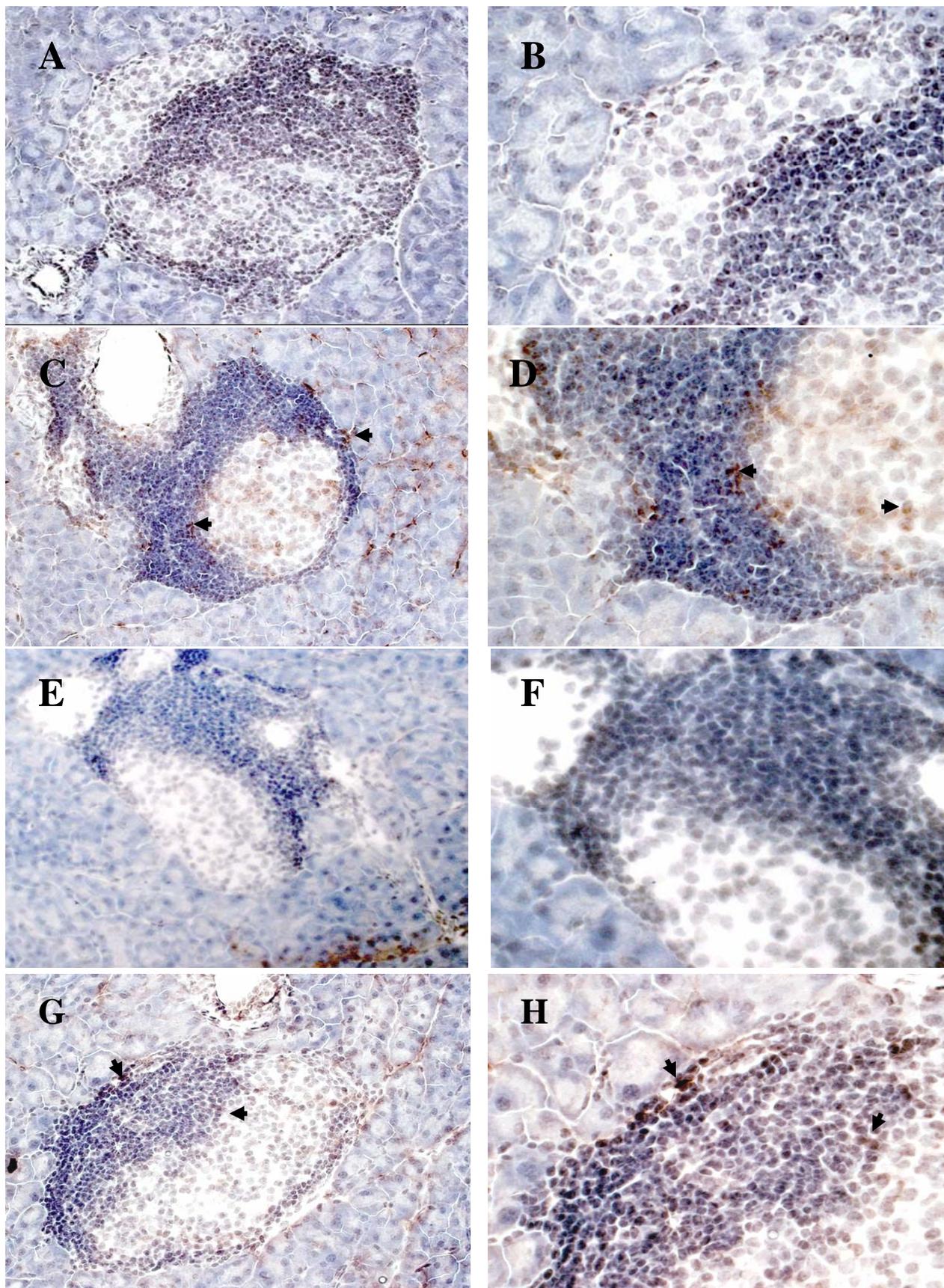


Fig. 20 Expresión de IL10 (A-D) y de TGF $\beta$  (E-H) en el páncreas de ratones NOD controles (A, B, E y F) y tratados con 250 mg/kg de silymarina durante 8 semanas (C, D, G y H). Las cabezas de flecha señalan la expresión de IL10 y de TGF $\beta$  en las células del infiltrado inflamatorio. Las imágenes fueron tomadas a 20X (A, C, E y G) y a 40X (B, D, F y H).

### 3.6. La expresión de insulina es mayor en los ratones tratados

El tratamiento con la silymarina mantuvo la expresión de insulina en los islotes de Langerhans de ratones NOD diabéticos tratados (Fig. 21 B), mientras que los islotes de los ratones controles presentaron infiltrado inflamatorio y menos células marcadas contra insulina (Fig. 21. A). Al realizar la cuantificación de la expresión se observó que los niveles de insulina fueron mayores significativamente en los ratones NOD tratados con respecto a los ratones controles (Fig. 21 C).

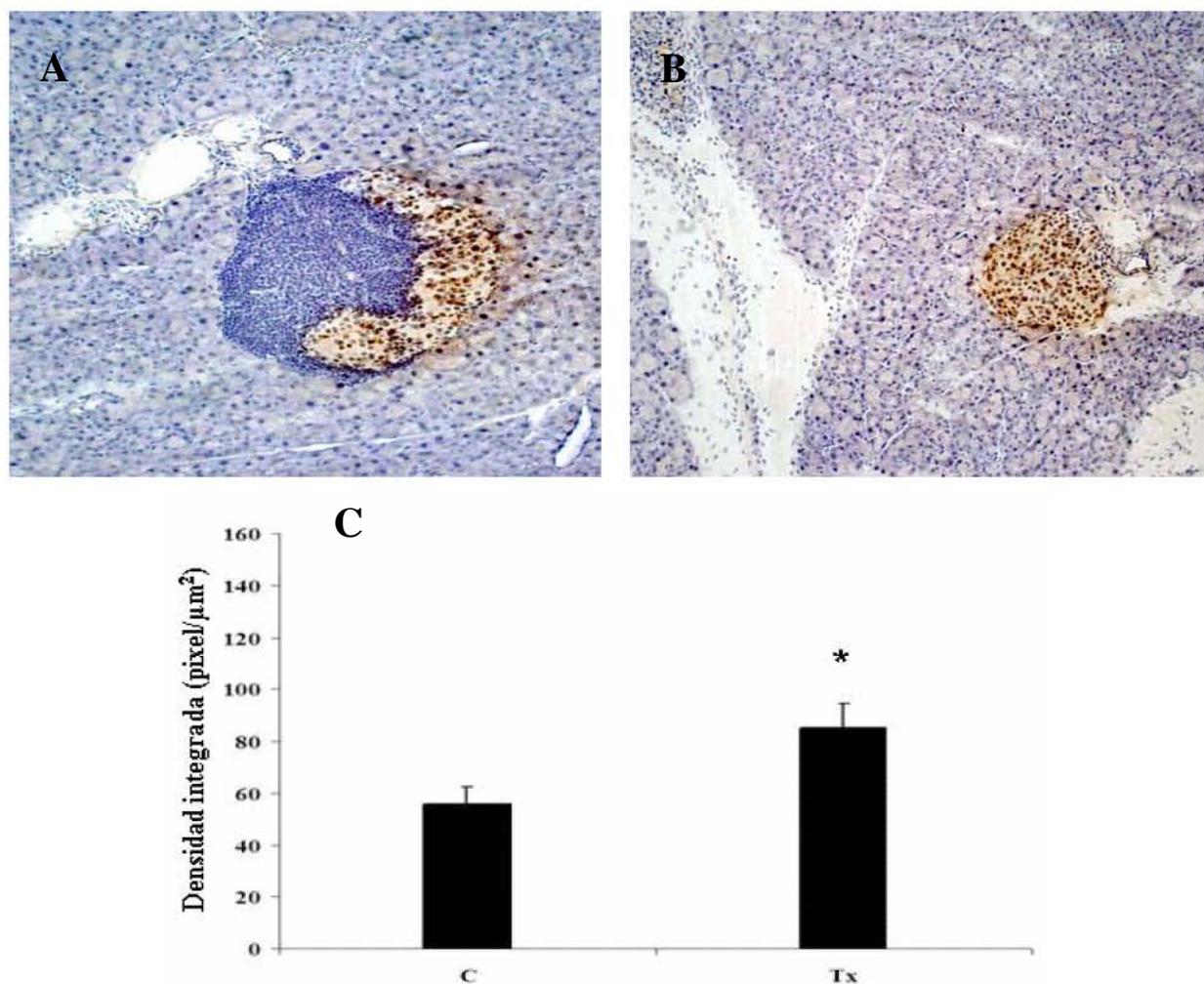


Fig. 21. Expresión (A y B) y cuantificación de la expresión de insulina (C) en el páncreas de ratones NOD diabéticos controles (A) y tratados con 250 mg/kg de silymarina durante 8 semanas (B). C: ratones diabéticos controles y Tx: ratones diabéticos tratados. (\*) Los resultados son estadísticamente significativos con una  $p < 0.05$  cuando se comparó el grupo tratado con el control.

## VII. DISCUSION.

El primer objetivo de este trabajo de tesis fue determinar el efecto del tratamiento con Silymarina a corto y a largo plazo sobre la expresión de citocinas en el páncreas de ratones ICR normales. Los datos obtenidos en este trabajo muestran que el tratamiento a corto plazo con 250 mg/kg de peso de silymarina incrementó la expresión de MHCII, de citocinas pro-inflamatorias como  $IFN\gamma$  y  $TNF\alpha$  así como de la citocina anti-inflamatoria IL10 en el tejido pancreático. Mientras que el tratamiento a largo plazo incrementó notablemente la expresión de las citocinas anti-inflamatorias IL4, IL10 y  $TGF\beta$ . Al mismo tiempo se observó una disminución en los niveles de expresión de MHCII y de las citocinas pro-inflamatorias ( $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$ ) en el páncreas de los ratones tratados. Estos resultados concuerdan con estudios previos que han demostrado que la silymarina a corto plazo induce la expresión tanto de citocinas proinflamatorias ( $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL2 e IL6) en linfocitos T de bazo y hepatocitos como antiinflamatorias (IL4, IL10 y  $TGF\beta$ ) en hepatocitos de ratones normales (Johnson et al., 2002; Johnson et al., 2003; He et al., 2002; Quanren et al., 2004; Schüman et al., 2003, Wilasrusmee et al., 2003). Asimismo, se reportó que la silymarina revierte la expresión de citocinas proinflamatorias ( $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$ , IL2) e induce la expresión de IL10 en el modelo animal de daño hepático inducido por concavalina A y fumonicina B<sub>1</sub> (He et al., 2004, Schüman et al., 2003). Nuestros resultados muestran que la silymarina tanto a corto como a largo plazo modula la expresión basal *in vivo* de las citocinas pro y anti-inflamatorias, así como del MHCII no sólo en los acinos pancreáticos sino también en los islotes de Langerhans de ratones normales. Sin embargo, el mayor efecto regulador de silymarina se observó con el tratamiento a largo plazo ya que indujo predominantemente ambientes anti-inflamatorios con la expresión de las citocinas IL4, IL10 y  $TGF\beta$  en el páncreas de ratones ICR. El incremento de estas citocinas podría modular negativamente la expresión de las citocinas pro-inflamatorias de tipo Th1 y el MHCII en el tratamiento a largo plazo.

Por su propiedades moduladoras de la respuesta inmunológica tanto en el páncreas como en células del sistema inmunológico y por su efecto en la recuperación de la función pancreática en un modelo farmacológico de diabetes tipo 1 (Soto et al., 2004), nos preguntamos si la silymarina pudiera modular la respuesta inmunológica y contribuir de esta manera a la recuperación de la función pancreática en un modelo más cercano a la diabetes mellitus tipo1 de humano, los ratones NOD. Para analizar esta pregunta, en este trabajo también se evaluó la

modulación de la respuesta inmunológica inducida por el tratamiento a largo plazo con silymarina en el páncreas de ratones NOD prediabéticos y diabéticos de reciente inicio.

A partir de la tercera y cuarta semana de tratamiento los ratones NOD prediabéticos presentaron un 50% de sobrevida mientras que el 100% del grupo de los ratones no tratados sobrevivió, por lo cual se decidió interrumpir el tratamiento y no concluirlo a las 8 semanas del mismo. No existen reportes que indiquen que la silymarina afecte la sobrevida de esta manera. Sin embargo, se ha reportado que una sobre-expresión de TGF $\beta$  en hígado, páncreas, pulmón y riñón induce fibrosis lo que puede llegar a generar la pérdida de la función de estos órganos (Schuppan et al., 2000; Wells et al., 2000). En este sentido, a nivel macroscópico observamos una gran cantidad de adherencias en casi todos los órganos (datos no mostrados) de los ratones prediabéticos tratados con respecto al grupo control. Asimismo, los ratones prediabéticos tratados mostraron niveles significativamente elevados de TGF $\beta$  en los acinos y en los islotes, por lo que no se puede descartar que el tratamiento con la silymarina haya incrementado la síntesis y/o secreción de TGF $\beta$  a nivel sistémico en los ratones prediabéticos favoreciendo la fibrosis de otros órganos.

Por otro lado, la administración de citocinas proinflamatorias como TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  a ratones NOD prediabéticos acelera el proceso de insulinitis de la enfermedad, esto pudiera deberse a que la presencia de TNF $\alpha$  en estas edades tempranas rompe la tolerancia inmunológica hacia las células  $\beta$  del islote (Cantor et al., 2005; Green et al., 2000; Middlebrook et al., 2007). Estos reportes concuerdan con nuestros resultados, ya que observamos que los ratones NOD prediabéticos tratados presentaron un mayor grado III y II de insulinitis comparados con los ratones controles, un incremento significativo en la expresión de MHCII e IFN $\gamma$  en islotes y de TNF $\alpha$  en los acinos. Está documentado que las células  $\beta$  del islote así como las células endoteliales también pueden expresar MHCII en condiciones fisiológicas (Ulrichs et al., 1985), por lo que el aumento en la expresión de MHCII en el islote pudiera ser resultado del estímulo de IFN $\gamma$  aumentado sobre las células propias del islote, las células endoteliales del islote y las células presentadoras de antígenos presentes en el infiltrado inflamatorio, de esta manera se pudiera facilitar la presentación de antígenos a linfocitos T autoreactivos. Por otro lado, la expresión incrementada de TNF $\alpha$  en los acinos pancreáticos pudiera favorecer la ruptura de la tolerancia inmunológica y junto con el aumento en la expresión de MHCII contribuir a un ambiente que facilite tempranamente la inflamación.

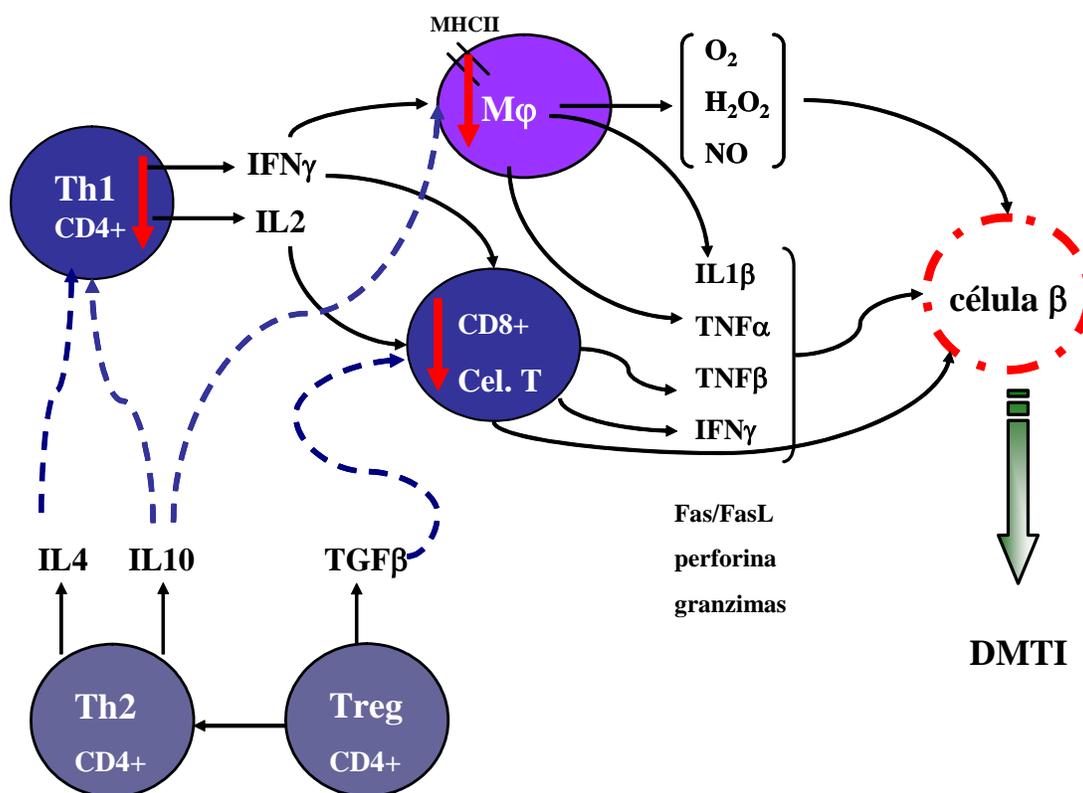
En contraste con los ratones prediabéticos, los ratones diabéticos tratados durante ocho semanas con silymarina presentaron un 100% de supervivencia. Al determinar el grado de destrucción en los islotes de Langerhans observamos que fue menor en los ratones diabéticos con respecto a los controles diabéticos. Estos hallazgos podrían ser consecuencia de la modulación de la respuesta inmunológica y del efecto citoprotector inducidos por la silymarina. En este sentido, se ha reportado que la silymarina protege a los islotes de Langerhans contra la citotoxicidad inducida por ciclosporina A en ratones, revierte el efecto citotóxico de  $IFN\gamma$  e  $IL1\beta$  en las células  $\beta$  de ratón y de humano, e inhibe la apoptosis inducida por  $TNF\alpha$  en células  $\beta$  de humano (Matsuda et al., 2005; Manna et al., 1999; von Schonfeld et al., 1997).

Por otro lado, los ratones NOD diabéticos tratados durante ocho semanas con silymarina, presentaron una disminución significativa en la expresión de MHCII e  $IFN\gamma$  únicamente en los islotes de Langerhans. Estos resultados concuerdan con los que se han reportado previamente, donde se demostró que la silymarina revierte la expresión de citocinas proinflamatorias como  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$  e  $IL2$  en el modelo de daño hepático inducido por oncanavalina A o por fumonicina B<sub>1</sub> (He et al., 2004, Schüman et al., 2003). Un hallazgo interesante fue el incremento significativo de las citocinas antiinflamatorias ( $IL4$ ,  $IL10$  y  $TGF\beta$ ) tanto en los acinos pancreáticos como en los islotes de los ratones diabéticos tratados. El efecto modulador que presenta la silymarina podría ser consecuencia del incremento en la expresión de estas citocinas (Fig. 22). Previamente se ha documentado la relevancia de las citocinas antiinflamatorias tanto en el desarrollo como en la remisión de la DMT1 (Karges et al., 2006; Ko et al., 2001; Raz et al., 2005). La sobre expresión de  $IL10$  o  $TGF\beta$  sistémicas, o la inducción de  $IL10$  con la administración probiótica oral, disminuye significativamente la insulinitis, la muerte de las células  $\beta$ , induce células T reguladoras y restablece la tolerancia inmunológica (Calcinaro et al., 2005; Goudy et al., 2003; Luo et al., 2005). Aunque en este trabajo aun no se explora la participación de los diferentes tipos celulares, es importante resaltar que en el infiltrado inflamatorio de los ratones diabéticos tratados durante ocho semanas se encontraron células positivas para  $IL10$  o  $TGF\beta$ , sugiriendo la posible presencia de células T reguladoras en el infiltrado (Fig. 22). La inducción de estas células podría darse tanto a nivel sistémico como local dada la gran cantidad de  $TGF\beta$  e  $IL10$  presentes en el tejido pancreático de los ratones diabéticos tratados. Adicional al efecto inductor de citocinas antiinflamatorias y reguladoras, la silymarina pudiera estar regulando el fenómeno inflamatorio con la disminución de la expresión de MHCII e  $IFN\gamma$  en islotes

pancreáticos. Previamente se ha reportado que células dendríticas tratadas con silymarina disminuyen su expresión de MHCII, de moléculas coestimuladoras, inhibe el proceso de maduración de éstas y la inducción de linfocitos TH1 (Lee et al., 2007). Otro mecanismo protector que pudiera estar efectuando la silymarina, es la inhibición de la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, de esta manera inhibir la apoptosis de las células  $\beta$  y ejercer un efecto citoprotector ante la presencia de las citocinas inflamatorias (Manna et al., 1999; Schumann et al., 2003; Matsuda et al., 2005).

Adicionalmente, nuestros resultados mostraron que el tratamiento con la silymarina a largo plazo incrementó significativamente la expresión de insulina en islotes pancreáticos de los ratones ICR y de igual forma en los ratones NOD prediabéticos y diabéticos. Estos resultados coinciden con reportes previos, en donde se mostró que la administración de silymarina restablece la producción de insulina en un modelo de diabetes farmacológica (Soto et al., 2004) e induce la producción y secreción de insulina en células  $\beta$  murinas y de humano *in vitro* (Matsuda et al., 2005). Por otro lado, los niveles de glucosa sérica disminuyeron en los ratones NOD prediabéticos y diabéticos tratados con silymarina comparados con sus respectivos controles. Reportes similares han mostrado que la silymarina disminuye los niveles de glucosa en sangre tanto en ratas con diabetes inducida por alloxano como en humanos con DM tipo 2 (Velussi et al., 1997; Lirussi et al., 2002; Soto et al., 2004). Pudiera ser que los efectos citoprotector y inmunomodulador de la Silymarina contribuyan a una menor destrucción de las células  $\beta$  en los islotes pancreáticos, mantener así un mayor número de células  $\beta$  funcionales y por lo tanto conservar niveles de insulina que regulen la glucosa sérica.

Estos resultados en conjunto, sugieren una modulación de la respuesta inmunológica y un efecto citoprotector inducidos por silymarina. Estas propiedades podrían estar influyendo no sólo en el control de la inflamación sino también en la inducción de citocinas anti-inflamatorias, de células T reguladoras y/o linfocitos T cooperadores con un perfil TH2; y de esta manera regular el daño a las células  $\beta$  y conservar su función (Fig. 22). Estas propiedades moduladoras de la respuesta inmunológica y citoprotectoras de la silymarina resultan ser de gran interés en el manejo terapéutico integral de DMT1, lo que podría llevar a la reducción de las complicaciones asociadas a la DM y por lo tanto no sólo disminuir los costos para el sistema de salud sino mejorar la calidad de vida de los pacientes diabéticos tipo 1.



(Rabinovitch et al., 1998)

Fig. 22. Posibles vías por las que la silimarina modula la respuesta inmunológica en los ratones NOD diabéticos. Figura modificada de Rabinovitch et al., 1998. Mφ: Macrófagos, Th1: linfocitos T cooperadores tipo 1, Th2: linfocitos T cooperadores tipo 2, Treg: linfocitos T reguladores, DM1: Diabetes mellitus tipo 1. Las flechas continuas indican estímulo positivo, las discontinuas un estímulo negativo, las flechas dentro de las células Th1, T CD8+ y Mφ indican disminución de la respuesta de estas células.

## IX. CONCLUSIONES

1. La silymarina induce a corto plazo las citocinas inflamatorias (IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ ), IL10 y la expresión de MHCII en los acinos e islotes pancreáticos de ratones ICR tratados 5 días. Mientras que el tratamiento de 60 días de silymarina disminuye a los niveles basales la expresión de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , y MHCII, e incrementa la expresión de las citocinas anti-inflamatorias (IL4, IL10 y TGF $\beta$ ) y de insulina en los acinos e islotes pancreáticos.
2. En los ratones prediabéticos el tratamiento con silymarina disminuyó la sobrevida, disminuyó los niveles de glucosa sérica e incrementó la expresión de TGF $\beta$  en el tejido pancreático. Por otro lado, la expresión de insulina en los islotes pancreáticos fue mayor en los ratones prediabéticos tratados que en los ratones controles, esto pudiera explicar los niveles séricos de glucosa más bajos en los animales tratados.
3. Los ratones diabéticos tratados con silymarina por 8 semanas mostraron 100% de sobrevida, niveles séricos de glucosa más bajos y menos islotes dañados comparados con los ratones controles.
4. El tratamiento de 8 semanas de silymarina disminuyó los niveles de IFN $\gamma$  y MHCII en los islotes pancreáticos e incrementó la expresión de las citocinas anti-inflamatorias (IL4, IL10 y TGF $\beta$ ) tanto en los islotes como en los acinos. La expresión de las citocinas anti-inflamatorias pudiera evitar que se continúe con el daño de las células  $\beta$  de los islotes al disminuir la expresión de IFN $\gamma$  y MHCII en los islotes, y por lo mismo contribuir a un menor número de islotes dañados.
5. El tratamiento con la silymarina por 8 semanas mantiene la expresión de insulina en el islote más elevada en los ratones diabéticos tratados que en los controles, esto pudiera ser consecuencia por un lado de que hubo menos daño a los islotes, por lo tanto se conservaron más células  $\beta$  y por lo mismo los animales tratados tuvieron glucosas séricas más bajas.

Con estos resultados se puede concluir que la silymarina muestra propiedades inmunomoduladoras y citoprotectoras de gran interés en el manejo terapéutico integral de la diabetes mellitus tipo 1, lo que podría llevar a la reducción de las complicaciones asociadas a la diabetes mellitus y por lo tanto no sólo disminuir los costos para el sistema de salud sino mejorar la calidad de vida de los pacientes diabéticos tipo I.

## **X. PERSPECTIVAS**

1. Evaluar la modulación de la respuesta inmunológica en las diferentes poblaciones de linfocitos T cooperadores (Th1, Th2 y TH17) en el páncreas de ratones NOD diabéticos tratados con silymarina, con la finalidad de determinar si las poblaciones Th2 están contribuyendo a la modulación que observamos.
2. Evaluar la presencia y el tipo de linfocitos T reguladores en el páncreas de ratones NOD diabéticos tratados con silymarina, con el propósito de ahondar en las observaciones que hicimos al encontrar células positivas a IL10 y TGF $\beta$  en el infiltrado inflamatorio de los ratones tratados y poder saber su contribución a la regulación del daño.
3. Evaluar el estado de maduración de las células dendríticas del páncreas de ratones NOD diabéticos tratados con silymarina y ver si este pudiera contribuir a la regulación de la respuesta inmunológica inducida por silymarina al favorecer la inducción de poblaciones específicas de linfocitos T cooperadores.
4. Evaluar si las complicaciones clínicas más frecuentes (cataratas, retinopatía, neuropatía, etc) se presentan en tiempos más tardíos con el tratamiento de silymarina en los ratones NOD diabéticos.

## XI. BIBLIOGRAFIA.

- Agardh CD**, Cilio CM, Lethagen A, Lynch K, Leslie RD, Palmér M, Harris RA, Robertson JA, Lernmark A.J. 2005. Clinical evidence for the safety of GAD65 immunomodulation in adult-onset autoimmune diabetes. *Diabetes Complications*. 19(4):238-46.
- Agarwal C**, Singh RP, Dhanalakshmi S, Tyagi AK, Tecklenburg M, Sclafani RA, Agarwal R. 2003. Silibinin upregulates the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors and causes cell cycle arrest and apoptosis in human colon carcinoma HT-29 cells. *Oncogene*. 22, 8271–8282.
- Ahmad, N.**, H. Gali, S. Javed, R. Agarwal. 1998. Skin cancer chemopreventive effects of a flavonoid antioxidant silymarin are mediated via impairment of receptor tyrosine kinase signaling and perturbation in cell cycle progression. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 247:294.
- American Diabetes Association**. Diagnosis and classification of diabetes mellitus, *Diabetes care* 2004; **27**: S5-S10.
- Berdanier C**. 1995. Diet, autoimmunity and insulin-dependent diabetes mellitus; a controversy. *P.S.E.B.M*. 209; 223-231.
- Bergerot I**, Ploix C, Petersen J, Moulin V, Rask C, Fabien N, Lindblad M, Mayer A, Czerkinsky C, Holmgren J, Thivolet C. 1997. A cholera toxoid-insulin conjugate as an oral vaccine against spontaneous autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94(9):4610-4.
- Bilbao JR**, Calvo B, Urrutia I, et al. Bases genéticas de la diabetes tipo 1. *Endocrinol*. 1996: 43: 312-20. 8.
- Bingley PJ**, Christie MR, Bonifacio E, Bonfanti R, Shattock M, Fonte M-T, Bottazzo G-F, Gale EAM 1994 Combined analysis of autoantibodies improves prediction of IDDM in islet cell antibody-positive relatives. *Diabetes*. 43:1304–1310
- Bodington M**, Mc Nally P. 1994. Cow's milk and type I childhood diabetes; no increase in risk. *Diabetic Medicine*. 11 (7): 663-665.
- Blanchard J**, Dean H, Anderson K, Wajda A, Ludwig S, Depew N. 1997. Incidence and prevalence of diabetes in children aged 0–14 years in Manitoba, Canada, 1985–1993. *Diabetes Care*;20(4):512–515
- Boitard C**, Bach J. 1991. Insulin-dependent diabetes mellitus: an autoimmune disease. Molecular autoimmunity. *Academic Press*, Ltd. Norman talala. 276-310.
- Bokemeyer C**, Fels LM, Dunn T, Voigt W, Gaedeke J, Schmoll HJ, Stolte H, Lentzen H. 1996. Silibinin protects against cisplatin-induced nephrotoxicity without compromising cisplatin or ifosfamide anti-tumour activity. *Br J Cancer*. Dec;74(12):2036-41.
- Bosmans JL**, Verpooten GA. 2007. Malignancy after kidney transplantation: Still a challenge. *Kidney Int*. 71(12):1197-9.
- Bottazzo GF**, Crhistensen A, Doniach D. 1974. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *The Lancet*. 1278-1282.
- Cantor J**, Haskins K. 2005. Effector function of diabetogenic CD4 Th1 T cell clones: a central role for TNF-alpha. *J Immunol*. 175(11):7738-45
- Cameron MJ**, Arreaza GA, Zucker P, Chensue SW, Strieter RM, Chakrabarti S, Delovitch TL. 1997. IL-4 prevents insulinitis and insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic mice by potentiation of regulatory T helper-2 cell function. *J Immunol*. Nov 15;159(10):4686-92.
- Chatila TA**. Role of regulatory T cells in human diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2005; 116(5):949-59.
- Chtanova T**, Mackay CR. 2001. T cell effector subsets: extending the Th1/Th2 paradigm. *Adv Immunol* 78:233-266

- Cho JY**, Kim PS, Park J, Yoo ES, Baik KU, Kim YK, Park MH. 2000. Inhibitor of tumor necrosis factor- $\alpha$  production in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells from *Amorpha fruticosa*. *J Ethnopharmacol*. May;70(2):127-33.
- Conti M**, Malandrino S, Magistretti MJ. 1992. Protective activity of silipide on liver damage in rodents. *Jpn J Pharmacol*. 60(4):315-21.
- Deák G**, Müzes G, Láng I, Nékám K, González-Cabello R, Gergely P, Fehér J. 1990. Effects of two bioflavonoids on certain cellular immune reactions in vitro. *Acta Physiol Hung*.76(2):113-21.
- De la Puerta R**. Martínez E, Bravo L, Ahumada MC. 1996. Effect of Silymarin on different acute inflammation models and on leukocyte migration. *J. Pharm Pharmacol.*; 48: 968-70.
- De Meyts P**. 2004. Insulin and its receptor: structure, function and evolution. *Bioessays*. Dec; 26(12):1351-62.
- Dhanalakshmi S**, Singh RP, Agarwal C, Agarwal R. 2002. Silibinin inhibits constitutive and TNF $\alpha$ -induced activation of NF-kappaB and sensitizes human prostate carcinoma DU145 cells to TNF $\alpha$ -induced apoptosis. *Oncogene*. Mar 7;21(11):1759-67.
- Diabetes Epidemiology Research International Group**. 1988. Geographic patterns of childhood insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes*. 37:1113–1119.
- Du W**, Wong FS, Li MO, Peng J, Qi H, Flavell RA, Sherwin R, Wen L. TGF-beta signaling is required for the function of insulin-reactive T regulatory cells. *J Clin Invest*. 2006 May;116(5):1360-70.
- Fehér J**, Lengyel G, Blázovics A. 1998. Oxidative stress in the liver and biliary tract diseases. *Scand J Gastroenterol*. 228:38-46.
- Fehér J**, Láng I, Nékám K, Csomós G, Müzes G, Deák G. 1987. Effect of silibinin on the activity and expression of superoxide dismutase in lymphocytes from patients with chronic alcoholic liver disease. *Free Radic Res Commun*.3(6):373-7.
- Fehér J**, Láng I, Nékám K, Gergely P, Müzes G. 1990. In vivo effect of free radical scavenger hepatoprotective agents on superoxide dismutase (SOD) activity in patients. *Tokai J Exp Clin Med*. 15(2-3):129-34.
- Feili-Hariri M**, Falkner DH, Gambotto A, Papworth GD, Watkins SC, Robbins PD, Morel PA. 2003. Dendritic cells transduced to express interleukin-4 prevent diabetes in nonobese diabetic mice with advanced insulinitis. *Hum Gene Ther* 1;14(1):13-23.
- Fraser de Llado TE**, González de Pijem L, Hawk B. 1998. Incidence of IDDM in children living in Puerto Rico. Puerto Rican IDDM Coalition. *Diabetes Care*. 21(5):744–746.
- Forrest JA**, Menser MA, Burgess JA. High frequency of diabetes mellitus in young patients with congenital rubella. *Lancet* 1971; ii: 332–34.
- Foulis A**, McGill M. 1997. A search for evidence of viral infection in pancreas of newly diagnosed patients with IDDM. *Diabetologia*. 40: 53-61
- Gallo D**, Giacomelli S, Ferlini C, Raspaglio G, Apollonio P, Prislei S, Riva A, Morazzoni P, Bombardelli E, Scambia G. 2003. Antitumour activity of the silybin-phosphatidylcholine complex, IdB 1016, against human ovarian cancer. *Eur J Cancer*. Nov;39(16):2403-10.
- Gebre-Medhin S**, Olofsson C, Mulder H. 2000. Islet amyloid polypeptide in the islets of Langerhans: friend or foe?. *Diabetologia*. Jun;43(6):687-95.
- Gutierrez-Dalmau A**, Campistol JM. 2007. Immunosuppressive Therapy and Malignancy in Organ Transplant Recipients : A Systematic Review. *Drugs*.67(8):1167-1198.
- Giralt Muiña P**, Urra Ardanaz JM, Sanabria Pérez C, Giralt Muiña J, Pérez Rodríguez MJ, Benito López P. Diferencias biológicas en la presentación de la diabetes A1, en relación con los marcadores genéticos HLA-DQ. *Med Clin (Barc)* 2003; 120 (1): 6-9.

- Green, A.** and the EURODIAB Subarea A study group. 1990. Geographical distribution of childhood type I (Insulin-dependent) diabetes in Europe: The Eurobiab subarea study. *Diabetologia*. 33:A17, 22.
- Goudy K,** Song S, Wasserfall C, Zhang YC, Kapturczak M, Muir A, Powers M, Scott-Jorgensen M, Campbell-Thompson M, Crawford JM, Ellis TM, Flotte TR, Atkinson MA. 2001. Adeno-associated virus vector-mediated IL-10 gene delivery prevents type 1 diabetes in NOD mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 20;98(24):13913-8.
- Gotfredsen CF,** Buschard K, Frandsen EK. 1985. Reduction of diabetes incidence of BB wistar rats by early prophylactic insulin treatment of diabetes-prone animals. *Diabetologia*. 28: 933-935.
- Granados-Arriola J,** Yamamoto-Furusho J. 1996. Las bases genéticas de las enfermedades autoinmunes. *Revista de Endocrinología y Nutrición*. 4 (1): 6-14.
- Harrison LC,** Dempsey-Collier M, Kramer DR, Takahashi K. 1996. Aerosol insulin induces regulatory CD8 gamma delta T cells that prevent murine insulin-dependent diabetes. *J Exp Med*. 184:2167-2174.
- Harrison LC.** 2005. The prospect of vaccination to prevent type 1 diabetes. *Hum Vaccin*. 1(4):143-50. Epub 2005 Jul 18.
- Hartman B,** Bellman K, Ghiea I. 1997. Oral insulin for diabetes prevention in NOD mice: potentiation by enhancing Th2 cytokine expression in the gut through bacterial adjuvant. *Diabetologia*. 40: 902-909.
- Hayashi, T.** et al. 2003. Interleukin-4-expressing plasmid DNA inhibits reovirus type-2-triggered autoimmune insulinitis in DBA/1 J suckling mice. *Int. J. Exp. Pathol*. 84, 101–106.
- He Q,** Osuchowski MF, Johnson VJ, Sharma RP. 2002. Physiological responses of a natural antioxidant flavonoid mixture, Silymarin, in Balb/c Mice: I. Induction of Transforming Growth Factor  $\beta$  1 and c-myc in liver with marginal effects on other genes. *Planta Med.*; 68: 676-679.
- He Q,** Kim J, Sharma RP. 2004. Silymarin protects against liver damage in BALB/c mice exposed to fumonisin B1 despite increasing accumulation of free sphingoid bases. *Toxicol Sci*. Aug;80(2):335-42.
- Ishizuka N,** Yagui K, Tokuyama Y, Yamada K, Suzuki Y, Miyazaki J, Hashimoto N, Makino H, Saito Y, Kanatsuka A. 1999. Tumor necrosis factor alpha signaling pathway and apoptosis in pancreatic beta cells. *Metabolism*. Dec;48(12):1485-92.
- Ionescu-Tîrgoviște C.** 2007. For a new paradigm of diabetes. *Rom J Intern Med.*;45(1):3-15.
- Johnson VJ,** Osuchowski MF, He Q, Sharma RP. 2002. Physiological responses of a natural antioxidant flavonoid mixture, Silymarin, in Balb/c Mice: II. Alterations in thymic differentiation correlate with changes in c-myc gene expression. *Planta Med.*; 68: 961-965.
- Johnson VJ,** He Q, Osuchowski MF, Sharma RP. 2003. Physiological responses of a natural antioxidant flavonoid mixture, Silymarin, in Balb/c Mice: III. Silymarin inhibits T-Lymphocyte function at low doses but stimulates inflammatory processes at high doses. *Planta Med.*; 69: 44-49.
- Hother–Nielsen O,** Faber O, Sørensen NS, Beck– Nielsen H. 1988. Classification of newly diagnosed diabetic patients as insulin–requiring or non–insulin–requiring based on clinical and biochemical variables. *Diabetes Care*; 11: 531–37.
- Humphrey ARG,** McCarty DJ, Mackay IR, Rowley MJ, Dwyer T, Zimmet P. 1998. Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase and phenotypic features associated with early insulin treatment in individuals with adult– onset diabetes mellitus. *Diabetic Med*; 15: 113–19.
- Jaramillo A,** Gill B. 1994. Insulin dependent diabetes mellitus in the non-obese diabetic mouse a disease mediated by T cell anergy. *Life sciences*. 55 (15): 1163-1177

- Japan and Pittsburgh Childhood Diabetes Research Groups.** 1985. Coma at onset of young insulin-dependent diabetes in Japan: the result of a nationwide survey. *Diabetes*; 34: 1241–46.
- Jonuleit H,** Schmitt E. 2003. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol.*; 171(12):6323-7.
- Kang JS,** Park SK, Yang KH, Kim HM. 2003. Silymarin inhibits TNF-alpha-induced expression of adhesion molecules in human umbilical vein endothelial cells. *FEBS Lett.* Aug 28;550(1-3):89-93.
- Kang JS,** Jeon YJ, Park SK, Yang KH, Kim HM. 2004. Protection against lipopolysaccharide-induced sepsis and inhibition of interleukin-1beta and prostaglandin E2 synthesis by silymarin. *Biochem Pharmacol.* Jan 1;67(1):175-81.
- Karjalainen J,** Knip M, Hyoty H, Linikki P, Ilonen J, Kaar M-L et al. 1988. Relationship between serum insulin antibodies, islet cell antibodies and Coxsackie-B4 and mumps virus-specific antibodies at the clinical manifestation of type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia*; 31: 146–52.
- Karvonen M,** Viik-Kajander MV, Moltchanova E, Libman I, LaPorte R, Tuomilehto J. 2000. Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group. *Diabetes Care*;23:1516–1526.
- Katiyar SK,** Korman NJ, Mukhtar H, Agarwal R. 1997. Protective effects of silymarin against photocarcinogenesis in a mouse skin model. *J Natl Cancer Inst.* Apr 16;89(8):556-66.
- Khalil I,** d'Auriol L, Gobet M, et al. A combination of HLA DQB Asp 57 negative and HLA DQA Arg 52 confers susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1990; 855: 1315-9.
- Kren V,** Walterová D. 2005. Silybin and silymarin--new effects and applications. *Biomed Pap.* 149(1):29-41.
- Kukko M,** Kimpimaki T, Korhonen S, Kupila A, Simell S, Veijola R, Simell T, Ilonen J, Simell O, Knip M 2005 Dynamics of diabetes-associated autoantibodies in young children with human leukocyte antigen-conferred risk of type 1 diabetes recruited from the general population. *J Clin Endocrinol Metab* 90:2712–2717
- Lahiri-Chatterjee M,** Katiyar SK, Mohan RR, Agarwal R. 1999. A flavonoid antioxidant, silymarin, affords exceptionally high protection against tumor promotion in the SENCAR mouse skin tumorigenesis model. *Cancer Res.* Feb 1;59(3):622-32.
- Lambert AP,** Gillespie KM, Thomson G, Cordell HJ, Todd JA, Gale EA, Bingley PJ 2004 Absolute risk of childhood-onset type 1 diabetes defined by human leukocyte antigen class II genotype: a population-based study in the United Kingdom. *J Clin Endocrinol Metab* 89:4037–4043
- Láng I,** Deák G, Nékám K, Müzes G, González-Cabello R, Gergely P, Fehér J. 1988. Hepatoprotective and immunomodulatory effects of antioxidant therapy. *Acta Med Hung.* 45(3-4):287-95.
- Láng I,** Nékám K, González-Cabello R, Müzes G, Gergely P, Fehér J. 1990a. Hepatoprotective and immunological effects of antioxidant drugs. *Tokai J Exp Clin Med.* May;15(2-3):123-7.
- Láng I,** Nékám K, Deák G, Müzes G, Gonzales-Cabello R, Gergely P, Csomós G, Fehér J. 1990b. Immunomodulatory and hepatoprotective effects of in vivo treatment with free radical scavengers. *Ital J Gastroenterol.* 22(5):283-7.
- Lee, M.** et al. 2002. Prevention of autoimmune insulinitis by delivery of interleukin-4 plasmid using a soluble and biodegradable polymeric carrier. *Pharm. Res.* 19, 246–249
- Lendrum R,** Walker G, Gamble DR 1975. Islet-cell antibodies in juvenile diabetes mellitus of recent onset. *Lancet* 1:880–882.

- Liu YJ**, Hellman B, Gylfe E. 1999. Ca<sup>2+</sup> signaling in mouse pancreatic polypeptide cells. *Endocrinology*. Dec;140(12):5524-9.
- Liu E**, Abiru N, Moriyama H, Miao D, Eisenbarth GS. 2002. Induction of insulin autoantibodies and protection from diabetes with subcutaneous insulin B:9-23 peptide without adjuvant. *Ann N Y Acad Sci*. 958:224-7.
- Like A**, Appel M. 1982. Autoantibodies in the BB/W rat. *Diabetes*. 31. 815-820.
- Lu J**, Li Q, Xie H. 1996. Identification of a second transmembrane protein tyrosine phosphatase IA-2 beta, as an autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus: precursor of the 37 kDa tryptic fragment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93: 2307-2311.
- Magliulo E**, Gagliardi B, Fiori GP. 1978. Results of a double blind study on the effect of silymarin in the treatment of acute viral hepatitis, carried out at two medical centres. *Med Klin*. Jul 14;73(28-29):1060-5.
- Manna SK**, Mukhopadhyay A, Van NT, Aggarwal BB. 1999. Silymarin suppresses TNF-induced activation of NF- $\kappa$ B, c-Jun N-terminal kinase, and apoptosis. *J Immunol*. 163:6800-6809.
- Matsuda T**, Ferreri K, Todorov I, Kuroda Y, Smith CV, Kandeel F, Mullen Y. 2005. Silymarin protects pancreatic  $\beta$ -cells against cytokine-mediated toxicity: Implication of c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase and janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathways. *Endocrinology*. 146 (1):175-185.
- Meroni PL**, Barcellini W, Borghi MO, Vismara A, Ferraro G, Ciani D, Zanussi C. 1988. Silybin inhibition of human T-lymphocyte activation. *Int J Tissue React.*;10(3):177-81.
- Middlebrook AJ**, Lebsack T, Deluca D. 2007. TNF-alpha mediated modulation of T cell development and exacerbation of in vitro T1DM in fetal thymus organ culture. *J Autoimmun*. Sep-Nov;29(2-3):134-45. Epub 2007 Aug 23.
- Muir A**, Peck A, Clare-Salzler M, Song YH, Cornelius J, Luchetta R, Krischer J, Maclaren N. 1995. Insulin immunization of nonobese diabetic mice induces a protective insulinitis characterized by diminished intraislet interferon-gamma transcription. *J Clin Invest*. 95(2):628-34.
- Müzes G**, Deák G, Láng I, Nékám K, Gergely P, Fehér J. 1991. Effect of the bioflavonoid silymarin on the in vitro activity and expression of superoxide dismutase (SOD) enzyme. *Acta Physiol Hung*.78(1):3-9.
- Morazzoni P**, Bombardelli E. 1995. *Silybum marianum* (Carduus marianus). *Fitoterapia* 64, 3-42.
- Moriwaki M**, Itoh N, Miyagawa J, Yamamoto K, Imagawa A, Yamagata K, Iwahashi H, Nakajima H, Namba M, Nagata S, Hanafusa T, Matsuzawa Y. 1999. Fas and Fas ligand expression in inflamed islets in pancreas sections of patients with recent-onset Type I diabetes mellitus. *Diabetologia*. Nov;42(11):1332-40.
- Neuman MG**, Cameron RG, Haber JA, Katz GG, Malkiewicz IM, Shear NH. 1999. Inducers of cytochrome P450 2E1 enhance methotrexate-induced hepatocytotoxicity. *Clin Biochem*. Oct;32(7):519-36.
- Ott PA**, Anderson MR, Tary-Lehmann M, Lehmann PV. CD4+CD25+ regulatory T cells control the progression from periinsulinitis to destructive insulinitis in murine autoimmune diabetes. *Cell Immunol*. 2005b May;235(1):1-11.
- Pak CY**, Eun H, McArthur RG, Yoon J. Association of cytomegalovirus infection with autoimmune type 1 diabetes. *Lancet* 1988; ii: 1-4.
- Palasciano G**, Portincasa P, Palmieri V. 1994. The effect of silymarin on plasma levels of malone-dialdehyde in patients receiving long-term treatment with psychotropic drugs. *Curr Ther Res*. 55 (5): 537-45.

- Pearl-Yafe M**, Kaminitz A, Yolcu ES, Yaniv I, Stein J, Askenasy N. 2007. Pancreatic islets under attack: cellular and molecular effectors. *Curr Pharm Des.*;13(7):749-60.
- Pennline KJ** et al., 1994. Recombinant human IL10 prevents the onset of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 71, 169-175.
- Ploix C**, Bergerot I, Durand A, Czerkinsky C, Holmgren J, Thivolet C. 1999. Oral administration of cholera toxin B-insulin conjugates protects NOD mice from autoimmune diabetes by inducing CD4+ regulatory T-cells. *Diabetes.* Nov;48(11):2150-6.
- Polyak SJ**, Morishima C, Shuhart MC, Wang CC, Liu Y, Lee DY. 2007. Inhibition of T-cell inflammatory cytokines, hepatocyte NF-kappaB signaling, and HCV infection by standardized Silymarin. *Gastroenterology.* May;132(5):1925-36. Epub 2007 Feb 21.
- Pop SM**, Wong CP, Culton DA, Clarke SH, Tisch R. Single cell analysis shows decreasing FoxP3 and TGFbeta1 coexpressing CD4+CD25+ regulatory T cells during autoimmune diabetes. *J Exp Med.* 2005; 201(8):1333-46.
- Pradhan SC**, Girish C. 2006. Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. *Indian J Med Res* 124;491-504
- Provinciali M**, Papalini F, Orlando F, Pierpaoli S, Donnini A, Morazzoni P, Riva A, Smorlesi A. 2007. Effect of the silybin-phosphatidylcholine complex (IdB 1016) on the development of mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice. *Cancer Res.* Mar 1;67(5):2022-9.
- Quattrin T**, Bélanger A, Bohannon NJV, Schwartz SL. 2004. Exubera Phase III Study Group. Efficacy and safety of inhaled insulin (Exubera) compared with subcutaneous insulin therapy in patients with type 1 diabetes. Results of a 6-month, randomized, comparative trial. *Diabetes Care.* 27:2622-2627.
- Rabinovitch A**, Suarez-Pinzon WL. 1996. Cytokines and their roles in pancreatic islet  $\beta$ -cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. *Biochemical Pharmacology.* 55: 1139-1149.
- Raz I**, Avron A, Tamir M, Metzger M, Symer L, Eldor R, Cohen IR, Elias D. 2007. Treatment of new-onset type 1 diabetes with peptide DiaPep277 is safe and associated with preserved beta-cell function: extension of a randomized, double-blind, phase II trial. *Diabetes Metab Res Rev.* 23(4):292-8.
- Raz I**, Eldor R, Naparstek Y. 2005. Immune modulation for prevention of type 1 diabetes mellitus. *Trends in Biotechnology* 23 (3):128-134.
- Rodriguez-Reyna T**, Zuniga-Ramos J, Granados-Arriola J. 1998. Inmunogenética de la diabetes mellitus insulino-dependiente. *Revista de Endocrinología y Nutrición.* 6 (1): 7-10.
- Rother KI**, Harlan DM. 2004. Challenges facing islet transplantation for the treatment of type 1 diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 114(7):877-83.
- Roep B.** 1996. T-cell responses to autoantigens in IDDM. *Diabetes.* 45: 1147-1156.
- Rosenfeld L.** 2002. Insulin: discovery and controversy. *Clin Chem.* 48(12):2270-88.
- Rosenbaum T**, Sánchez-Soto MC, Hiriart M. Nerve growth factor increases insulin secretion and barium current in pancreatic beta-cells. *Diabetes.* 2001 Aug;50(8):1755-62.
- Ross KY.** 2007. Histología. Texto y Atlas a Color con Biología Celular y Molecular: Panamericana.
- Saukkonen T**, Savilahti E et al., 1994. Children with newly diagnosed IDDM have increased levels of antibodies to bovine serum albumin but not to ovalbumin. *Diabetes care.* 17 (9): 970-976.
- Schuppan D**, Koda M, Bauer M, Hahn EG. 2000. Fibrosis of liver, pancreas and intestine: common mechanisms and clear targets? *Acta Gastroenterol Belg.* Oct-Dec;63(4):366-70.

- Shapiro AM**, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. 2000. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med.* 27;343(4):230-8.
- Skyler JS**, Weinstock RS, Raskin P, et al; 2005. Inhaled Insulin Phase III Type 1 Diabetes Study Group. Use of inhaled insulin in a basal/bolus insulin regimen in type 1 diabetic subjects. A 6-month, randomized, comparative trial. *Diabetes Care.* 28:1630-1635.
- Sorenson RL**, Garry DG, Brelje TC. 1991. Structural and functional considerations of GABA in islets of Langerhans. Beta-cells and nerves. *Diabetes.* Nov;40(11):1365-74.
- Soto C**, Recoba R, Barrón H, Alvarez C, Favari L. 2003. Silymarin increases antioxidant enzymes in alloxan-induced diabetes in rat pancreas. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 136(3):205-12.
- Soto C**, Mena R, Luna J, Cerbon M, Larrieta E, Vital P, Uria E, Sanchez M, Recoba R, Barron H, Favari L, Lara A. 2004. Silymarin induces recovery of pancreatic function after alloxan damage in rats. *Life Sci.* 2004 Sep 17;75(18):2167-80.
- Suk K**, Kim S, Kim YH, Kim KA, Chang I, Yagita H, Shong M, Lee MS. 2001. IFN-gamma/TNF-alpha synergism as the final effector in autoimmune diabetes: a key role for STAT1/IFN regulatory factor-1 pathway in pancreatic beta cell death. *J Immunol.* Apr 1;166(7):4481-9.
- Suarez-Pinzon WL**, Rabinovitch A. Approaches to type 1 diabetes prevention by intervention in cytokine immunoregulatory circuits. *Int J Exp Diabetes Res.* 2001;2(1):3-17.
- Tănăsescu C**, Petrea S, Băldescu R, Macarie E, Chiriloiu C, Purice S. 1988. Use of the Romanian product Silimarina in the treatment of chronic liver diseases. *Med Interne.* Oct-Dec;26(4):311-22.
- Tominaga Y**, Nagata M, Yasuda H, Okamoto N, Arisawa K, Moriyama H, Miki M, Yokono K, Kasuga M. 1998. Administration of IL-4 prevents autoimmune diabetes but enhances pancreatic insulinitis in NOD mice. *Clin Immunol Immunopathol.* 86(2):209-18.
- Todd JA**, J. I. Bell, and H. O. McDevitt. 1987. HLA-DQB gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature (Lond.).* 329:599-604.
- Tyagi AK**, Agarwal C, Chan DCF, Agarwal R. 2003. Synergistic anti-cancer effects of silibinin with conventional cytotoxic agents doxorubicin, cisplatin and carboplatin against human breast carcinoma MCF-7 and MDA-MB468 cells. *Oncol Rep* 11, 493–499.
- Varghese L**, Agarwal C, Tyagi A, Singh RP, Agarwal R. 2005. Silibinin efficacy against human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.* Dec 1;11(23):8441-8.
- Velussi M**, Cernigoi AM, De Monte A, et al., 1997. Long-term (12 months) treatment with an anti-oxidant drug (silymarin) is effective on hyperinsulinemia, exogenous insulin need and malondialdehyde levels in cirrhotic diabetic patients. *J Hepatol.* 26: 871-9.
- Vidaltamayo R**, Mery CM, Angeles-Angeles A, Robles-Díaz G, Hiriart M. 2003. Expression of nerve growth factor in human pancreatic beta cells. *Growth Factors.* Sep-Dec;21(3-4):103-7
- von Schönfeld J**, Weisbrod B, Müller MK. 1997. Silibinin, a plant extract with antioxidant and membrane stabilizing properties, protects exocrine pancreas from cyclosporin A toxicity. *Cell Mol Life Sci.* Dec;53(11-12):917-20.
- Vreugdenhill G**, Geluk A et al., 1998. Molecular mimicry in diabetes mellitus: the homologous domain in coxsackie B virus protein 2C and islet autoantigen GAD 65 is highly conserved in the coxsackie B-like enteroviruses and binds to the diabetes associated HLA-DR3 molecule. *Diabetología.* 41: 40-46.
- Wells RG.** 2000. Fibrogenesis. V. TGF-beta signaling pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* Nov, 279(5):G845-50.

- Wellington K**, Jarvis B. 2001. Silymarin: a review of its clinical properties in the management of hepatic disorders. *BioDrugs*;15(7):465-89.
- Wilasrusmee C**, Kittur S, Shah G, Siddiqui J, Bruch D, Wilasrusmee S, Kittur DS. 2002 Immunostimulatory effect of Silybum Marianum (milk thistle) extract. *Med Sci Monit*. Nov;8(11):BR439-43.
- Willis JA**, Scott RS, Brown LJ, Forbes LV, Schmidli RS, Zimmet PZ et al. Islet cell antibodies and antibodies against glutamic acid decarboxylase in newly diagnosed adult-onset diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 1996; 33: 89–97.
- Wolfe, T.** et al. 2002. Endogenous expression levels of autoantigens influence success or failure of DNA immunizations to prevent type 1 diabetes: addition of IL-4 increases safety. *Eur. J. Immunol*. 32, 113–121
- Wood SC** et al., 1999. Multidose streptozotocin induction of diabetes in BALB/c mice induces a T cell proliferation defect in thymocytes which is reversible by interleukin-4. *Cell. Immunol*. 192, 1-12.
- World Health Organization.** Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications.
- Yoo HG**, Jung SN, Hwang YS, Park JS, Kim MH, Jeong M, Ahn SJ, Ahn BW, Shin BA, Park RK, Jung YD. 2004. Involvement of NF-kappaB and caspases in silibinin-induced apoptosis of endothelial cells. *Int J Mol Med*. Jan;13(1):81-6.
- Yu L**, Rewers M, Gianani R, Kawasaki E, Zhang Y, Verge C, Chase P, Klingensmith G, Erlich H, Norris J, Eisenbarth GS 1996 Antiislet autoantibodies usually develop sequentially rather than simultaneously. *J Clin Endocrinol Metab* 81:4264–4267.
- Zaccone P**, Phillips J, Conget I, Gomis R, Haskins K, Minty A, Bendtzen K, Cooke A, Nicoletti F. 1999. Interleukin-13 prevents autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes*. 48(8):1522-8
- Zhao J**, Sharma Y, Agarwal R. 1999. Significant inhibition by the flavonoid antioxidant silymarin against 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-caused modulation of antioxidant and inflammatory enzymes, and cyclooxygenase 2 and interleukin-1alpha expression in SENCAR mouse epidermis: implications in the prevention of stage I tumor promotion. *Mol Carcinog*. Dec;26(4):321-33.
- Zhang ZJ**, Davidson L, Eisenbarth G, Weiner HL. 1991. Suppression of diabetes in nonobese diabetic mice by oral administration of porcine insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88:10252-10256.
- Ziegler AG**, Hummel M, Schenker M, Bonifacio E 1999 Autoantibody appearance and risk for development of childhood diabetes in offspring of parents with type 1 diabetes. The 2-year analysis of the German BABYDIAB study. *Diabetes* 48:460–468
- Zi, X.**, D. K. Feyes, R. Agarwal. 1998a. Anticarcinogenic effect of a flavonoid antioxidant, silymarin, in human breast cancer cells MDA-MB 468: induction of G1 arrest through an increase in Cip1/p21 concomitant with a decrease in kinase activity of cyclin-dependent kinases and associated cyclins. *Clin. Cancer Res*. 4:1055.
- Zi, X.**, A. W. Grasso, H. J. Kung, R. Agarwal. 1998b. A flavonoid antioxidant, silymarin, inhibits activation of erbB1 signaling and induces cyclin-dependent kinase inhibitors, G1 arrest, and anticarcinogenic effects in human prostate carcinoma DU145 cells. *Cancer Res*. 58:1920.
- Zi, X.**, H. Mukhtar, R. Agarwal. 1997. Novel cancer chemopreventive effects of a flavonoid antioxidant silymarin: inhibition of mRNA expression of an endogenous tumor promoter TNF alpha. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 239:334-339.
- Zimmet PZ**, Tuomi T, Mackay R, Rowley MJ, Knowles W, Cohen M et al. Latent autoimmune diabetes mellitus in adults (LADA): the role of antibodies to glutamic acid decarboxylase in

diagnosis and prediction of insulin dependency. *Diabetic Med* 1994;**11**: 299–303.

**Zimmet PZ.** The pathogenesis and prevention of diabetes in adults. *Diabetes Care* 1995; **18**: 1050–64.**Zipris, D.** and Karnieli, E. 2002 A single treatment with IL-4 via retrovirally transduced lymphocytes partially protects against diabetes in BioBreeding (BB) rats. *JOP* 3, 76–82

**Zuniga-Gonzalez S.** 1995. Etiología, fisiopatología, clínica y tratamiento de la diabetes mellitus tipo I. *Medicina General*. Abril. 11-25.