



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO. División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Formato SS-T

SOLICITUD DE TÉRMINO DE SERVICIO SOCIAL

Mtra. María Elena Contreras Garfias
Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud
PRESENTE

Por este medio le informo del término del Servicio Social, cuyos datos son los siguientes :

Fecha de Recepción	Día	Mes	Año	Fecha de Aprobación	Día	Mes	Año
--------------------	-----	-----	-----	---------------------	-----	-----	-----

Datos del Alumno

Nombre : Angel Gamaliel Chávez Quintero	
Matrícula : 206366707	Licenciatura : Química Farmacéutica Biológica
Domicilio : Calle Norte 13 No. 186 Depto. 206. Colonia Moctezuma 2 sección C.P. 15530 Alcaldía Venustiano Carranza	
Teléfono : 5514945145	Celular : 5574235124
Correo Electrónico : gamaliel47@hotmail.com	CURP : CAQA850802HDFHNN06

Datos del Proyecto

Nombre del Proyecto : Efecto de la silimarina en la expresión génica del factor de transcripción Pdx-1, en un modelo experimental de pancreatocetomía al 90%							
Lugar donde se realizó el Servicio Social : Universidad Autonoma Metropolitana Unidad:Xochimilco							
Dependencia : Educativo							
Entidad Federativa : Distrito Federal							
Municipio : Coyoacan				Localidad :			
Fecha de Inicio	Día	Mes	Año	Fecha de Término	Día	Mes	Año
	06	09	2010		30	03	2011

PARA SER LLENADO POR LOS ASESORES

Sector: 1.- Educativo Tipo: 2.- Interno

Orientación: 8.- Salud, Alimentación Y Nutrición

FIRMAS

Dra. Tomasa Verónica Barón Flores

Asesor Interno
Nombre, firma y No. Económico

Angel Gamaliel Chávez Quintero

Alumno
Nombre, firma

Asesor Externo
Nombre, firma y No. Económico

Dra. Tomasa Verónica Barón Flores

Vo. Bo. de la Comisión
Nombre y firma de la persona que autoriza



México CDMX a 09 de junio de 2021

Dr. Juan Esteban Barranco Florido
Jefe del Departamento de Sistemas Biológicos
Presente

Por medio de la presente me permito comunicar a usted que el alumno: Angel Gamaliel Chavez Quintero, matrícula 206366707 concluyó el proyecto de Servicio Social Efecto de la silimarina en la expresión génica del factor de transcripción Pdx-1, en un modelo experimental de pancreatectomía al 90%. Que se realizó en la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco.

Ubicado en Calz. del Hueso 1100, Coapa, Villa Quietud, Coyoacán, 04960 Ciudad de México, CDMX

Del 06 de septiembre del 2010 al 30 de marzo del 2011, bajo mi asesoría.

Cubriendo un total de 480 horas.

Atentamente:

Dra. Tomasa Verónica Barón Flores

c.c.p. Mtra. María Elena Contreras Garfias
Directora de la División de CBS UAM-X

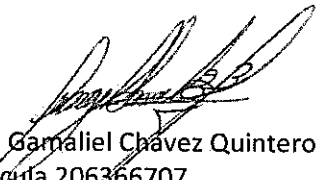


México CDMX a 09 de junio de 2021

C.D.E. Patricia Enzaldo de la Cruz
Coordinadora Divisional del Servicio Social
Presente

Por medio de la presente me permito informar la terminación de mi servicio social, el cual lleve a cabo en la Universidad Autónoma Metropolitana en el departamento de Farmacología. El nombre del proyecto que realice es Efecto de la silimarina en la expresión génica del factor de transcripción Pdx-1, en un modelo experimental de pancreatectomía al 90%. Bajo la asesoría de la Dra. Tomasa Verónica Barón Flores, cubriendo un total de 480 horas del 06 de septiembre del 2010 al 30 de marzo del 2011.

Atentamente:



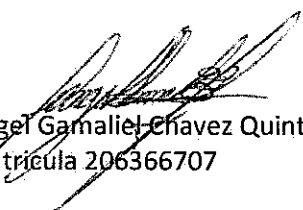
Angel Gamaliel Chávez Quintero
Matrícula 206366707

México CDMX a 09 de junio de 2021

Dr. Juan Esteban Barranco Florido
Jefe del Departamento de Sistemas Biológicos
Presente

Por medio de la presente me permito informar la terminación de mi servicio social, el cual lleve a cabo en la Universidad Autónoma Metropolitana en el departamento de Farmacología. El nombre del proyecto que realice es Efecto de la silimarina en la expresión génica del factor de transcripción Pdx-1, en un modelo experimental de pancreatoclectomía al 90%. Bajo la asesoría de la Dra. Tomasa Verónica Barón Flores, cubriendo un total de 480 horas del 06 de septiembre del 2010 al 30 de marzo del 2011.

Atentamente:



Angel Gamaliel Chavez Quintero
Matrícula 206366707

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

INFORME DE ACTIVIDADES DEL SERVICIO SOCIAL:

“Efecto de la silimarina en la expresión génica del factor de transcripción Pdx-1, en un modelo experimental de pancreatoclectomía al 90%.”

PERTENECIENTE AL PROYECTO GENÉRICO:

Evaluación de Productos Relacionados con la Salud.

Alumno: Angel Gamaliel Chavez Quintero Matrícula: 206366707

Asesor(es):

**Lugar de realización: Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad-Xochimilco.**

Fecha de inicio y terminación: Septiembre 2010 – Marzo 2011

Abril 2011

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	2
2.	MARCO TEÓRICO	4
2.1.	Diabetes Mellitus	4
2.2.	Metabolismo de la glucosa en enfermedades del páncreas	4
2.3.	Impacto e índice de mortalidad	5
2.4.	Factores de riesgo y tratamiento	5
2.5.	Anatomía y fisiología del páncreas	6
2.6.	Insulina	8
2.7.	Glucagón	10
2.8.	Somatostatina	11
2.9.	Morfogénesis del páncreas	11
2.10.	Control transcripcional del desarrollo pancreático endocrino	13
2.11.	Señalización y desarrollo pancreático	16
2.12.	Silimarina	18
2.12.1.	Propiedades generales	20
2.12.2.	Propiedades particulares	21
2.12.3.	Ensayos de toxicidad	22
2.12.4.	Aspectos farmacocinéticos.	22
3.	IMPORTANCIA DEL MODELO DE ESTUDIO	23
4.	OBJETIVOS	25
4.1.	Planteamiento del problema	25
4.2.	Objetivo General	25
4.3.	Objetivos Específicos	25
5.	DESARROLLO EXPERIMENTAL	26
5.1.	Metodología	27
5.1.1.	Obtención de muestras	27
5.1.2.	Cuantificación del RNA	27
5.1.3.	Determinación de la integridad del RNA	28
5.1.4.	Determinación semicuantitativa del factor de transcripción Pdx-1 en la diferenciación de las células β .	28
5.1.5.	Determinación bioquímica de glucosa en suero por el método Baner.	30
5.1.6.	Métodos estadísticos	31
6.	RESULTADOS	32
7.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	35
7.1.	Efecto de la Silimarina sobre la expresión génica del factor de transcripción Pdx-1.	35
7.2.	Efecto de la Silimarina sobre los niveles sanguíneos de glucosa.	35
8.	DISCUSIÓN	36
9.	OBJETIVOS Y METAS ALCANZADAS	39
10.	CONCLUSIONES	39
11.	BIBLIOGRAFÍA	40
12.	RESUMEN	48

1. INTRODUCCIÓN.

La diabetes se produce cuando el cuerpo es incapaz de producir cantidades suficientes de insulina, la hormona que regula el nivel de glucosa en la sangre.

Cambios en la nomoglucemia es decir incremento así como disminución, afecta negativamente la salud humana. La reducción de los niveles de glucosa pueden resultar en un coma hipoglucémico, mientras que los prolongados episodios de hiperglucemia dan lugar a complicaciones a largo plazo.

En base a las causas subyacentes de la enfermedad, la diabetes se divide en varias categorías. La forma más común se clasifica como diabetes tipo 2, resultante de la alteración de la función de células- β combinada con resistencia a la insulina en los órganos periféricos (Butler, 2006). En contraste, la diabetes tipo 1, causada por la eliminación casi completa de las células pancreáticas- β debido a la respuesta autoinmune, afecta sólo aproximadamente el 10% de los pacientes diabéticos (Sordi, 2008).

Además una vez manifestada la diabetes los hipoglicemiantes orales son poco eficientes en su tratamiento, debido a la destrucción progresiva de los islotes que esta ocurriendo. (Carpenter, 2006)

Aunque la terapia actual con insulina exógena ha mejorado en gran medida la vida de los pacientes diabéticos desde la década de 1920 (Banting, 1922), este método es inexacto y no controla completamente las fluctuaciones minuto a minuto de la glucosa sanguínea sistémica. Dado el hecho de que la función de las células- β y la liberación de insulina está alterada en ambos grupos, una cura real tendría que provenir recién

formadas o reposición de células- β capaces de restaurar la normoglucemia (Bonner-Weir, 2005).

Es así que la pancreatectomía al 90 % han sido utilizada como modelo para inducir diabetes experimentalmente en páncreas de roedores para examinar la regeneración pancreática, el cual tiene un enorme potencial para regenerar células- β pues una resección quirúrgica es traducida como un estímulo regenerativo que induce al precursor pancreático celular a experimentar una fase de proliferación y diferenciación que conduce a la restauración del órgano perdido.

Este proceso de regeneración pancreática es similar al desarrollo embrionario del páncreas endocrino, pues en ambos procesos, precursores multipotentes celulares proliferan y se diferencian para conducir al reestablecimiento de células β -pancreáticas; ambos fenómenos controlados y dirigidos por varios factores de transcripción.

La Silimarina, es un flavonoide extraído del cardo mariano *Silybum marianum*. Se ha demostrado representa una nueva posibilidad en el tratamiento de la diabetes mellitus, no solo por el aumento en los niveles de insulina sino también en la recuperación de la función pancreática (Soto y col., 2004) al producir un aumento en la síntesis de RNA ribosomal y transcripcional, así como un aumento en la velocidad en la síntesis de proteínas estructurales y funcionales. Por esto, en el presente trabajo se estudió el efecto de la Silimarina sobre la expresión génica de insulina y del factor de transcripción Pdx-1 en la regeneración de células β -pancreáticas productoras de insulina.

2. MARCO TEÓRICO.

2.1. Diabetes Mellitus

La diabetes mellitus (DM) engloba varios padecimientos crónico-degenerativos. La DM tipo 1 y el tipo 2 comparten como característica común la hiperglucemia, ya sea debido a una disminución y deterioro progresivo de la masa de células β en los islotes pancreáticos y una disminución en la eficiencia de los mecanismos de señalización.

2.2. Metabolismo de la glucosa en enfermedades del páncreas.

En el páncreas, entre las células acinares que constituyen al páncreas exocrino, se encuentran los islotes de Langerhans, en el que una disfunción en su relación causa la disminución de la función exo-endocrina del mismo.

En la pancreatitis aguda y crónica la reducción de la función exocrina del páncreas es evidente debido al daño morfológico y estructural del mismo, el cual es capaz de desarrollar manifestaciones clínicas de insuficiencia endocrina, como la Diabetes Mellitus por la destrucción de islotes provocando un aumento en los niveles de glucosa al disminuir los niveles de insulina producida en el páncreas. (Zoltán B., 2004)

Individuos con Diabetes tipo 1 (insulinodependiente), presentan una secreción endógena baja de insulina o inexistente. En este tipo de diabetes prevalece un desorden autoinmune en el cual células T activas se infiltran en los islotes de Langerhans y destruyen completamente a las células β pancreáticas encargadas de la producción de insulina.

Por otro lado los pacientes con DM no insulino dependientes (Diabetes tipo 2), mantienen cierta capacidad secretora de insulina endógena, pero las células del cuerpo no pueden usarla eficientemente porque las células son resistentes a esta debido a que presentan una marcada insensibilidad a sus acciones metabólicas, a causa de la disminución de receptores insulínicos.

2.3. Impacto e índice de mortalidad.

Entre las enfermedades con mayor índice de mortalidad en México la Diabetes ocupa el primer lugar de incidencia, con una tasa de 1/46 personas, esto equivale al 10.7 5 total de la población durante el año 2000, según las estadísticas de la SSA. La Diabetes Mellitas tipo 2 es la más frecuente en la población, por lo que comprende un porcentaje muy elevado, además que tanto las repercusiones son tanto médicas, económicas y sociales.

2.4. Factores de riesgo y tratamiento.

Los principales factores de riesgo, en términos generales, para desarrollar DM (tipo 1 y 2) incluyen edad avanzada, obesidad, antecedentes genéticos, hijos macrosómicos, dislipidemias, hipertensión arterial sistémica (HTAS) y sedentarismo. (Karter y col, 1998)

En su tratamiento la dieta es muy importante, al igual que el ejercicio, la insulina y los hipoglucemiantes orales.

2.5. Anatomía y fisiología del páncreas.

El páncreas es una glándula digestiva alargada de 12-15cm, pesa entre 60 a 140 g que se sitúa cerca del plano transpilórico, en una posición más o menos transversal, a lo largo de la pared posterior del abdomen, por detrás del estómago.

Posee una consistencia blanda y coloración gris-rosada, parénquima lobulado por tabiques fibrosos que lo dividen en lóbulos visibles a la macroscopia. A su parte central se le llama cuerpo del páncreas. Su parte derecha es algo más ancha y se llama cabeza del páncreas. Su parte más estrecha es la de la izquierda, y se conoce como cola del páncreas.

El páncreas es una glándula exocrina y endocrina que produce jugo pancreático (como secreción externa) compuesto de una gran variedad de enzimas digestivas, que penetran en el duodeno a través del conducto pancreático donde contribuyen a la digestión de los alimentos que han cruzado el estómago. Y secreciones internas: glucagón e insulina que penetran en la sangre para contribuir en la regulación de la concentración de la glucosa.

El páncreas secreta alrededor de 2 a 2.5 litros de líquido al día, rico en agua, bicarbonato y enzimas digestivas (amilasa pancreática, tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasa y lipasa pancreática).

Desde un punto de vista histológico, posee dos componentes el páncreas exocrino y el endocrino (figura 1a y 1b). El páncreas exocrino corresponde entre el 80 u 85 % del parénquima. Formado por acinos, constituidos por células epiteliales piramidales orientadas radialmente al centro de la glándula. Sus núcleos son pequeños, basales, citoplasmas basófilos pues contienen abundante retículo endoplásmico y aparato de Golgi para la elaboración de enzimas digestivas.

Desde estos acinos parten finísimos conductos colectores que se anastomosan para originar el sistema ductal pancreático que en un inicio está revestida por epitelio cúbico, transformándose en los de mayor calibre en epitelio cilíndrico mucosecretor.

El páncreas endocrino está constituido por más o menos 1 millón de grupos microscópicos de células llamadas islotes de Langerhans, típicamente redondos u ovals, que están localizados dentro de la porción exocrina del tejido (células acinares), pero separados de este por finas fibras de tejido conectivo. En un adulto pesan 1 a 1,5 g y miden de 100 a 200 μm . Hay tres tipos de células que se encuentran en estos agrupamientos. (Anandwardhan, 2004)

Las células α que comprenden el 20 % de un islote típico, usualmente se localizan en la periferia del islote, las cuales secretan la hormona glucagón, que aumenta la concentración de glucosa en la sangre.

Las células β constituyen el 75 % del islote y son las encargadas de secretar la hormona insulina que disminuye la concentración de glucosa en la sangre y se localizan al centro del islote.

Las células δ , presentes en una cantidad mucho más pequeña, secretan la hormona somatostatina que se desempeña como factor inhibidor de STH, esta hormona inhibe la secreción de la insulina y el glucagón y además contiene células F o PP, que son la fuente del polipéptido pancreático. (Hardley E., 1996)

Los islotes están altamente vascularizados, con redes de capilares que permanecen en estrecho contacto con las células productoras de hormonas, lo que posibilita el monitoreo continuo de la glucosa sanguínea y secreción de las hormonas reguladoras: insulina, glucagón y somatostatina.

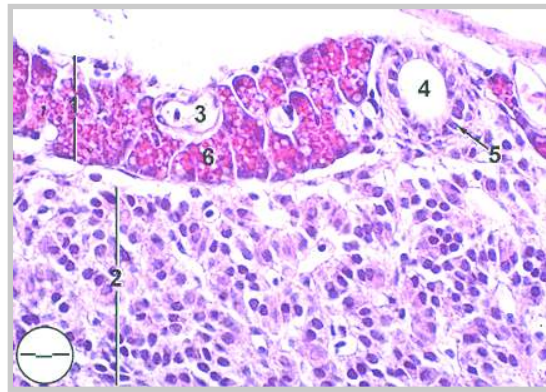


Figura 1a. Tejido endocrino y exocrino pancreático (a) (Tinción Hematoxilina-Eosina, barra de 15.9 μm). 1. Tejido pancreático exocrino (células acinares); 2. tejido endocrino pancreático encapsulado (islotos de Langerhans); 3. vaso sanguíneo; 4. ducto pancreático; 5. epitelio cúbico; 6. gránulos enzimáticos.

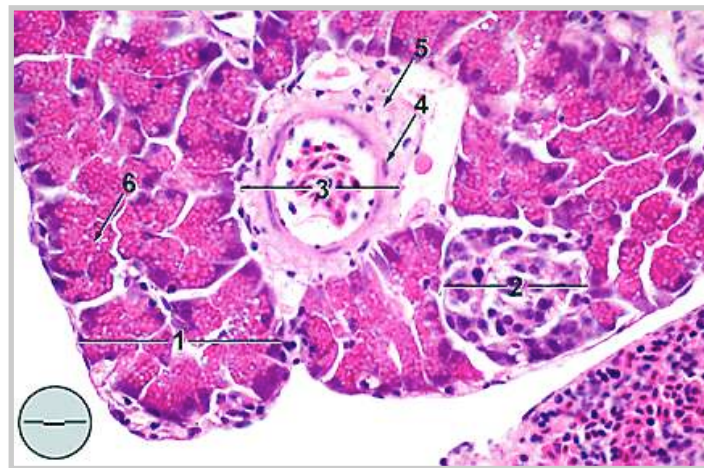


Figura 1b. Tejido endocrino y exocrino pancreático (b) (Tinción Hematoxilina-Eosina, barra de 22.2 μm). 1. Tejido pancreático exocrino (células acinares); 2. tejido endocrino pancreático encapsulado (islotos de Langerhans); 3. vaso sanguíneo 4. endotelio; 5. tejido conectivo; 6. gránulos enzimáticos.

2.6. Insulina.

El glucagón y la insulina son las secreciones endocrinas del páncreas relacionadas con la regulación de concentración de glucosa en la sangre.

La insulina es un polipéptido que consiste en dos cadenas, A y B de 21 y 30 aminoácidos respectivamente. Las dos cadenas del dímero están unidas a través de un par de enlaces disulfuro; un enlace disulfuro conecta al sexto y onceavo aminoácido

entre la cadena A. La cadena B tiene 30 residuos de aminoácidos. La ruptura de los enlaces disulfuro destruye la actividad biológica. (Hardley E., 1996)

Las células β fabrican insulina en etapas. La primera etapa es la producción de la proinsulina en sus ribosomas. La proinsulina es una molécula formada por una cadena proteínica de 81 aminoácidos, que es precursora de la insulina. Las células β del páncreas procesan la proinsulina en su aparato de Golgi, convirtiéndola en insulina por la sustracción enzimática del péptido C, que es una estructura de 30 aminoácidos que conecta las cadenas A y B y que no tiene ninguna función conocida (figura 2).

La insulina se almacena en las células β en gránulos secretorios, que se preparan para liberarla en la circulación sanguínea, en respuesta al estímulo de una concentración creciente de glucosa en sangre. Un páncreas que funciona normalmente puede fabricar y liberar diariamente de 40 a 50 unidades de insulina. Además, tiene varias cientos de unidades almacenadas y disponibles para ser secretadas cuando se necesitan.

La principal acción fisiopatológica de la insulina es de carácter anabólico y es opuesta a la del glucagón y se presenta de varias maneras: acelera el transporte de glucosa desde la sangre hacia las células, en especial las fibras del músculo esquelético, tejido graso e hígado para los procesos de síntesis con gasto de energía. La glucosa que entra hacia las células depende de la presencia de receptores en la superficie de las células blanco, también acelera la conversión de glucosa a glucógeno, a su vez disminuye la glucogenolisis y la gluconeogénesis, estimula la lipogénesis la síntesis de proteínas.

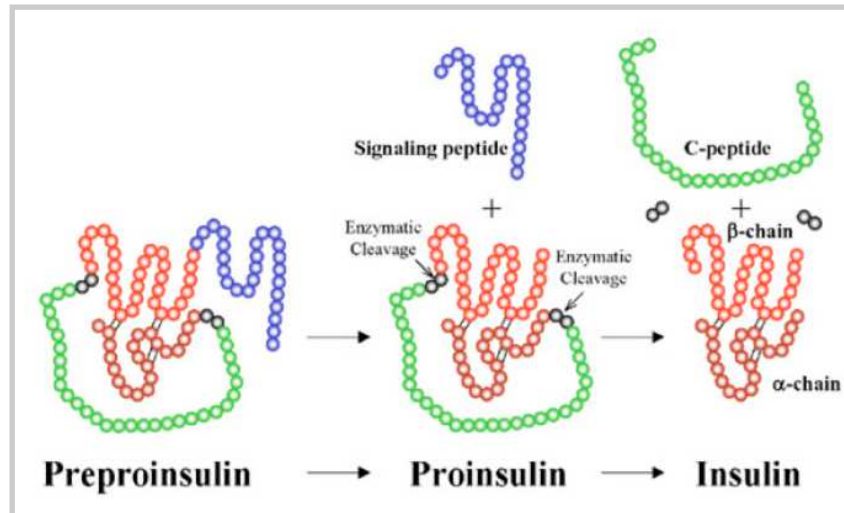


Figura 2. Síntesis de Insulina

2.7. Glucagón.

La regulación de la secreción de insulina al igual que la secreción de glucagón esta directamente determinada por la concentración de glucosa en la sangre.

El glucagón de los mamíferos es un polipéptido de cadena sencilla de 29 aminoácidos el cual se relaciona estructuralmente por su similitud a la secretina, al péptido gástrico inhibitorio y al péptido intestinal vasoactivo. El glucagón se deriva de un gran precursor (prehormona) que después de un gran número de modificaciones postranslacionales produce la hormona definitiva.

La principal actividad fisiológica del producto de las células α es aumentar la concentración de azúcar en la sangre, en esencia lo opuesto a la insulina. El glucagón logra esto por medio de la aceleración de la conversión de glucógeno en el hígado hacia glucosa (*glucogenolisis*) y de la conversión en el hígado de aminoácidos, glicerol y ácido láctico.

El hígado entonces libera la glucosa hacia la sangre aumentando las concentraciones de glucosa sanguínea. La secreción del glucagón, esta directamente controlada por las

concentraciones de glucosa en la sangre por medio de un sistema de retroalimentación negativa. Cuando las concentraciones de glucosa en la sangre disminuyen por debajo de los valores normales los elementos sensibles químicamente en las células α de los islotes estimulan a la célula para que secreten glucagón. Cuando la glucosa de la sangre aumenta, las células ya no se estimulan y se suspende la producción.

2.8. Somatostatina.

Las células δ de los islotes de Langerhans secretan la hormona somatostatina, polipéptido de sólo 14 aminoácidos que tiene una semidesintegración biológica muy breve en la sangre de dos minutos.

Los factores relacionados con la ingestión de alimentos estimulan la secreción de somatostatina; entre ellos están: 1) aumento de la concentración sanguínea de glucosa; 2) incremento de los aminoácidos en sangre, 3) aumento de los ácidos grasos en sangre, y 4) mayor concentración de varias de las hormonas intestinales.

El principal efecto inhibitorio de la somatostatina es deprimir la secreción de insulina y glucagón por su acción local en los islotes de Langerhans.

2.9. Morfogénesis del páncreas.

Los tres linajes celulares (exocrino, endocrino y ductal) que forman el páncreas adulto proceden de un grupo común de células precursoras de origen endodérmico. El endodermo tiene dos regiones, el endodermo ventral del que se originan la glándula tiroidea, pulmones, hígado y a la región ventral del páncreas y el endodermo dorsal da origen al intestino y a la región dorsal del páncreas. (Bonner; 2000)

La formación del páncreas se inicia de manera temprana durante el desarrollo embrionario. En el ratón, la primera indicación visual de morfogénesis pancreática se da

entre el día embrionario 9 (e9) y 9.5 (e9.5), cuando dos rudimentos, uno dorsal primero y otro ventral después, se hacen visibles en la zona del endodermo del intestino primitivo que dará lugar al duodeno. Hacia el día 10.5 se inicia el crecimiento y ramificación del epitelio de los dos primordios pancreáticos, los cuales entre e13 y e14 sufren una reorientación y se fusionan en un único órgano bipolar.

La diferenciación endocrina es aparente desde las etapas más iniciales del desarrollo pancreático. Entre e9.5 y e12.5 la mayoría de células formadas son positivas para glucagón. A partir de e12.5 se produce la diferenciación exponencial de células endocrinas, en su mayoría células β , a partir de precursores (neogénesis) en la etapa conocida como transición secundaria. Hacia el día e16 las células endocrinas empiezan a agruparse, pero no es hasta poco antes de nacer (e18-e19) que los islotes están plenamente formados. La maduración final del islote se da durante las primeras semanas después del nacimiento. El páncreas exocrino empieza a diferenciarse hacia el día e14.5 y en el día e15.5 los acinos ya son claramente distinguibles de los ductos. Por el contrario, se conoce muy poco sobre la diferenciación de las células ductales, a excepción de que la mayoría de precursores ductales se distinguen de los progenitores de los linajes endocrino/exocrino antes de e12.5 (figura 3). (Brennand; 2007)

En humanos, los primordios pancreáticos son evidentes en la semana 4 de gestación y su fusión se produce al final de la semana 6. En la semana 10 ya están presentes células endocrinas positivas para las cuatro hormonas insulares. Cabe destacar que existen pocos estudios moleculares sobre organogénesis pancreática en humanos y los modelos vigentes y descritos a continuación se basan mayoritariamente en información obtenida en ratón y pollo.

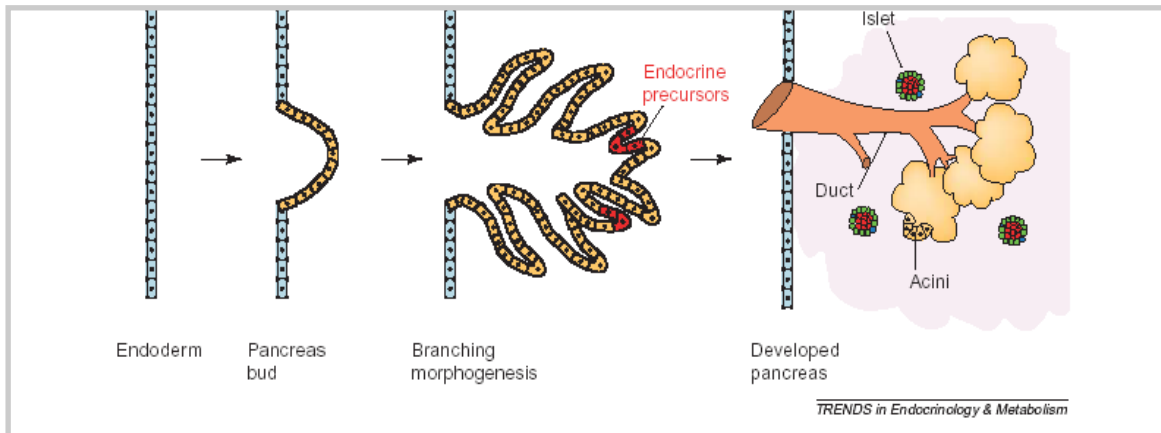


Figura 3. Etapas tempranas en el desarrollo del páncreas dorsal en roedores. El endodermo muestra gemaciones solo en su parte dorsal, las cuales experimentan morfogénesis para formar ductos y acinos, los precursores celulares migran bajo la influencia de varios factores de crecimiento y diferenciación y forman agrupaciones (islotas) que producen hormonas. Imagen obtenida de (Anandwardhan, 2004).

2.10. Control transcripcional del desarrollo pancreático endocrino.

Desde un punto de vista molecular, la expansión y diferenciación de los precursores endodérmicos hacia los distintos linajes pancreáticos son el resultado de una secuencia altamente regulada de señales extracelulares y de cambios en programas de expresión génica. Dichos cambios son dirigidos por una cascada de factores de transcripción cuyas activaciones-inactivaciones coordinadas permiten la progresión del precursor pluripotente a la célula pancreática diferenciada (figura 4). Muchos de los factores actúan en más de un momento del desarrollo y con funciones marcadamente distintas en cada uno de dichos momentos.

En muchos casos, proteínas ya conocidas debido a su papel en el mantenimiento del fenotipo de la célula endocrina diferenciada han resultado ser cruciales para el desarrollo de este mismo tipo celular durante la embriogénesis. Por ejemplo, factores reguladores del gen de la insulina como Pdx-1 o NeuroD/BETA2 son clave para el desarrollo endocrino y/o pancreático.

Los genes involucrados en la diferenciación endocrina y función de los islotes se describen a continuación:

Los factores Pdx-1 y H1xb9 se expresan en el endodermo prepancreático antes de que se inicie la formación de los primordios. En ausencia de H1xb9 no se forma el primordio dorsal pero sí el ventral. En cambio, en ausencia de Pdx-1 se inicia la formación de ambos primordios pero su crecimiento y morfogénesis queda interrumpida en las etapas más tempranas del desarrollo, tanto en ratones como en humanos. (Jensen; 2004)

La importancia de Pdx-1 en el desarrollo pancreático ha sido confirmada en estudios recientes de linaje celular que han demostrado que todas las células pancreáticas derivan de células positivas para Pdx-1. La expresión de Pdx-1 y H1xb9 decae después de e10.5 pero vuelve a reaparecer en las células β ya diferenciadas pues Pdx-1 es factor clave en la expresión génica de insulina. (Offield y col, 1996)

La especificación del linaje endocrino en precursores pancreáticos viene determinada por la expresión de los factores de transcripción pro-endocrinos. Esta terminología hace referencia a (1) el requerimiento de estos factores para iniciar la cascada de diferenciación endocrina y (2) su capacidad para inducir diferenciación endocrina en contextos adecuados. Neurogenina3 (Ngn3) es el factor pro-endocrino clave en el páncreas ya que su expresión marca una temprana diferenciación endocrina y es detectado como marca en los progenitores que producen aumento de todas las células de un islote adulto (Anandwardhan, 2004). Así que Ngn3 actúa a modo de interruptor de la cascada transcripcional que culmina en la formación de las células endocrinas del islote. No obstante, su expresión es transitoria y después de alcanzar un punto máximo alrededor de e15.5 decae hasta niveles indetectables en el páncreas neonato. Por lo tanto, otros factores, activados directa o indirectamente por Ngn3, deben continuar y finalizar

el proceso de diferenciación endocrina iniciado por Ngn3. Uno de estos factores es NeuroD/BETA2. NeuroD1/BETA2 es una diana directa de Ngn3 y comparte con su activador la capacidad de promover el destino endocrino en ambientes permisivos. A parte de NeuroD1/BETA2, otros factores regulados directamente por Ngn3 y de demostrada relevancia en la formación de las células endocrinas del islote son Pax4, Nkx2.2 e IA-1. (Wilson; 2003)

La identificación de células que coexpresan insulina y glucagón en las etapas tempranas del desarrollo pancreático sugirió la existencia de células progenitoras bipotenciales para los linajes alfa/beta. No obstante, esta idea fue desestimada tras demostrarse que las células beta maduras derivan de células que nunca expresaron glucagón, y viceversa.

El conjunto de datos disponibles hasta el momento sugiere que la decisión sobre el subtipo endocrino se toma en etapas iniciales del proceso de diferenciación y antes de la expresión de hormonas. El modelo vigente establece que la acción concertada de distintos factores de transcripción, que funcionan en paralelo con Ngn3 o por debajo de la misma, es la responsable de determinación de linaje endocrino específico. Así, Pax4 y Arx son necesarios para la especificación de los linajes beta y alfa, respectivamente. La ausencia simultánea de los dos factores resulta en la pérdida total de células beta y alfa y en el aumento de células delta. (Kim; 2002)

También los factores Nkx2.2 y Nkx6.1 juegan un papel relevante en la determinación del linaje β . Animales genoanulados para Nkx2.2 no tienen células positivas para insulina pero sin embargo tienen células endocrinas con otros marcadores de células beta y expresan la hormona grelina. La ausencia de Nkx6.1, por su parte, es la causa de que no se produzca neogénesis de células beta durante la transición secundaria.

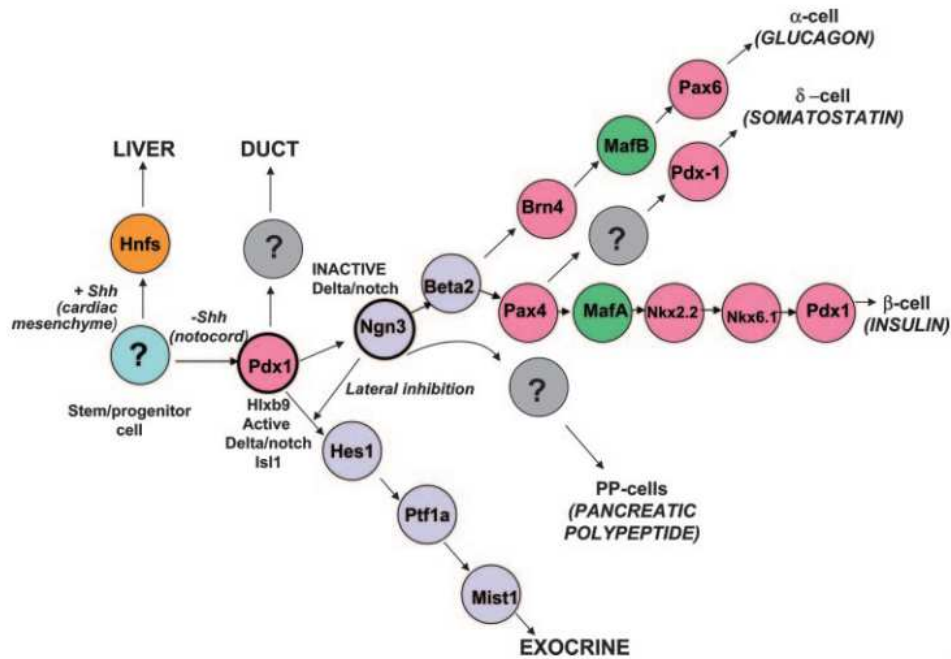


Figura 4. Cascada de factores de transcripción propuesta por Barbera A. y Gasa R., 2008.

2.11. Señalización y desarrollo pancreático.

La formación del páncreas requiere una serie de señales inductivas, unas iniciales y otras secundarias, procedentes de tejidos vecinos que dirijan su diferenciación.

Para la correcta formación del páncreas son necesarias señales enviadas por tejidos mesodérmicos situados cerca del endodermo prepancreático. El notocordio envía señales que reprimen la expresión de Sonic Hedgehog (Shh) en el endodermo prepancreático dorsal, lo que constituye un prerrequisito para promover la expresión de Pdx-1 en esta región y para el consiguiente desarrollo del páncreas (Li y col, 1999; Hadjantonakis; Papaioannou, 2001). La activina- β B, perteneciente a la familia de TGF-beta (factor de crecimiento transformante beta) y el FGF2 (factor de crecimiento de fibroblastos 2) son dos de las moléculas secretadas por el notocordio y mediadoras de dicho efecto. La especificación del páncreas ventral ocurre de manera independiente. Pdx-1 se expresa en el endodermo ventral y las señales procedentes del mesodermo

cardíaco y del septum transversum no son necesarias para inducir la expresión de este factor en la región prepancreática sino para inhibir su expresión en la región prehepática. El mismo FGF2 o BMP4 (proteína morfogénica ósea 4), otro miembro de la familia TGF-beta, son dos de las moléculas encargadas de inhibir la expresión de Pdx-1 en la región prehepática permitiendo así el desarrollo del hígado (figura 5). (Cleaver O.; Melton D., 2003)

Por lo tanto, los mismos morfógenos se encargarían de la inducción del páncreas dorsal y ventral pero con estrategias esencialmente opuestas.

La interacción con vasos sanguíneos es también crítica para la diferenciación del páncreas. Estudios in Vitro han demostrado que señales procedentes del endotelio de la aorta son necesarias para inducir la expresión de Pdx-1 e insulina en el endodermo prepancreático dorsal. Las moléculas mediadoras de dicho efecto incluyen miembros de la familia FGF. Una vez iniciada la formación de los primordios, la proliferación y morfogénesis del epitelio pancreático depende de señales procedentes del mesénquima circundante. Se postula que estas señales son determinantes para establecer la proporción de tejido exocrino versus endocrino del páncreas.

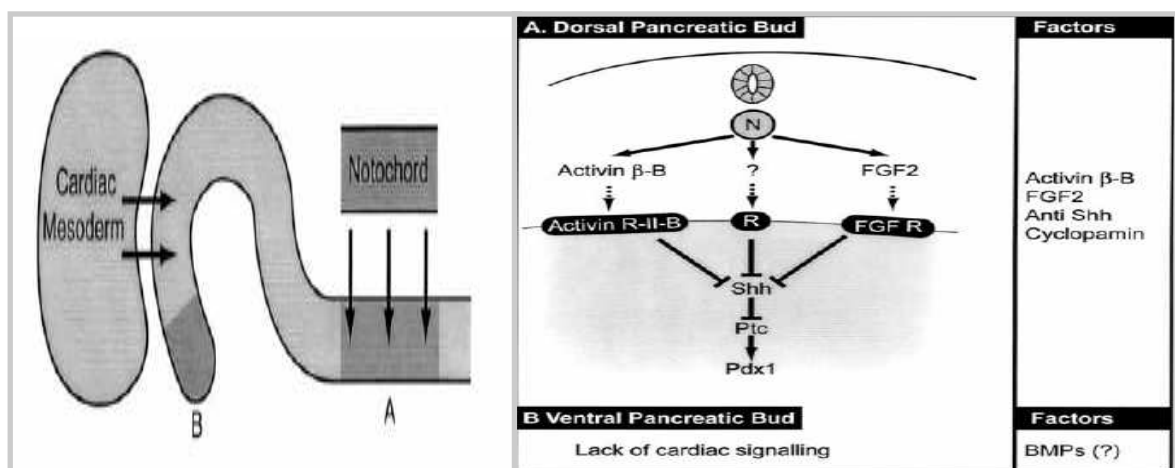


Figura 5. Señales tempranas en el desarrollo pancreático. Imagen obtenida de Soria B., 2001.

2.12. Silimarina

La Silimarina es una mezcla de sustancias extraídas del cardo mariano, *Silybum marianum*, que es una planta medicinal, la cual ha sido ampliamente usada en la medicina tradicional europea por más de 2000 años para el tratamiento de una extensa variedad de desordenes del hígado y vesícula biliar incluidos hepatitis, cirrosis e ictericia, y para proteger al hígado en contra del envenenamiento de químicos y toxinas del ambiente, incluyendo mordidas de serpientes, escozor provocado por picaduras de insectos, envenenamiento por hongos, y alcohol. (Gazák R., 2007; Morazzoni, P., 1995)

Hoy en día el flavonoide Silimarina se obtiene purificando el extracto de los frutos de *Silybum marianum*, y su principal constituyente activo, la Silibina, es empleada en el tratamiento de enfermedades hepáticas. *Silybum marianum* pertenece a la familia *Astraceae* es una planta herbácea anual o bienal, nativa del área del mediterráneo.

Los frutos de *S. marianum* contienen Silimarina, una mezcla de flavonolignanos (1.5-3.0 %), y otros componentes como tiramida, histamina, aceites esenciales, lípidos (20-30 %), azúcares, alcaloides, saponinas, mucilagos, ácidos orgánicos, vitamina C, E y K y flavonoides como quercetina, taxifolina, dehidrokaemferol (Morazzoni, 1994). Los principales constituyentes activos se dividen en cuatro especies moleculares distintas, que son: silibina, isosilibina, silicristina y silidianina (figura 6). (Pascual, 1993)

Muchos de los hallazgos clínicos se resumen por el término de “incremento en la regeneración hepática”, se ha observado que después de que el hígado sufre daño tóxico, la administración de Silimarina produce una normalización acelerada significativa en los valores de transaminasa glutamato-oxacetato y transaminasa glutamato-piruvato séricas. (Sonnenbichler, 1999)

La Silibina representa el compuesto más activo de la Silimarina aunque la silidianina y la silicristina presentan actividades cualitativas similares pero son menos potentes. (Valenzuela, 1986)

Recientemente, Silibina/Silimarina ha recibido atención debido a sus actividades benéficas alternativas que no son directamente ligadas a su efecto hepatoprotector y/o antioxidante. Estos incluyen en su mayor parte acciones anticáncer y quimiopreventivas, además de actividades hipocolesterolemicas, cardioprotección, neuroactivo y neuroprotector. Además, la extensión de sus aplicaciones ha sido ampliada a otros órganos como los del sistema gastrointestinal, ejemplo en el tratamiento de problemas del páncreas y el equilibrio de la glicemia. (Gazák R., 2007)

La fórmula de la silibina está representada por dos estructuras isoméricas, con un grupo hidroxil-2-fenil-cromanon. Se distinguen de otros flavonoides, en particular de los dihidroflavonoides por la condensación con un alcohol coniferílico.

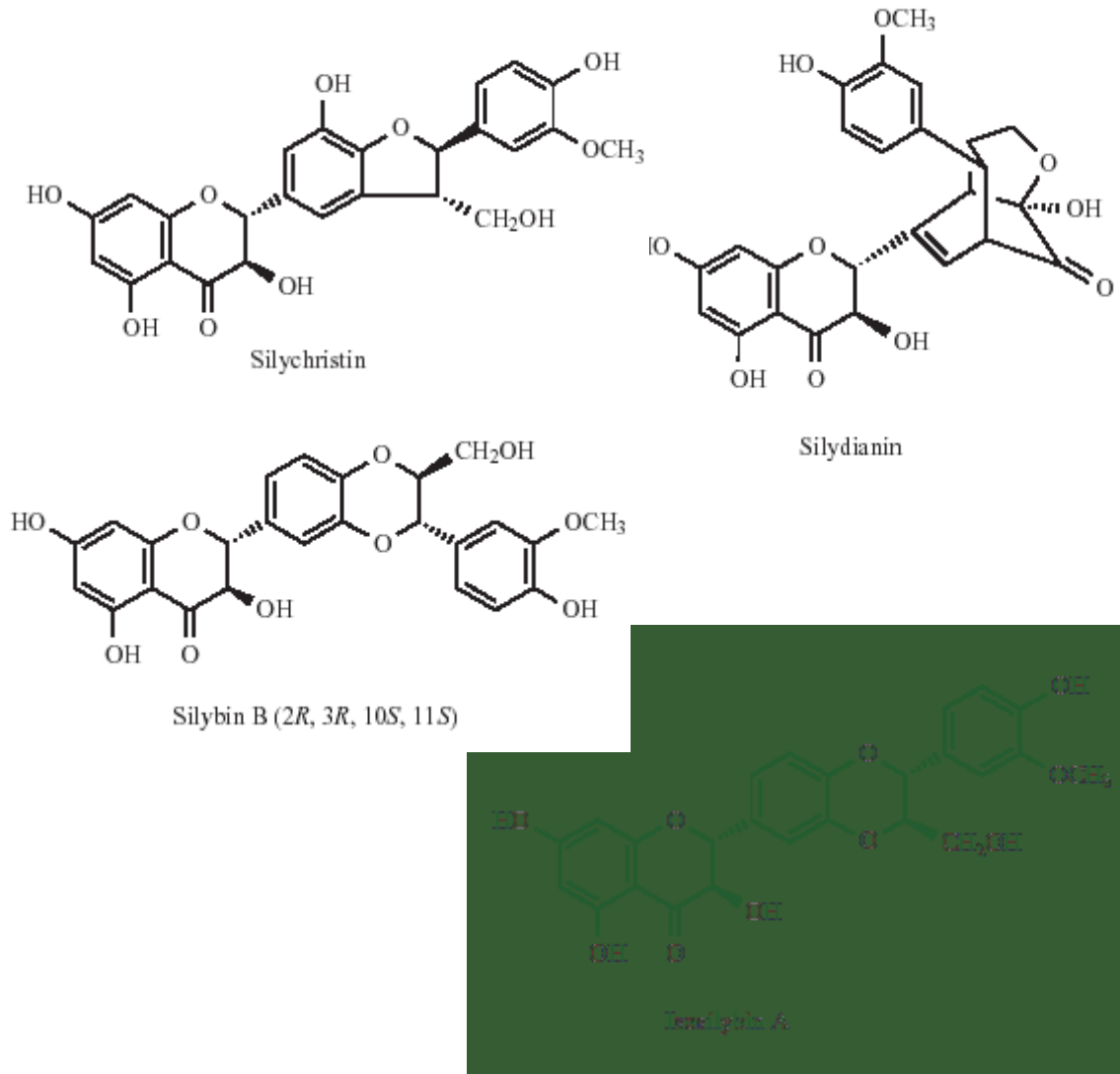


Figura 6. Constituyentes activos de la Silimarina.

2.12.1. Propiedades generales.

La Silimarina protege in vivo a los mastocitos contra la acción degranulante. Por lo mismo la Silibina se comporta como un aminoliberador a diferencia de ciertos flavonoides. Suprime la liberación de serotonina debido a su efecto estabilizador de membranas. Su efecto sobre la liberación de aminas podría explicar su acción parasimpaticomimética.

La Silibina es bien conocida como hepatoprotector y coleretico, también otros problemas gastrointestinales pueden ser tratados y/o prevenidos por esta preparación. En el páncreas la Silibina puede actuar principalmente como quimioprotector y también puede estimular la recuperación después de una intoxicación que provoque daño. (Gazák R., 2007)

Las investigaciones bioquímicas han arrojado que la Silimarina y la Silibina, por su naturaleza fenólica, son considerados como antioxidantes capaces de reaccionar con numerosos radicales libres en sistemas de células libres incluyendo radicales de oxígeno e hidroxilos, formando compuestos más estables y menos reactivos.

En cuanto a la estimulación de la síntesis de proteínas, estudios in vitro en hepatocitos aislados y estudios in vivo en ratas han demostrado que la Silibina es capaz de estimular específicamente a la RNA pol 1 y la síntesis de RNA ribosomal, incrementando la velocidad de la formación de ribosomas, y por la tanto, la síntesis de proteínas. Dado que la síntesis de proteínas y la síntesis de RNA son esenciales para la replicación de DNA, es probable que la Silibina también influencie la síntesis de DNA, como fue demostrado en ratas siguiendo la hepatectomía. (Gazák R., 2007)

2.12.2. Propiedades particulares.

La Silimarina fue usada en ratas que se trataron con Aloxana (Soto y col., 1998 y 2003). La Aloxana causa una necrosis severa de células pancreáticas, con la subsiguiente pérdida de secreción de insulina. Por esta razón ha sido usada en su mayoría para inducir experimentalmente diabetes mellitus y se encontró que la Silimarina fue capaz de prevenir un aumento en la glucosa plasmática y en la peroxidación del lípido pancreático en ratas hiperglucémicas (Soto y col., 1998). Entonces, se sugirió que el efecto protector podría ser atribuido debido a sus propiedades antioxidantes o por

incrementar la concentración del glutatión en el páncreas y en el plasma, o ambos. La Silimarina también estimula la actividad pancreática provocando un aumento de enzimas antioxidantes capaces de inactivar a los radicales libres (Soto y col., 2003).

La Silimarina representa una nueva posibilidad en el tratamiento de la diabetes mellitus, no solo por el aumento en los niveles de insulina sino también en la recuperación de la función pancreática (Soto y col., 2004). Sin embargo, se necesitan un número mayor de estudios para comprobar sus propiedades benéficas en la Diabetes Mellitus humana.

2.12.3. Ensayos de toxicidad.

Se investigó la agudeza de la toxicidad de la Silimarina y la Silibina por vía oral e intravenosa en varias especies animales. Los valores de DL_{50} para la Silibina por vía intravenosa en ratones y ratas (hembras y machos) fue de 1.01 g/Kg y de 873 mg/Kg respectivamente. Los valores de DL_{50} en conejos fueron de cerca de 300 mg/Kg por vía intravenosa. Los estudios de toxicidad media con Silimarina en ratas no revelaron efecto adverso alguno a dosis de 1 g/Kg diarios por 15 días por vía oral.

Los mismos resultados se obtuvieron en pruebas a largo plazo para estas sustancias administradas por vía oral (100 mg/Kg/día) a ratas por un período de 16-22 semanas. La Silimarina no mostró evidencia alguna de efectos embriotoxicos en ratas y conejos. (Morazzoni, 1995)

2.12.4. Aspectos farmacocinéticos.

La Silibina y los otros constituyentes de la Silimaria son conjugados rápidamente en el hígado con sulfatos y ácido glucorónico. Los conjugados pasan al plasma y a la bilis con una recuperación mayor al 80 % de la dosis administrada por vía intravenosa. Esto nos señala la existencia de un ciclo enterohepático: Absorción intestinal, conjugación

hepática, excreción por la bilis, recaptación por el intestino, hidrólisis por la flora intestinal y se repite el ciclo enterohepático. (Lecompte, 1975)

3. IMPORTANCIA DEL MODELO DE ESTUDIO.

Muchos modelos han sido estudiados como modelos de diabetes un ejemplo interesante es la pancreatectomía al 90 % en páncreas de roedores para examinar la regeneración pancreática, el cual tiene un enorme potencial para regenerar células β pues una resección quirúrgica es traducida como un estímulo regenerativo que induce al precursor pancreático celular a experimentar una fase de proliferación y diferenciación que conduce a la restauración del órgano perdido. (Anandwardhan, 2004 y Risbud, 2002)

La remarcable capacidad para reparar y regenerar tejido dañado por el páncreas es otorgada gracias a que las células- β pancreáticas son capaces de cambiar bruscamente aun en condiciones normales manteniendo su número total por el balance de las células perdidas y la proliferación de estas. Este daño directo al páncreas incrementa la demanda de insulina, comparable a lo ocurrido en el embarazo y en la obesidad, por lo que un mecanismo compensatorio entra en operación para promover la proliferación o la hipertrofia de células- β .

Este proceso de regeneración pancreática es similar al desarrollo embrionario del páncreas endocrino, pues en ambos procesos, precursores multipotentes celulares proliferan y se diferencian para conducir al reestablecimiento de células- β pancreáticas; ambos fenómenos controlados y dirigidos por varios factores de transcripción.

A continuación se resume la importancia del factor de transcripción Pdx-1, que se encuentra entre los genes involucrados en la diferenciación endocrina y participa en la función de los islotes.

Como se mencionó anteriormente, Pdx-1, el cual es expresado en el páncreas endocrino intacto, está limitado en células β de islotes maduros. Mutaciones Pdx-1 en humanos y ratones demostraron que la pérdida de una copia funcional de Pdx-1 causa defectos en los islotes, extendiéndose el daño desde la pobre o nula regulación de glucosa hasta ocasionar diabetes dependiente de insulina.

Pdx-1 regula la expresión de muchos genes en los islotes, incluyendo aquellos que codifican para la producción de insulina, GLUT 2 y glucoquinasa enzima integral en la función de las células β (Ahlgren, 1998), y un 50 % en la reducción del gen Pdx-1 reduce enormemente la capacidad de las células beta en el islote para regular la glucosa sanguínea. Un mecanismo por el cual el factor Pdx-1 afecta a la transcripción génica en las células β es por la regulación directa de la transcripción en estas, debido a que actúa solo o en conjunto con otros factores de transcripción. (Ohneda 2000)

La pérdida de la funcionalidad pancreática desde un punto de vista endocrino y exocrino tiene lugar en ambos tipos de diabetes (1 y 2) por el deterioro en la masa de células β , así como en el daño directo provocado al páncreas después de una pancreatectomía y este último al ser utilizado como modelo experimental de carácter no patológico nos permite estudiar la regeneración de las células β pancreáticas.

4. OBJETIVOS.

4.1. Planteamiento del problema.

En la actualidad se sabe que la pérdida de masa, función y número de células- β pancreáticas es un punto determinante en el desarrollo de la mayoría de diabetes, que actualmente es controlada a través de múltiples inyecciones de insulina o por agentes orales hipoglicemiantes, pero el control glicémico ideal no ha sido logrado en su perfección por estos tratamientos convencionales (Satoko, 2005). Por lo tanto, cualquier aproximación terapéutica a la cura de esta enfermedad debe afrontar la necesidad de reemplazar o evitar esta disminución de células- β e incluso acelerar la proliferación, diferenciación y supervivencia de células- β in vivo. Para conseguir este objetivo se pueden utilizar diferentes estrategias, por un lado se pueden administrar compuestos como la Silimarina, que ha demostrado producir un aumento en la síntesis de RNA ribosomal y transcripcional, así como un aumento en la velocidad en la síntesis de proteínas estructurales y funcionales. (Wellington K.; 2001)

4.2. Objetivo General:

- En un modelo de ratas pancreatectomizadas al 90% estudiar el efecto de Silimarina sobre la expresión del factor de transcripción Pdx-1 en la regeneración de células β - pancreáticas productoras de insulina.

4.3. Objetivos Específicos:

- Estudiar el efecto de Silimarina en la expresión de Pdx-1 como factor de transcripción necesario para la expresión de células- β , utilizando un modelo de pancreatectomía parcial en la rata.

- Estudiar el efecto de la Silimarina sobre los niveles sanguíneos de glucosa utilizando un modelo de pancreatoclectomía parcial al 90 % en la rata.

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

Se emplearon 39 ratas macho de la especie Wistar con un peso entre 180 y 250 g proporcionadas por UPEAL- Bioterio de la UAM-X,

Se formó un grupo control de tres ratas, con acceso libre de agua y alimento.

Y se formaron 12 grupos experimentales integrados de 3 ratas cada uno, a los cuales al inicio del tratamiento se les realizó la extracción del 90 % de tejido pancreático a través de la técnica de frotamiento suave del órgano, fueron identificados y tratados de la siguiente manera:

- Seis grupos tratados con una dosis de Silimarina 200 mg/Kg vía oral cada 24 horas con acceso libre a alimento y agua por periodos de 3, 7, 14, 21, 42 y 63 días, se le dio seguimiento a sus niveles séricos de glucosa y peso semanalmente.
- Seis grupos no tratados, se les administro alimento y agua por periodos de 3, 7, 14, 21, 42 y 63 días, se les dio seguimiento a sus niveles séricos de glucosa y peso semanalmente.

El tiempo establecido para el sacrificio de los animales fue el último día de cada periodo de tratamiento.

5.1. Metodología.

5.1.1. Obtención de muestras.

Una vez concluidos los tiempos establecidos para el sacrificio de cada grupo se procedió a realizar lo siguiente:

1. Se les administro una dosis única de 63 mg/ 2.5 Kg de peso corporal de pentobarbital sódico para la obtención de las muestras.
2. A través de punción cardíaca se extrajo su sangre depositándola en tubos de ensaye, fue centrifugada a 1200rpm/10 min (Equipo SOL-BAT C-600) para la obtención de suero, cada muestra fue almacenada en microtubos de 0.6 mL a una temperatura de -70°C.
3. Con ayuda de material quirúrgico se le realizó una disección en la cavidad abdominal para la extracción del páncreas.
4. Se homogeneizó una porción del tejido pancreático total de cada animal con un homogenizador Ultraturax, IKA (Germany) a 25 000 rpm en solución amortiguadora de lisis PROMEGA. La porción restante se conservo en una solución de PFA pH 7.0.
5. La extracción de RNA se realizó mediante el método de columna, según lo indica el fabricante PROMEGA (Madison, WI, USA):

Las muestras se mantuvieron a -72°C hasta su uso para posteriores determinaciones.

5.1.2. Cuantificación del RNA.

1. Se hizo una dilución 1:100 de RNA en agua DEPC (Dietilpirocarbonato).
2. Se determinó la concentración de RNA extraído mediante la lectura en el espectrofotómetro a 260 nm utilizando la siguiente formula:

$O.D = (Abs_{260nm}) (40 \mu g/\mu l) (\text{factor de diluci3n})$

5.1.3. Determinaci3n de la integridad del RNA.

1. Con el fin de evaluar la integridad del RNA extraído se le practic3 una electroforesis horizontal en agarosa y se le agreg3 bromuro de etidio para su tinci3n.
2. El RNA extraído se tratara con 10 μl de soluci3n desnaturalizante por cada 4 μg de RNA disuelto en agua DEPC. Calentar a 65°C durante 15 min.
3. Para la electroforesis se prepar3 un gel desnaturalizante al 1% de agarosa el cual contiene: MOPS (4-ácidomorfolinproponsulf3nico) 12X y formaldehído 37%.

La soluci3n desnaturalizante contiene: formamida, MOPS 12X, formaldehído 37% y agua DEPC.

5.1.4. Determinaci3n semicuantitativa del factor de transcripci3n Pdx-1 en la diferenciaci3n de las c3lulas β .

RT-PCR.

La RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction), permite la amplificaci3n de una cantidad pequeña de mol3culas diana de RNA (tanto mRNA como RNA total) con gran especificidad, mediante la transcripci3n inversa del RNA a cDNA, que es posteriormente amplificado por la t3cnica de PCR.

Determinaci3n:

1. En primer lugar se utilizo el kit de M-MLV Reverse Transcriptase PROMEGA para convertir RNA total a cDNA, siguiendo las especificaciones del fabricante para obtener 25 μl de producto final.

Las condiciones para programar el termociclador fueron las siguientes:

- 1 ciclo de 1 hora, a 37°C para promover la activación de la enzima transcriptasa inversa.
 - 3 o 5 minutos son destinados para lograr el paro de la reacción a 4°C (temperatura programada en el termociclador)
2. La amplificación del DNA por la técnica de PCR, se llevo a acabo siguiendo las especificaciones del fabricante, contenidas en el kit Go Taq DNA Polymerase PROMEGA, para obtener 25 µl de producto final.

Los oligonucleotidos utilizados fueron:

Secuencia del factor Pdx-1:

5' a 3' ggcttaacctaaacgccaca L

5' a 3' gggaccgctcaagtttgtaa R

Tamaño de fragmento esperado 247 pares de bases.

Las condiciones para la expresión del gen de Pdx-1 fueron:

Condiciones para la expresión de Pdx-1		
Descripción	Temperatura (°C)	Tiempo
Activación de la DNA polimerasa	95	30 min.
Desnaturalización del DNA	95	30 seg.
Alineación de los oligonucleótidos	60	30 seg.
Elongación de las cadenas de DNA	72	30 seg
Elongación final de las cadenas de DNA	72	5 min.
Paro de la reacción	4	3 – 4 min.

3. Al material amplificado se le practicó una electroforesis horizontal en agarosa y se le agregó bromuro de etidio para su tinción. Para la precisa cuantificación y/o

localización de los pares de bases del material amplificado fue cargado 0.5 μg de marcador de PM de 100 pb marca Biolabs.

4. Se captó la imagen del gel mediante una fotografía, con el programa Kodak EDAS 290 y de cada banda se obtuvo su densitometría (medida cuantitativa en pixeles).

5.1.5. Determinación bioquímica de glucosa en suero por el método Baner.

La determinación de glucosa se llevó a cabo utilizando el método de la ortotoluidina, la cual es una amina aromática primaria que en ácido acético reacciona con las aldohexosas para formar una mezcla en equilibrio de glicosamina y la correspondiente base de Schiff para formar un complejo verde azulado, estable de intensidad proporcional a su concentración, su absorción máxima es a los 620 nm.

Reactivos

Orto-toluidina preparada:

Tiourea 1.5 g

Orto-toluidina 50 ml

Ácido acético glacial 940 ml

Determinación:

1. Se tomaron 50 μl de suero, se le adicionaron 3ml de Orto-toluidina y se agito.
2. Se incubaron los tubos a baño maría a ebullición durante 10 minutos.
3. Se incubaron los tubos a baño frío durante 10 minutos.
4. Se agitaron y leyeron a 620 nm

Curva estándar:

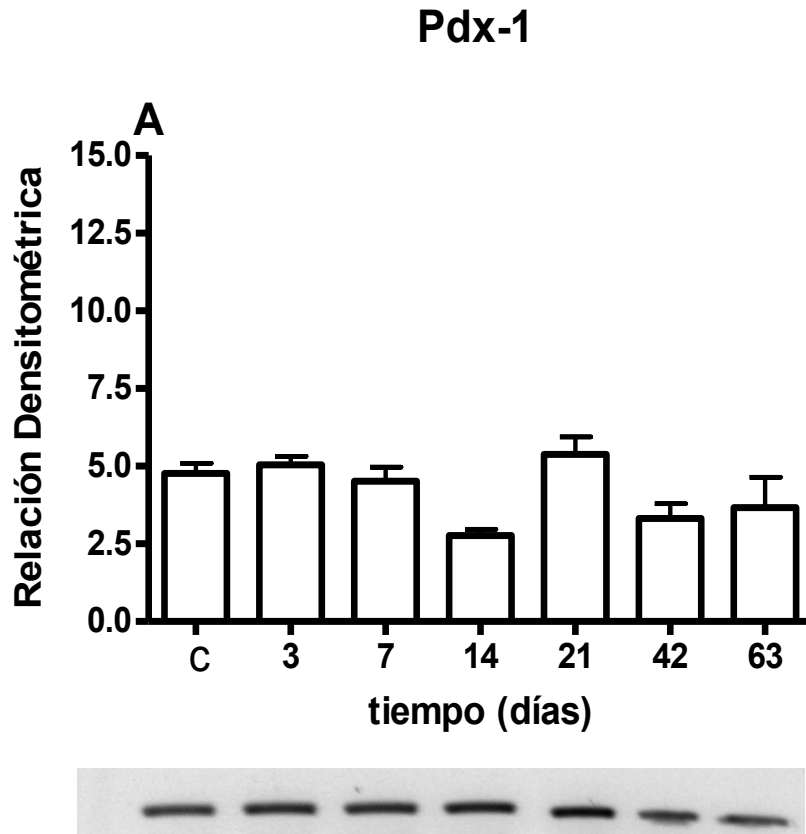
Se preparó una solución de glucosa (10 mg/ml), tomándose 1, 2, 3 y 4 ml, llevándose a un volumen de 10 ml con agua bidestilada, obteniendo así diferentes concentraciones (100 mg de glucosa / 100 ml, etc.) de éstas soluciones se tomaron 50 µl por duplicado y se siguió el mismo tratamiento que las muestras.

5.1.6. Métodos estadísticos

Para comparar los valores de los grupos experimentales en los diferentes periodos con los grupos control en los correspondientes periodos se utilizo la prueba de la t de student.

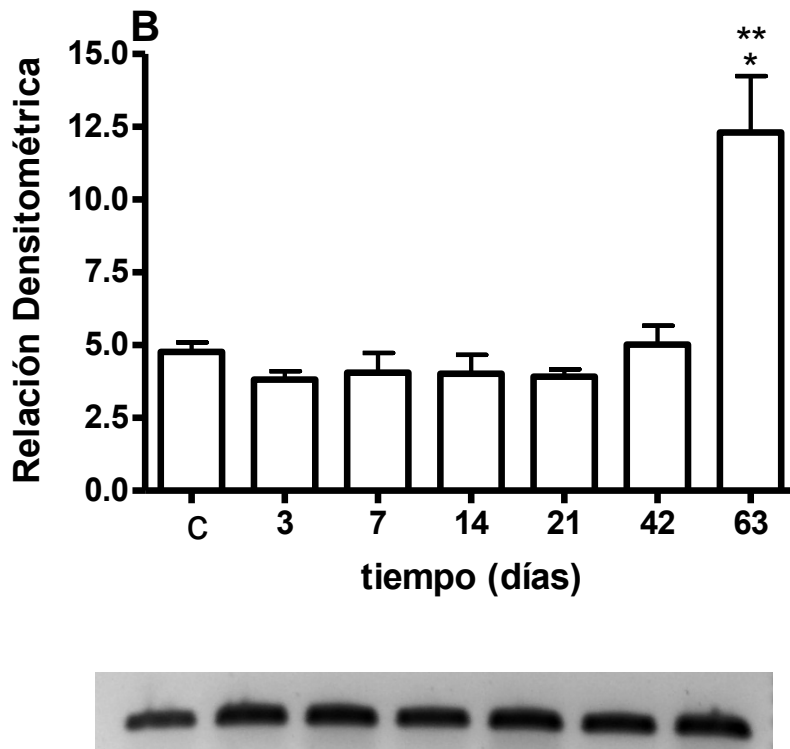
6. RESULTADOS

EFECTO DE LA SILIMARINA SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN Pdx-1



Gráfica 1 Expresión génica del factor de transcripción Pdx-1, en animales control pancreatetectomizados al 90 %, observado durante el tiempo de experimentación. C representa al grupo control de ratas normales. Cada barra representa el valor medio \pm el EEM, n=3. En la parte inferior se observan las bandas representativas correspondientes a cada tratamiento.

Pdx1



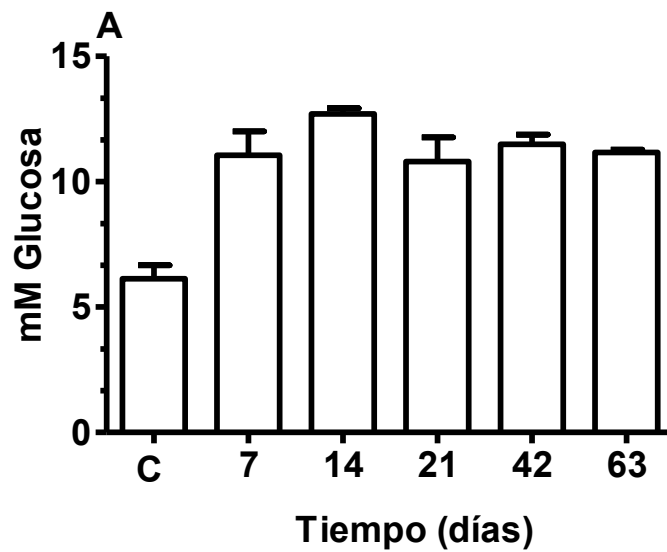
Gráfica 1 Expresión génica del factor de transcripción Pdx-1, en animales pancreatetectomizados al 90 % tratados con Silimarina, observado durante el tiempo de experimentación.

* $p \leq 0.001$ entre animales tratados con silimarina y grupo control de ratas.

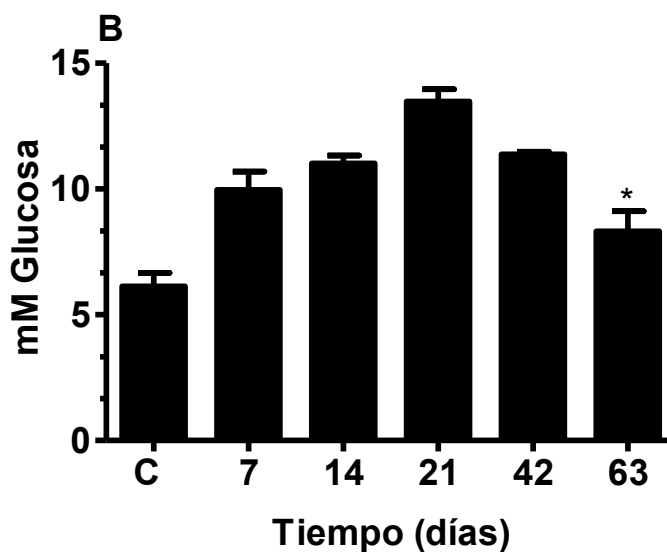
** $p \leq 0.001$ entre el grupo tratado y el no tratado.

En la parte inferior se observan las bandas representativas correspondientes a cada tratamiento.

EFFECTO DE LA SILIMARINA SOBRE LOS NIVELES SANGUINEOS DE GLUCOSA.



Gráfica 3 Niveles sanguíneos de glucosa, en animales control pancreatometizados al 90 %, observada en los diferentes grupos experimentales. C representa al grupo control de ratas normales. Cada barra representa el valor medio \pm el EEM, n=3.



Gráfica 4 Niveles sanguíneos de glucosa, en animales pancreatometizados al 90 % tratados con Silimarina, observada en los diferentes grupos experimentales. C representa al grupo control de ratas normales. * $p \leq 0.001$ entre animales tratados con Silimarina y el grupo control pancreatometizado. Cada barra representa el valor medio \pm el EEM, n=3.

7. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

7.1. Efecto de la Silimarina sobre la expresión génica del factor de transcripción

Pdx-1.

Se observa en el grupo experimental de ratas pancreatectomizadas tratadas con Silimarina, que esta indujo una expresión génica del factor de transcripción Pdx-1 mayor a los 7, 14, 42 y 63 días, de acuerdo a las siguientes relaciones densitométricas 4.26 ± 0.37 , 3.95 ± 0.71 , 6.62 ± 0.82 , 6.63 ± 1.01 y, comparado a lo observado en el grupo experimental de ratas control pancreatectomizadas que no recibió tratamiento, grupo en el cuál la relación densitométrica más alta se observa únicamente a los 21 días con 5.97 ± 0.66 como valor medio que decae a la novena semana (63 días) a 3.19 ± 0.83 , muy por debajo del dato anterior. Dentro del grupo experimental de ratas tratadas con Silimarina se halla un único valor promedio bajo a la tercera semana (14 días), encontrándose su relación densitométrica en 5.62 ± 0.93 . Entre los grupos experimentales de animales tratados y no tratados a los 7, 14, 42 y 63 días hay una $p \geq 0.053$, que es un resultado marginalmente significativo.

7.2. Efecto de la Silimarina sobre los niveles sanguíneos de glucosa.

Referente a la medición de glucosa plasmática, se observa que en el grupo experimental control de ratas pancreatectomizadas las concentraciones de glucosa sérica no se mantuvieron en niveles cercanos a la concentración media que se presentó en ratas normales, que fue de 6.12 ± 0.53 mM/L muestra de esto es que a los 7, 14, 42 y 63 días la concentración de glucosa en el plasma estuvo por encima de 8.0 mM/L. Aunque es importante señalar que de los tiempos experimentales de 21 días (6.63 ± 0.36) se obtuvieron datos más cercanos al valor normal. El grupo de ratas que fue tratado con Silimarina presentó niveles de glucosa sérica próximos al valor normal como se puede

observar en la gráfica 6, en donde los niveles de glucosa se mantuvieron por debajo de 8.0 mM/L, como se muestra a continuación: 14 días (5.95 ± 0.49), 21 días (6.90 ± 0.46), 42 días (6.94 ± 0.30) y 63 (6.41 ± 0.32) días. Hubo una $p \leq 0.01$ entre los animales tratados con Silimarina con respecto a los animales del grupo control pancreatectomizado.

8. DISCUSIÓN.

El objetivo principal de la presente investigación, fue estudiar el efecto de la Silimarina sobre la expresión génica de insulina y del factor de transcripción Pdx-1 en la regeneración de células β -pancreáticas productoras de insulina en un modelo de diabetes en ratas, conocido como pancreatectomía parcial.

Con los resultados obtenidos en este trabajo, hemos aportado nuevos argumentos al amplio tema de discusión acerca de la regeneración pancreática, sobre la respuesta adaptativa que poseen las células β después de provocarle daño al páncreas.

Entre los modelos experimentales en roedores, que se han utilizado para investigar como ocurre la regeneración pancreática se han observado muchas diferencias, puesto que la neogénesis de las células- β ocurre en numerosos sitios aún en el páncreas adulto (Satoko, 2005). Sin embargo la mayoría de estos modelos que se realizan in vivo, en sus resultados han llegado a coincidir, que el proceso regenerativo por el que atraviesa el páncreas puede darse a través de cuatro mecanismos complejos que están basados en que durante la regeneración existen células primordiales embrionarias y/o células progenitoras que existen dentro del páncreas adulto en los ductos, acinos e islotes : (1) la neogénesis de células β en los residuos de los islotes (por progenitores celulares intraisleticos o por la diferenciación de células δ que expresan somatostatina), (2) proliferación de células ductales y la subsiguiente diferenciación en nuevas células β , en

la que pueden intervenir células progenitoras dentro y/o alrededor del ducto pancreático, (3) la diferenciación desde células acinares o a través de la diferenciación de estas en células que conforman un islote y (4) la replicación y proliferación de células β preexistentes en islotes residuales. (Satoko, 2005)

Los principales reguladores que contribuyen en los procesos anteriores son los factores de transcripción y, entre estos Pdx-1 ha manifestado tener un rol crítico, además por lo mismo es con mucho el que más se evalúa en la mayoría de los modelos animales que involucran mecanismos de regeneración. (Liu y col., 2007)

Los resultados obtenidos en la primera parte de este trabajo coinciden con lo publicado por Holand y col (2005); en cuanto a la importancia que tiene el factor Pdx-1 como regulador en el proceso molecular y celular que conduce al correcto desarrollo y función del páncreas (Ashizawa, 2004; Sharma y col; 1999); puesto que ellos demostraron el papel crítico que juega este factor de transcripción a través de la creación de ratones transgénicos a los cuales se les suprimió la expresión de dicho factor por la administración de un análogo de la tetraciclina, que les permitió observar que estos ratones desarrollaban una hiperglicemia marcada, asociada con una expresión reducida de insulina y del transportador de glucosa, Glut2. Pero cuando cesaban de administrar doxiciclina encontraron que los niveles de glucosa alcanzaron valores normales y después de 14 días la expresión de Pdx-1 e insulina era homogénea. La anterior discusión es prueba suficiente para decir que la expresión génica del factor de transcripción Pdx-1 que se obtuvo en este trabajo es representativa y nos permite sugerir que esta ocurriendo regeneración pancreática originada como un tipo de respuesta adaptativa de las células pancreáticas en la totalidad de los grupos experimentales y cabe destacar que fue mayor en el grupo de animales tratados con Silimarina.

Anteriormente Soto y col. (2004) demostraron que la Silimarina prevenía la diabetes ocasionada por aloxana en ratas, este modelo experimental fue exitoso en sus resultados, en cuanto a que lograron un reestablecimiento satisfactorio del páncreas endocrino tanto a su nivel estructural y funcional al detectar la expresión de mRNA correspondiente a Pdx-1 en mayor cantidad en animales tratados conjuntamente con aloxana-Silimarina. De igual manera los resultados de este trabajo son muy similares, puesto que se logró una mayor expresión de mRNA del factor de transcripción Pdx-1 en el grupo experimental de ratas pancreatectomizadas tratadas con Silimarina atribuible a sus propiedades bioquímicas. (Utrilla, 1996)

De acuerdo a lo anterior, los niveles plasmáticos de glucosa que fueron observados en el grupo experimental de ratas tratadas con Silimarina que estuvieron ligeramente por arriba de los normales exhibidos por el grupo de ratas control, no fueron suficientes para provocar un aumento en la secreción de insulina basal, ya que se considera que una glicemia de 8.4 mMol/L de glucosa puede influir de manera positiva en la expresión genética de proinsulina y como resultado regular la secreción de insulina (Leibiger, 1988); de igual manera Li Y. y col. (2005) encontraron que cuando mantenían incubadas células- β en solución amortiguadora KRB (Krebs-Ringer bicarbonate) que contenía 11 mMol/L de glucosa, hubo una secreción significativa de insulina.

Mientras que el factor de transcripción Pdx-1 parece ser esencial para una respuesta apropiada de las células- β ; es aún más relevante que pese a su expresión aún es dependiente de que no ocurran o se presenten defectos selectivos que afecten directamente a las células- β en su capacidad para secretar insulina (Brissova y col; 2002), resultado de su participación en la expresión de un número significativo de proteínas importantes para la detección o sensibilidad a la glucosa y la secreción de insulina. (Pedersen, 2002; Wang, 2004)

9. OBJETIVOS Y METAS ALCANZADAS.

Se logró de manera exitosa establecer un modelo experimental de carácter no patológico que produce DM, por medio de la realización de un procedimiento quirúrgico denominado pancreatectomía parcial en roedores.

El objetivo propuesto para estudiar el efecto de la continúa administración de Silimarina sobre la expresión del factor de transcripción Pdx-1, fue alcanzado al establecer los parámetros óptimos necesarios para llevar ala práctica algunas de las técnicas más utilizadas en biología molecular conocidas como RT-PCR y PCR.

Finalmente se consiguió estudiar el efecto que tuvo la Silimarina sobre los niveles sanguíneos de glucosa al someter a las muestras obtenidas a técnicas de carácter inmunológico (interacción antígeno-anticuerpo).

10. CONCLUSIONES.

Los resultados logrados en esta investigación muestran que la Silimarina indujo un aumento que produjo este fármaco en la expresión del factor de transcripción Pdx-1 que es indispensable para la expresión del gen de insulina. Dichos resultados se reflejaron en el nivel sanguíneo de glucosa. Lo anterior sugiere que la silimarina induce la regeneración de las células productoras de insulina con la consecuente regulación de los niveles sanguíneos de glucosa.

11. BIBLIOGRAFÍA.

Ahlgren U, Jonsson J, Jonsson L, Simu K, Edlund H: Beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ipf1/Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes Dev* 12:1763–1768, 1998.

Anandwardhan A. Hardikar. Generating new pancreas from old. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* Vol.15, No.5, July 2004.

Ashizawa S, Brunnicardi FC, Wang XP. PDX-1 and the pancreas. *Pancreas* 2004; 28:109.

Brennan K, Huangfu D y Melton D. All beta cells contribute equally to islet growth and maintenance. *Plos Biol* 5:e163, 2007.

Brissova M, Shiota M, Nicholson W, Gannon M, Knobel S, Piston D, Wright C, and Powers AC. Reduction in Transcription factor *pdx-1* impairs normal glucose sensing and insulin secretion by pancreatic islets. *J Biol Chem* 277: 11225–11232, 2002.

Bouwens L y Rooman I. Regulation of pancreatic Beta-Cell Mass. *Physiological Reviews* 85:1255–1270, 2005.

Bonner-Weir S. Life and death of the pancreatic beta cells. *Trends Endocrinol. Metab.* 11:375-378, 2000.

Carpenter; Cecil Medicina interna, 5ª edición, editorial Elsevier ciencia; Madrid España 2006; pp. 356 - 363.

Cooperman A. Surgery and chronic pancreatitis. *Surg Clin North Am* 2001; 81: 431-55.

Cleaver O.; Melton D. Endothelial signalling during development. *Nature Medicine* 9: 661-668, 2003.

Dandoy-Dron, F., Monthieux, E., Jami, J., and Bucchini, D. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19, 4925–4930.

Del Prato S, Wishner WJ, Gromada J y Schluchter BJ. B-cell mass plasticity in type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 6:319-331, 2004.

Etemad B, Whitcomb D. Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new genetic developments. *Gastroenterology* 2001; 120: 682-707.

Emilien. G.; Maloteaux J-M.; Ponchon Michel. Pharmacological Management of Diabetes: Recent Progress and Future Perspective in Daily Drug Treatment. *Pharmacol. Ther.* Vol. 81, No. 1, 37-51, 1999.

Gazák Radek, Daniela Walterováb and Vladimír K. Silybin and Silymarin – New and Emerging Applications in Medicine, *Current Medicinal Chemistry*, Vol. 14, No. 3, 2007.

Guyton., *Tratado de Fisiología Médica.*, 10^a edición., Ed. McGrawHill., México 2001., pp.899, 923.

Hardley M. *Endocrinology.* 4th Ed. Prentice Hall. USA, 1996.

Hadjantonakis, A.K. and Papaioannou, V.E. Stem cell populations in early embryos. *Differentiation* (this issue) 2001.

Harrison, *Principios de Medicina Interna.* 14^a edición., Ed. McGrawHill Interamericana., Vol II., México 1998., 1973-1989.

Holland Andrew M., Góñez L. J., y col. Conditional Expression Demonstrates the Role of the Homeodomain Factor Pdx-1 in Maintenance and Regeneration of β -cells in the Adult pancreas. *J Mol. Med.* 79: 321-328, 2005.

Iype T., Francis J., Garmey J. C., Neshier R., y col. Mechanism of Insulin Gene Regulation by Pncreatic Transcription Factor Pdx-1. *Mol. Cell. Biol.* 18: 78-84, 2005.

Jensen J. Gene regulatory factors in pancreatic development. *Developmental Dynamics* 229: 176-200, 2004.

Karter A. J.; Mayer E. J.; Selby J. V. y cols. Insulin sensivity and abdominal obesity in African-american, hispanic, and non-hispanic white men and women. *Diabetes*, 45:1547-1555, 1996.

Kim SK y MacDonald RG. Signaling and trancriptional control of pancreatic development. *Curr Opin Genet Dev* 12:540-547 2002.

Keith L. Moore., *Anatomía con Orientación Clínica.*, 3ª edición., Ed. Panamericana., Madrid España 1993., pp.197-200.

Leahy, JL, Bumbalo LM, and Chen C. Beta-cell hypersensitivity for glucose precedes loss of glucose-induced insulin secretion in 90% pancreatectomized rats. *Diabetologia* 36: 1238-1244, 1993.

Leibiger, B, Moede T, Schwarz T, Brown GR, Kohler M, Leibiger IB, and Berggren PO. Short-term regulation of insulin gene transcription by glucose. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 9307-9312, 1988.

Lecomete, J. Lesproprietes Pharmacologigues de la Silymarine. *Revue Medicales de Liegl.* 30 (4), 110, 1975.

Li, H., Arber, S., Jessell, T.M. and Edlund, H. Selective agenesis of the dorsal pancreas in mice lacking homeobox gene Hlxb9. *Nat Gen* 23:67–70, 1999.

Liu T., Wang C., Gou S., y col. PDX-1 expression and proliferation of Duch epithelial cells alter partial pancreatectomy in rats. *Hepatobiliarity Pancreat Dis. Int.* 6: 424-429, 2007.

Liu Y. Q; Nevin P. W., Leahy J. L. Cell adaptation in 60% pancreatectomy rats that preserves normoinsulinemia and normoglycemia. *J Clin. Invest.* 101: 1870-1875, 2005.

Li Y., Cao X., Li L., Brunbaker P. L., y col. B- cell Pdx-1 Expression is Essential for the glucoregulatory, proliferative, and Cytoprotective Action of Glucagon-like Peptide-1. *Diabetes*, Vol. 54, 482-491, 2005.

Melloul, D., Marshak, S., and Cerasi, E. (2002) *Diabetologia* **45**, 309–326.

Morazzoni, P.; Bombardelli. *Silybum marianum (carduus mareaus)* E. *Fitoterapia*, 1995, 64, 3.

Ohneda, K., Ee, H., and German, M. (2000) *Semin. Cell Dev. Biol.* **11**, 227–233.

Ohneda K, Mirmira RG, Wang J, Johnson JD, and German MS. The homeodomain of PDX-1 mediates multiple protein-protein interactions in the formation of a transcriptional activation complex on the insulin promoter. *Mol Cell Biol* 20: 900–911, 2000.

Offield, M.F., Jetton, T.L., Labosky, P.A., Ray, M., Stein, R.W., Magnuson, M.A., Hogan, B.L. and Wright, C.V. PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* 122:983–995, 1996.

Pascual, C.; et al. Effect of Silymarin and Silybin in Oxygen radicals. *Drug Develop. Res.* 29,73, 1993.

Patadaquis; Diagnóstica clínico y tratamiento; 40a edición, editorial Manual Moderno; México 2004, pp. 653 - 658.

Postic, C., Shiota, M., Niswender, K. D., Jetton, T. L., Chen, Y., Moates, J. M., Shelton, K. D., Lindner, J., Cherrington, A. D., and Magnuson, M. A. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 305–315.

Pedersen AA, Petersen HV, Videbaek N, Skak K, and Michelsen BK. PDX-1 mediates glucose responsiveness of GAD (67), but not GAD(65), gene transcription in islets of Langerhans. *Biochem Biophys Res Commun* 295: 243–248, 2002.

Risbud MV, Bhonde RR. Models of pancreatic regeneration in diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2002;58:155-165.

Shils; Nutrición en salud y enfermedad, 9a edición, editorial McGrawHill, vol 2, México 1999, pp. 1351 - 1359.

Stein R 2001. In *Handbook of Physiology Section 7: The Endocrine System*, 1st edn, pp 25–47. Eds LS Jefferson & HM Goodman. New York, NY, USA: Oxford University Press.

Stump Escote Nutrición, diagnóstico y tratamiento, 5ª, editorial McGrawHill, México 2005; pp. 363 - 363.

Soto, C.; Perez, B.L.; Favari, L.P.; Reyes, J.L. *Comp. Biochem. Physiol., C: Pharmacol., Toxicol. Endocrinol.*, 1998, C 119, 125.

Soto, C.; Recoba, R.; Barron, H.; Alvarez, C.; Favari, L. *Comp. Biochem. Physiol., C: Pharmacol., Toxicol. Endocrinol.*, 2003, 136, 205.

Soto, C.; Mena, R.; Luna, J.; Cerbon, M.; Larrieta, E.; Vital, P.; Uria, E.; Sanchez, M.; Recoba, R.; Barron, H.; Favari, L.; Larag, A. *Life Sci.*, 2004, 75, 2167.

Soria, B.; In-vitro differentiation of pancreatic B-cells Review. *Differentiation* 68:205-219, 2001.

Satoko Yamada and Itaru Kojima, Regenerative medicine of the pancreatic b cells, *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2005, 12:218–226.

Sharma A, Zangen DH, Reitz P, et al. The homeodomain protein IDX-1 increases after an early burst of proliferation during pancreatic regeneration. *Diabetes* 1999; 48:507.

Sonnenbichler, J.; Scalera, F.; Sonnenbichler. I. Stimulatory Effects of Silibin and Silicristin from the Milk Thistle *Sylibum marianum* on kidney cells. *Journal of Pharmacol. and Experimental Therapeutics*. Vol. 290.No. 3,1375-1383, 1999.

Teruya, M, Takei S, Forrest LE, Grunewald A, Chan EK, and Charles MA. Pancreatic islet function in nondiabetic and diabetic BB rats. *Diabetes* 42: 1310-1317, 1993.

Utrilla M., 1996. Natural products with hepatoprotective action. *Methods Find Experimental Clinical Pharmacology* 18 (Suppl. B) 11 –12.

Valenzuela J. Enfermedades del páncreas. En: Valenzuela J, Rodés J. *Gastroenterología y Hepatología*. Ed. Mediterráneo, Santiago 1996; 423-61.

Wang Z, Fang R, Olds LC, and Sibley E. Transcriptional regulation of the lactase-phlorizin hydrolase promoter by PDX-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287: G555–G561, 2004.

Wilson ME, Scheel D, German MS. Gene expression cascades in pancreatic development. *Mechanisms of Development* 120:65-80, 2003.

Wellington, K. and Harvis, B. Silymarin: A review of its clinical properties in the management of hepatic disorders. *Biodrugs* 15, 465-489, 2005.

Zoltán Berger. Páncreas en Diabetes y Diabetes en Enfermedades Pancreáticas.

Medwave Año 4, No. 8, Edición Septiembre 2004. Derechos Reservados.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

INFORME DE ACTIVIDADES DEL SERVICIO SOCIAL:

“Efecto de la silimarina en la expresión génica del factor de transcripción Pdx-1, en un modelo experimental de pancreatoclectomía al 90%.”

PERTENECIENTE AL PROYECTO GENÉRICO:

Evaluación de Productos Relacionados con la Salud.

Alumno: Angel Gamaliel Chávez Quintero **Matrícula:** 206366707

DIRECCIÓN: Norte 13 No. 186 Depto.206 Colonia Moctezuma 2 sección,
Delegación Venustiano Carranza, C.P. 15530, CDMX

TÉLEFONO: 5574235124

ASESORAS:

LUGAR DE REALIZACIÓN: Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad-Xochimilco

FECHA DE INICIO Y TERMINACIÓN: SEPTIEMBRE 2010
MARZO 2011

2011

12. RESUMEN.

La Diabetes Mellitus afecta a más de 150 millones de personas alrededor del mundo y se espera que este número se duplique para el año 2025. A través del entendimiento de los mecanismos moleculares involucrados en el crecimiento y desarrollo de las células de los islotes, se podrán desarrollar terapias que contribuyan al mejoramiento fisiopatológico de los pacientes que padecen esta enfermedad.

Se han utilizado varios modelos de Diabetes Mellitus experimental en roedores, con el fin de estudiar los procesos involucrados en la regeneración pancreática posterior al daño provocado. Por lo anterior, la pancreatectomía parcial en roedores ha sido usada no solo como un modelo de Diabetes Mellitus sino como un modelo donde se puede estudiar la regeneración tanto del páncreas exocrino como del endocrino puesto que después de una pancreatectomía, varios factores de transcripción implicados en el desarrollo embrionario de este órgano, se encuentran sobre expresados en el proceso de proliferación y diferenciación de un páncreas adulto que ha sido pancreatectomizado. Anteriormente fue demostrado por Soto y col, (2004) que la administración de Silimarina, flavonoide extraído del cardo mariano *Silybum marianum*, representaba una nueva posibilidad en el tratamiento de la Diabetes Mellitus, no solo por el aumento en los niveles de insulina sino también en la recuperación de la función pancreática, ya que la Silimarina incrementa la síntesis de RNA ribosomal y transcripcional, así como produce un aumento en la velocidad en la síntesis de proteínas estructurales y funcionales. Por lo cual en la presente investigación, se estudió el efecto de la Silimarina sobre la expresión génica del factor de transcripción Pdx-1, indispensable

para la expresión de dicha hormona en la regeneración de células β - pancreáticas en un modelo de diabetes en ratas. Fueron determinadas la concentración de glucosa y se evaluó la expresión génica de Pdx-1 por la técnica de RT-PCR utilizando el RNA pancreático total.

Los resultados obtenidos muestran que en el grupo experimental pancreatectomizado sin tratamiento, la expresión génica del factor de transcripción Pdx-1 estuvo disminuida durante la mayoría de los tiempos experimentales (con respecto al grupo control) a diferencia del grupo tratado con Silimarina. Los niveles séricos de glucosa de ratas tratadas con Silimarina fueron cercanos a los valores obtenidos de los animales control de ratas normales. Los resultados alcanzados sugieren que la Silimarina indujo la recuperación de la función pancreática.

OBJETIVOS

Planteamiento del problema.

En la actualidad se sabe que la pérdida de masa, función y número de células β pancreáticas es un punto determinante en el desarrollo de la mayoría de diabetes, que actualmente es controlada a través de múltiples inyecciones de insulina o por agentes orales hipoglicemiantes, pero el control glicémico ideal no ha sido logrado en su perfección por estos tratamientos convencionales (Satoko, 2005). Por lo tanto, cualquier aproximación terapéutica a la cura de esta enfermedad debe afrontar la necesidad de reemplazar o evitar esta disminución de células β e incluso acelerar la proliferación, diferenciación y supervivencia de células β in vivo. Para conseguir este objetivo se pueden utilizar diferentes estrategias, por un lado se pueden administrar compuestos como la Silimarina, que ha demostrado producir un aumento en la síntesis de RNA ribosomal y transcripcional, así como un aumento en la velocidad en la síntesis de proteínas estructurales y funcionales. (Wellington K.; 2001)

Objetivo General:

- En un modelo de ratas pancreatectomizadas estudiar el efecto de Silimarina sobre la expresión génica del factor de transcripción Pdx-1 en la regeneración de células β - pancreáticas productoras de insulina.

Objetivos Específicos:

- Estudiar el efecto de Silimarina en la expresión del gen Pdx-1 como factor de transcripción necesario para la expresión de células- β , utilizando un modelo de pancreatectomía parcial en la rata.

- Estudiar el efecto de la Silimarina sobre los niveles sanguíneos de glucosa utilizando un modelo de pancreatectomía parcial en la rata.

CONCLUSIONES

Los resultados logrados en esta investigación muestran que la Silimarina indujo un aumento en la expresión génica del factor de transcripción Pdx-1 que es indispensable para la expresión de células- β . Dichos resultados se reflejaron en el nivel sanguíneo de glucosa. Lo anterior sugiere que la silimarina induce la regeneración de las células productoras de insulina con la consecuente regulación de los niveles sanguíneos de glucosa.

BIBLIOGRAFÍA

Ahlgren U, Jonsson J, Jonsson L, Simu K, Edlund H: Beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ipfl/Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes Dev* 12:1763–1768, 1998.

Anandwardhan A. Hardikar. Generating new pancreas from old. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* Vol.15, No.5, July 2004.

Ashizawa S, Brunnicardi FC, Wang XP. PDX-1 and the pancreas. *Pancreas* 2004; 28:109.

Brennand K, Huangfu D y Melton D. All beta cells contribute equally to islet growth and maintenance. *Plos Biol* 5:e163, 2007.

Brissova M, Shiota M, Nicholson W, Gannon M, Knobel S, Piston D, Wright C, and Powers AC. Reduction in Transcription factor *pdx-1* impairs normal glucose sensing and insulin secretion by pancreatic islets. *J Biol Chem* 277: 11225–11232, 2002.

Bouwens L y Rooman I. Regulation of pancreatic Beta-Cell Mass. *Physiological Reviews* 85:1255 1270, 2005.

Bonner-Weir S. Life and death of the pancreatic beta cells. *Trends Endocrinol. Metab.* 11:375-378, 2000.

Carpenter; Cecil Medicina interna, 5ª edición, editorial Elsevier ciencia; Madrid España 2006; pp. 356 - 363.

Cooperman A. Surgery and chronic pancreatitis. *Surg Clin North Am* 2001; 81: 431-55.

Cleaver O.; Melton D. Endothelial signalling during development. *Nature Medicine* 9: 661-668, 2003.

Dandoy-Dron, F., Monthieux, E., Jami, J., and Bucchini, D. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19, 4925–4930.

Del Prato S, Wishner WJ, Gromada J y Schluchter BJ. B-cell mass plasticity in type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 6:319-331, 2004.

Etemad B, Whitcomb D. Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new genetic developments. *Gastroenterology* 2001; 120: 682-707.

Emilien. G.; Maloteaux J-M.; Ponchon Michel. Pharmacological Management of Diabetes: Recent Progress and Future Perspective in Daily Drug Treatment. *Pharmacol. Ther.* Vol. 81, No. 1, 37-51, 1999.

Gazák Radek, Daniela Walterováb and Vladimír K. Silybin and Silymarin – New and Emerging Applications in Medicine, *Current Medicinal Chemistry*, Vol. 14, No. 3, 2007.

Guyton., *Tratado de Fisiología Médica.*, 10ª edición., Ed. McGrawHill., México 2001., pp.899, 923.

Hardley M. *Endocrinology.* 4th Ed. Prentice Hall. USA, 1996.

Hadjantonakis, A.K. and Papaioannou, V.E. Stem cell populations in early embryos. *Differentiation* (this issue) 2001.

Harrison, *Principios de Medicina Interna.* 14ª edición., Ed. McGrawHill Interamericana., Vol II., México 1998., 1973-1989.

Holland Andrew M., Góñez L. J., y col. Conditional Expression Demonstrates the Role of the Homeodomain Factor Pdx-1 in Maintenance and Regeneration of β -cells in the Adult pancreas. *J Mol. Med.* 79: 321-328, 2005.

Iype T., Francis J., Garmey J. C., Nesher R., y col. Mechanism of Insulin Gene Regulation by Pncreatic Transcription Factor Pdx-1. *Mol. Cell. Biol.* 18: 78-84, 2005.

Jensen J. Gene regulatory factors in pancreatic development. *Developmental Dynamics* 229: 176-200, 2004.

Karter A. J.; Mayer E. J.; Selby J. V. y cols. Insulin sensivity and abdominal obesity in African-american, hispanic, and non-hispanic white men and women. *Diabetes*, 45:1547-1555, 1996.

Kim SK y MacDonald RG. Signaling and trancriptional control of pancreatic development. *Curr Opin Genet Dev* 12:540-547 2002.

Keith L. Moore., *Anatomía con Orientación Clínica.*, 3ª edición., Ed. Panamericana., Madrid España 1993., pp.197-200.

Leahy, JL, Bumbalo LM, and Chen C. Beta-cell hypersensitivity for glucose precedes loss of glucose-induced insulin secretion in 90% pancreatectomized rats. *Diabetologia* 36: 1238-1244, 1993.

Leibiger, B, Moede T, Schwarz T, Brown GR, Kohler M, Leibiger IB, and Berggren PO. Short-term regulation of insulin gene transcription by glucose. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 9307-9312, 1988.

Lecomete, J. Lesproprietes Pharmacologigues de la Silymarine. *Revue Medicales de Liegl.* 30 (4), 110, 1975.

Li, H., Arber, S., Jessell, T.M. and Edlund, H. Selective agenesis of the dorsal pancreas in mice lacking homeobox gene Hlxb9. *Nat Gen* 23:67–70, 1999.

Liu T., Wang C., Gou S., y col. PDX-1 expression and proliferation of Duch epithelial cells alter partial pancreatectomy in rats. *Hepatobiliarity Pancreat Dis. Int.* 6: 424-429, 2007.

Liu Y. Q; Nevin P. W., Leahy J. L. Cell adaptation in 60% pancreatectomy rats that preserves normoinsulinemia and normoglycemia. *J Clin. Invest.* 101: 1870-1875, 2005.

Li Y., Cao X., Li L., Brunbaker P. L., y col. B- cell Pdx-1 Expression is Essential for the gluco regulatory, proliferative, and Cytoprotective Action of Glucagon-like Peptide-1. *Diabetes*, Vol. 54, 482-491, 2005.

Melloul, D., Marshak, S., and Cerasi, E. (2002) *Diabetologia* **45**, 309–326.

Morazzoni, P.; Bombardelli. *Silybum marianum (carduus mareaus)* E. *Fitoterapia*, 1995, 64, 3.

Ohneda, K., Ee, H., and German, M. (2000) *Semin. Cell Dev. Biol.* **11**, 227–233.

Ohneda K, Mirmira RG, Wang J, Johnson JD, and German MS. The homeodomain of PDX-1 mediates multiple protein-protein interactions in the formation of a transcriptional activation complex on the insulin promoter. *Mol Cell Biol* 20: 900–911, 2000.

Offield, M.F., Jetton, T.L., Labosky, P.A., Ray, M., Stein, R.W., Magnuson, M.A., Hogan, B.L. and Wright, C.V. PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* 122:983–995, 1996.

Pascual, C.; et al. Effect of Silymarin and Silybin in Oxygen radicals. *Drug Develop. Res.* 29,73, 1993.

Patadaquis; Diagnóstica clínico y tratamiento; 40a edición, editorial Manual Moderno; México 2004, pp. 653 - 658.

Postic, C., Shiota, M., Niswender, K. D., Jetton, T. L., Chen, Y., Moates, J. M., Shelton, K. D., Lindner, J., Cherrington, A. D., and Magnuson, M. A. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 305–315.

Pedersen AA, Petersen HV, Videbaek N, Skak K, and Michelsen BK. PDX-1 mediates glucose responsiveness of GAD (67), but not GAD(65), gene transcription in islets of Langerhans. *Biochem Biophys Res Commun* 295: 243–248, 2002.

Risbud MV, Bhonde RR. Models of pancreatic regeneration in diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2002;58:155-165.

Shils; Nutrición en salud y enfermedad, 9a edición, editorial McGrawHill, vol 2, México 1999, pp. 1351 - 1359.

Stein R 2001. In *Handbook of Physiology Section 7: The Endocrine System*, 1st edn, pp 25–47. Eds LS Jefferson & HM Goodman. New York, NY, USA: Oxford University Press.

Stump Escote Nutrición, diagnóstico y tratamiento, 5ª, editorial McGrawHill, México 2005; pp. 363 - 363.

Soto, C.; Perez, B.L.; Favari, L.P.; Reyes, J.L. *Comp. Biochem. Physiol., C: Pharmacol., Toxicol. Endocrinol.*, 1998, C 119, 125.

Soto, C.; Recoba, R.; Barron, H.; Alvarez, C.; Favari, L. *Comp. Biochem. Physiol., C: Pharmacol., Toxicol. Endocrinol.*, 2003, 136, 205.

Soto, C.; Mena, R.; Luna, J.; Cerbon, M.; Larrieta, E.; Vital, P.; Uria, E.; Sanchez, M.; Recoba, R.; Barron, H.; Favari, L.; Larag, A. *Life Sci.*, 2004, 75, 2167.

Soria, B.; In-vitro differentiation of pancreatic B-cells Review. *Differentiation* 68:205-219, 2001.

Satoko Yamada and Itaru Kojima, Regenerative medicine of the pancreatic b cells, *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2005, 12:218–226.

Sharma A, Zangen DH, Reitz P, et al. The homeodomain protein IDX-1 increases after an early burst of proliferation during pancreatic regeneration. *Diabetes* 1999; 48:507.

Sonnenbichler, J.; Scalera, F.; Sonnenbichler. I. Stimulatory Effects of Silibin and Silicristin from the Milk Thistle *Sylibum marianum* on kidney cells. *Journal of Pharmacol. and Experimental Therapeutics*. Vol. 290.No. 3,1375-1383, 1999.

Teruya, M, Takei S, Forrest LE, Grunewald A, Chan EK, and Charles MA. Pancreatic islet function in nondiabetic and diabetic BB rats. *Diabetes* 42: 1310-1317, 1993.

Utrilla M., 1996. Natural products with hepatoprotective action. *Methods Find Experimental Clinical Pharmacology* 18 (Suppl. B) 11 –12.

Valenzuela J. Enfermedades del páncreas. En: Valenzuela J, Rodés J. *Gastroenterología y Hepatología*. Ed. Mediterráneo, Santiago 1996; 423-61.

Wang Z, Fang R, Olds LC, and Sibley E. Transcriptional regulation of the lactase-phlorizin hydrolase promoter by PDX-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287: G555–G561, 2004.

Wilson ME, Scheel D, German MS. Gene expression cascades in pancreatic development. *Mechanisms of Development* 120:65-80, 2003.

Wellington, K. and Harvis, B. Silymarin: A review of its clinical properties in the management of hepatic disorders. *Biodrugs* 15, 465-489, 2005.

Zoltán Berger. Páncreas en Diabetes y Diabetes en Enfermedades Pancreáticas. *Medwave* Año 4, No. 8, Edición Septiembre 2004. Derechos Reservados.