



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DE LA BIOTINA EN EL DESARROLLO  
DE DIABETES EN UN MODELO EXPERIMENTAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**BIÓLOGO**

P R E S E N T A:

JORGE ALAN LÓPEZ VELÀZQUEZ

TUTORA: DRA. MARÍA CRISTINA REGINA FERNÁNDEZ MEJÍA



2008



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.

## **ABREVIATURAS**

ADP: Difosfato de adenosina

ATP: Trifosfato de adenosina

$\beta$ -OHB: Beta hidroxibutirato

CO<sub>2</sub>: Bióxido de carbono

GLUT: Transportador de glucosa

GMPc: Monofosfato de guanidina cíclico

MCC: B–metilcrotonil-CoA carboxilasa

NAD: Dinucleótido de adenina nicotinamida

NADPH: Dinucleótido de adenina nicotinamida reducida fosfato

PARP: Poli (ADP-ribosa) polimerasa

PC: Piruvato Carboxilasa

PCC: Propionil-CoA carboxilasa

PDX-1: Pancreatic Duodenum Homeobox 1

PKG: Proteína cinasa G

SMVT: Transportador múltiple de vitaminas dependiente de sodio

STZ: Estreptozotocina



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DE LA BIOTINA EN EL DESARROLLO  
DE DIABETES EN UN MODELO EXPERIMENTAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

JORGE ALAN LÓPEZ VELÀZQUEZ

TUTORA: DRA. MARÍA CRISTINA REGINA FERNÁNDEZ MEJÍA

2008



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM

## HOJA DE DATOS DEL JURADO

### 1. Datos del alumno

López  
Velázquez  
Jorge Alan  
56226420  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
302048993

### 2. Datos del tutor

Dra.  
María Cristina Regina  
Fernández  
Mejía

### 3. Datos del sinodal 1

Dra.  
María Eugenia  
Gonsebatt  
Bonaparte

### 4. Datos del sinodal 2

M. en C.  
José Alfonso  
Vilchis  
Peluyera

### 5. Datos del sinodal 3

Dra.  
María de la Paz  
Vital  
Becerra

### 6. Datos del sinodal 4

M. en C.  
Sara Teresa  
Méndez  
Cruz

### 7. Datos del trabajo escrito

Efecto de la biotina en el desarrollo de diabetes en un modelo experimental  
60 p  
2008

## Índice

CONTENIDO	Página
Abreviaturas	1
Resumen	2
Introducción	3
1.-Biotina	3
2.-La biotina en el metabolismo de los carbohidratos	6
3.-Páncreas: Anatomía y Fisiología	11
4.- Diabetes mellitus	14
5.- Tipos de Diabetes mellitus	14
6.- Fisiopatología de la DM1 y DM2	15
7.- Complicaciones clínicas de la Diabetes mellitus: agudas y crónicas	19
8.- Modelos animales de diabetes: Estreptozotocina. Nicotinamida	25
Hipótesis	29
Objetivos	29
Material y Metodología	30
Resultados	39
Discusión	50
Conclusiones	52
Referencias	53

## **RESUMEN**

El incremento de la diabetes en México y el mundo es alarmante, por ello la importancia de su prevención y tratamiento. El objetivo de esta tesis fue analizar el posible efecto protector de la biotina en el desarrollo de diabetes.

Para demostrar esto se montó un modelo experimental de diabetes (nicotinamida y STZ) en ratas las cuales habían sido pretratadas con biotina durante 28 días. En otro grupo de ratas después de la inducción de diabetes se continuó el tratamiento con biotina. Al inicio del experimento, antes de la inducción de diabetes y una vez a la semana en las siguientes 4 semanas después de la inducción, se analizó la glucemia y los cuerpos cetónicos en sangre, así como la supervivencia. También se realizó un análisis inmunohistoquímico del páncreas.

Se demostró que el pretratamiento con biotina protege del desarrollo de diabetes en el 20% de los animales, disminuye las concentraciones de cuerpos cetónicos, reduce la mortalidad de los animales y el daño de los islotes pancreáticos.

En este trabajo concluimos que la biotina tiene un efecto protector parcial en el desarrollo de diabetes, disminuye la mortalidad en las ratas diabéticas, disminuye la producción de cuerpos cetónicos (cetogénesis hepática). La morfología de los islotes pancreáticos de ratas diabéticas pretratadas con biotina sugiere un menor daño tanto morfológico como histológico. Finalmente concluimos que este es un buen modelo para abordar los mecanismos moleculares mediante los cuales la biotina u otras sustancias puedan prevenir o mejorar el tratamiento de la diabetes.

## **INTRODUCCIÓN**

### ***BIOTINA***

La biotina llamada también Vitamina B7 o vitamina H es una vitamina con una estructura química compleja que posee dos anillos: uno de ellos contiene un grupo ureido (-N-CO-N-) y el otro anillo contiene azufre que se denomina anillo tetrahidrotiofeno, de donde se ramifica una cadena lateral de ácido valérico (Final report on the safety assessment of biotin, 2001).

La biotina pertenece al grupo de las vitaminas hidrosolubles del complejo B. En mamíferos actúa como cofactor de cuatro carboxilasas mitocondriales: piruvato carboxilasa (PC), propionil-CoA carboxilasa (PCC), B–metilcrotonil-CoA carboxilasa (MCC), y acetil-CoA carboxilasa (ACC), esta última también en su forma citosólica. Las reacciones de carboxilación tienen una participación muy importante en el metabolismo intermediario, ya que actúan en reacciones clave de la lipogénesis, el ciclo de Krebs, la gluconeogénesis y el catabolismo de proteínas y lípidos (Rodríguez- Meléndez, 2000).

Además de la participación de la biotina en procesos metabólicos como grupo prostético, la biotina modifica funciones biológicas como la proliferación celular, el desarrollo embrionario, funciones inmunológicas y el metabolismo a través de un efecto sobre la expresión genética. (Rodríguez-Meléndez et al. 2003, Pacheco-Álvarez et al. 2002).

#### ***Metabolismo de la biotina en mamíferos.***

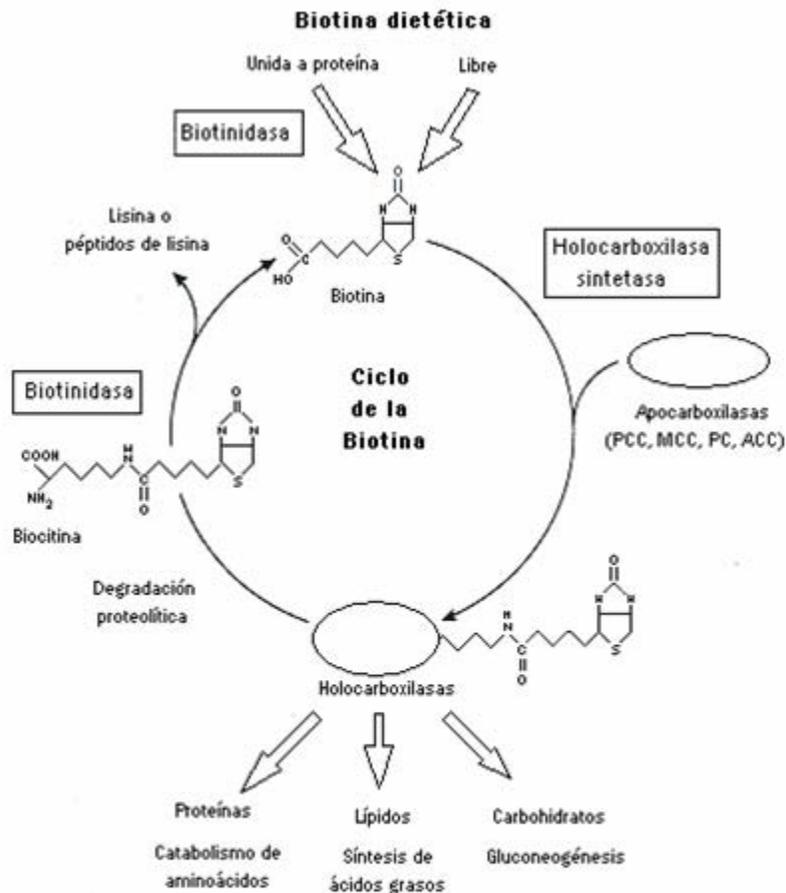
La biotina se encuentra presente en pequeñas cantidades en una gran cantidad de alimentos unida covalentemente al grupo E amino de una lisina formando el dímero conocido como biocitina, péptidos biotinilados, o bien en forma libre (Dakshinamurti y Chauhan, 1994). Para su absorción se requiere romper este enlace semipeptídico por acción de la biotinidasa pancreática (Hymes y Wolf,

1996). La biotina libre se absorbe por los enterocitos de la porción distal del duodeno y proximal del yeyuno y posteriormente pasa al torrente sanguíneo. La entrada a las células se lleva a cabo a través de un transportador múltiple de vitaminas dependiente de sodio (SMVT) que reconoce principalmente la porción del ácido valérico de la biotina (Cohen y Thomas 1982, Chatterjee et al. 1999). El SMVT es una proteína transmembranal que funciona como simportador electroneutro, introduciendo a la biotina y al ácido pantoténico junto con el sodio, a favor de un gradiente de concentración.

Las carboxilasas son sintetizadas como apocarboxilasas, sin actividad enzimática, en el citoplasma. Al unírseles la biotina covalentemente por acción de la holocarboxilasa sintetasa, se forma la proteína activa u holoenzima (Chapman-Smith y Cronan, 1999). Esta reacción se lleva a cabo en dos etapas: en la primera la biotina se activa al reaccionar con una molécula de ATP, formando el intermediario biotinil-5'-adenilato. En la segunda etapa el grupo biotinilo se transfiere a la apoenzima formándose un enlace semipeptídico con un residuo de lisina, localizada dentro de una secuencia Met-Lys-Met altamente conservada en todas las apocarboxilasas (Lamhonwah et al. 1987).

El papel de la biotina en las reacciones catalizadas por las carboxilasas es fundamental, ya que actúa como vector para transferir un grupo carboxilo activado, de una molécula donadora a una receptora, durante la reacción de carboxilación (Jitrapakdee y Wallace, 2003).

Posteriormente, la proteólisis de las holocarboxilasas libera residuos de lisina unidos covalentemente a la biotina (biocitina). Este enlace se rompe por acción de la biotinidasa y de este modo la biotina puede ser reciclada e integrarse como grupo prostético a nuevas carboxilasas sintetizadas, o bien puede catabolizarse formando otros productos derivados y excretarse. La síntesis de las holocarboxilasas y su catabolismo se denomina ciclo de la biotina. **[FIGURA 1].**



**Figura 1. Ciclo de la biotina.** Una vez que la biotina es introducida a las células, por acción de la holocarboxilasa sintetasa es transformada a biotinil-AMP, y de esta manera se une covalentemente a la apocarboxilasa. La forma activa u holocarboxilasa emplea a la biotina como aceptor del ión bicarbonato. Una vez que las carboxilasas son degradadas por proteólisis, se libera la biotina unida a la lisina (biocitina), y este producto por acción de la biotinidasa puede ser nuevamente utilizada en la formación de nuevas holocarboxilasas. Modificado de Rodríguez-Meléndez, 2000.

### ***La biotina en la expresión genética.***

Además de su función clásica como grupo prostético, la biotina modifica la expresión génica, tanto a nivel de la transcripción como de la traducción.

A nivel transcripcional regula diversos genes como los que codifican a las enzimas que requieren de la biotina como grupo prostético y sustrato, como son la holocarboxilasa sintetasa (HCS) (Rodríguez-Meléndez et al. 2001, Solórzano-

Vargas et al. 2002), la acetil coenzima A carboxilasa -1 (ACC1), la propionil coenzima A carboxilasa -A (PCCA)( Solórzano-Vargas et al. 2002), así como para proteínas que no la requieren como cofactor; entre estas últimas se han identificado a la glucocinasa hepática (Chauhan y Dakshinamurti, 1991), la fosfoenolpiruvato carboxilasa hepática (Dakshinamurti y Li, 1994), la glucocinasa pancreática (Borboni et al. 1996, Romero-Navarro et al. 1999), la insulina (Romero-Navarro et al. 1999, Yoshikawa et al. 2002) el factor transcripcional PDX-1 (Yoshikawa et al. 2002), la interleucina 2 y su receptor (Rodríguez- Meléndez et al. 2003, Manthey et al. 2002), así como otros factores transcripcionales (Scheerger y Zempleni, 2003).

La biotina afecta también la expresión de genes a nivel pos-transcripcional. El grupo de Stockert encontró que la biotina modifica la expresión del receptor de asialoglicoproteínas a través de una vía de fosforilaciones que requiere de GMPc y de la proteína cinasa G (Collins et al. 1998, Stockert y Morell 1990, Stockert et al. 1992, Stockert y Ren 1997, De la Vega y Stockert 1999). Por un mecanismo transcripcional que requiere de la activación de la PKG, la biotina también regula la expresión del receptor de insulina (De la Vega y Stockert, 2000).

### ***Efecto de la biotina sobre el metabolismo de los carbohidratos.***

Los efectos de la biotina sobre el metabolismo de carbohidratos se han determinado tanto *in vivo* como *in vitro* en diferentes condiciones fisiológicas: 1) de deficiencia de biotina, 2) en condiciones fisiológicas normales y 3) en estado diabético.

**Efecto de la deficiencia de biotina.** Las primeras evidencias que sugirieron que la biotina intervenía en el metabolismo de los carbohidratos y permitieron el descubrimiento del efecto de la biotina sobre la expresión genética fueron reportadas por el grupo de Dakshinamurti et al. (Mistry et al. 1962). Este grupo

demonstró que las ratas deficientes en biotina presentaban curvas de tolerancia significativamente más elevadas que los animales control y que el contenido de glucógeno hepático y la fosforilación de la glucosa eran menores en los animales deficientes de biotina (Dakshinamurti et al. 1968). Asimismo demostraron que las anomalías en el metabolismo de carbohidratos en ratas deficientes de biotina se debían a una disminución en la actividad de la glucocinasa hepática (Dakshinamurti et al. 1970), enzima clave en la captación posprandial de glucosa por el hígado.

La deficiencia de biotina afecta el metabolismo del islote pancreático. En nuestro laboratorio, con ratas deficientes de biotina, se demostró que la carencia de la vitamina produce una disminución tanto de la actividad como de la abundancia de RNA mensajero de la glucocinasa pancreática, enzima clave en el proceso que permite a la célula  $\beta$  secretar insulina en respuesta a glucosa (Romero-Navarro et al. 1999). De igual manera se observó que los islotes pancreáticos aislados de ratas deficientes de biotina, presentan una secreción disminuida de la insulina en respuesta a glucosa (Romero-Navarro et al. 1999).

### **Efectos de la biotina sobre el metabolismo de carbohidratos en diferentes estados fisiológicos.**

En ratas, dosis farmacológicas de biotina (1mg/kg) incrementan la actividad de la glucocinasa hepática, tanto en condiciones posprandiales como en condiciones de ayuno (Dakshinamurti et al. 1968, Dakshinamurti et al. 1970, Dakshinamurti et al. 1970b).

En células aisladas de rata cultivadas con biotina, se observó que la biotina tiene la facultad de regular la expresión genética. Spence y Koudelka (1984) encontraron que en hepatocitos aislados de ratas normales la biotina incrementa la actividad de la glucocinasa y este aumento se encuentra precedido por un incremento en las concentraciones intracelulares de GMPc. Estudios en nuestro laboratorio demostraron que en cultivos primarios de islotes de ratas normales, el tratamiento con biotina aumenta la actividad y la expresión de la glucocinasa

pancreática. Asimismo se ha encontrado que la expresión del gen de la insulina y la secreción de esta hormona en respuesta a la glucosa se incrementan con el tratamiento con biotina (Furukawa et al. 1995). De igual manera, estudios realizados por Sone y su grupo de trabajo (Laychock et al. 1991) encontraron que islotes estimulados con 100  $\mu$ M de biotina, en presencia de 16.5 mM de glucosa, aumentan la producción de ATP y de CO<sub>2</sub>, además de que la tasa de oxidación de la glucosa fue proporcional a los efectos observados en la secreción de insulina. Este mismo grupo también encontró que en mitocondrias hepáticas, el estado tres de la cadena respiratoria aumenta en respuesta a biotina lo cual favorece una mayor producción de ATP (Sone et al. 2004). También se ha reportado que la biotina aumenta la expresión del factor transcripcional PDX-1, el cual es determinante en el desarrollo pancreático (Yoshikawa et al. 2002) y en la expresión de genes que participan en funciones específicas del islote de Langerhans.

### **Efectos de la biotina en modelos diabéticos.**

***Efectos sobre la hiperglucemia:*** Diversos estudios han encontrado que la administración de dosis farmacológicas de biotina disminuyen la hiperglucemia: pacientes con diabetes tipo 1 tratados durante una semana con biotina, disminuyeron sus concentraciones de glucosa en ayuno (Coggeshal et al. 1985). En un estudio en pacientes japoneses diabéticos tipo 2 (Maebashi et al. 1993), se encontró que la administración oral de 9 mg de biotina diariamente durante un mes disminuyó las concentraciones sanguíneas en ayuno de glucosa, piruvato y lactato; al suspender la administración de la biotina se produjo un retorno a las concentraciones hiperglucémicas observadas antes del inicio del tratamiento.

Así mismo, en pacientes diabéticos sometidos a hemodiálisis que recibieron una dosis equivalente a 21 mg/día de biotina durante 2 meses, mejoraron sus pruebas de tolerancia a la glucosa (Koutsikos et al. 1996), mientras que en otro grupo de pacientes diabéticos con neuropatía diabética, se observó mejoría después de recibir una dosis de biotina durante un año (Koutsikos et al. 1990). Nuestro grupo

ha demostrado que en pacientes diabéticos tipo 2, el tratamiento con 15 mg/día de biotina durante 28 días disminuye el área de las curvas de tolerancia a la glucosa (Báez-Saldaña et al. 2004).

En modelos animales con diabetes tipo 2 también se ha reportado que la biotina disminuye la hiperglucemia. En ratones de la cepa KK no obesos y en las ratas OLETF que presentan obesidad espontánea, se observó una disminución de la hiperglucemia y en la curva de tolerancia a la glucosa en respuesta al tratamiento con dosis farmacológica de biotina (Zhang et al. 1997).

**Efectos sobre el hígado de animales diabéticos:** Estudios en modelos experimentales de ratas diabéticas inducidas por el tratamiento con alloxana (Dakshinamurti et al. 1970) o con estreptozotocina (Zhang et al. 1997) encontraron que la biotina aumentó la actividad de la glucocinasa hepática, el incremento se produce a través de un aumento de la síntesis “de novo” de la proteína. El tratamiento con biotina también incrementó las actividades de las enzimas glucolíticas: fosfofructocinasa y piruvato cinasa, pero no de la enzima bifuncional fosfohexosa isomerasa (Dakshinamurti et al. 1970). En otro estudio más reciente llevado a cabo en ratas cuya diabetes fue inducida por estreptozotocina la biotina redujo la transcripción de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa, enzima limitante de la gluconeogénesis (Dakshinamurti y Li, 1994). Estas observaciones apoyan el concepto de que la biotina posee un efecto hipoglucemiante al favorecer la glucólisis y disminuir la gluconeogénesis.

**Efectos sobre el páncreas de animales diabéticos:** En el modelo diabético producido por estreptozotocina (dosis de 45 mg por kg de peso), se observó que el tratamiento por 15 días con biotina (0.1 mg/rata/día), aumenta la actividad de la glucocinasa pancreática sin afectar la secreción de insulina (Zhang et al. 1997). Sin embargo estos resultados son difíciles de interpretar debido a la toxicidad del tratamiento de la estreptozotocina sobre las células  $\beta$  pancreáticas.

Además de su función clásica como grupo prostético en el metabolismo, la vitamina hidrosoluble biotina, regula la expresión genética y muchos de los genes regulados por esta vitamina participan a su vez en el metabolismo de los carbohidratos.

El mantenimiento de la homeostasis del metabolismo de carbohidratos en los mamíferos es regulado de manera integral por diversos órganos como el hígado, el cerebro y el páncreas; participan también el tejido adiposo y el músculo.

El páncreas es un órgano particularmente importante desde el punto de vista endocrino ya que con sus secreciones hormonales mantiene estables las concentraciones de glucosa en el organismo, con lo cual, las células obtienen la energía necesaria para realizar sus funciones de manera adecuada y mantener la vida.

## **PÁNCREAS**

La palabra páncreas deriva de las raíces griegas *pan* que significa “todo” y *creas* que significa “carne”. El páncreas en los mamíferos consiste de tres compartimientos principales: el sistema ductal, las células exocrinas acinares que secretan enzimas hacia el intestino, y células endocrinas que secretan hormonas hacia la circulación sanguínea (Slack, 1995).

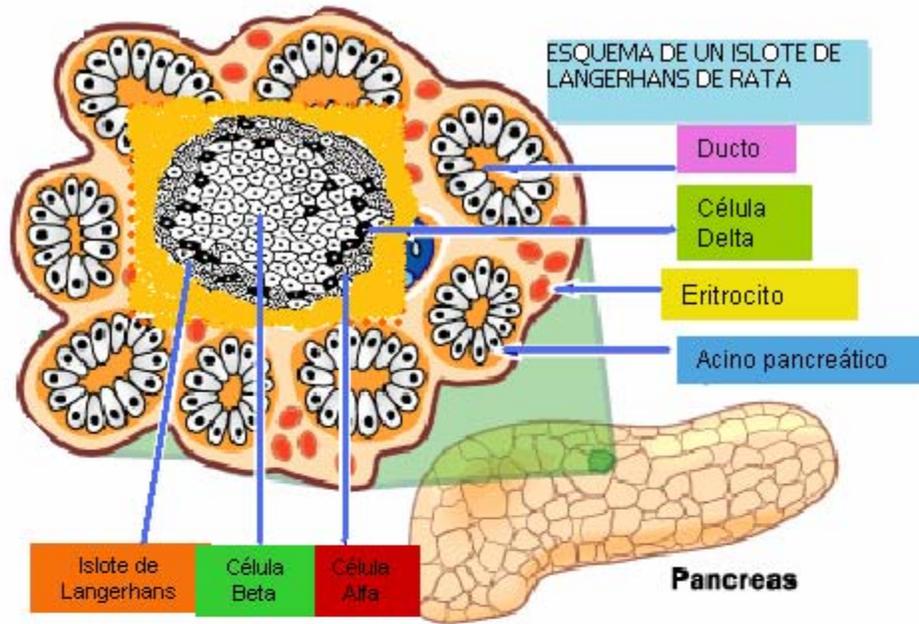
El páncreas de los mamíferos está situado en la cavidad abdominal, entre el bazo y el duodeno (Bishop y Polar, 2003). Esta glándula se conecta al duodeno por el ámpula de Vater, que es la región donde se une el conducto pancreático principal con el conducto biliar. **[FIGURA 2]**.

Anatómicamente el páncreas se divide en cabeza, cuerpo y cola, estos términos son utilizados para designar las regiones del órgano desde la porción proximal hacia la distal (Hiriart, 2002).

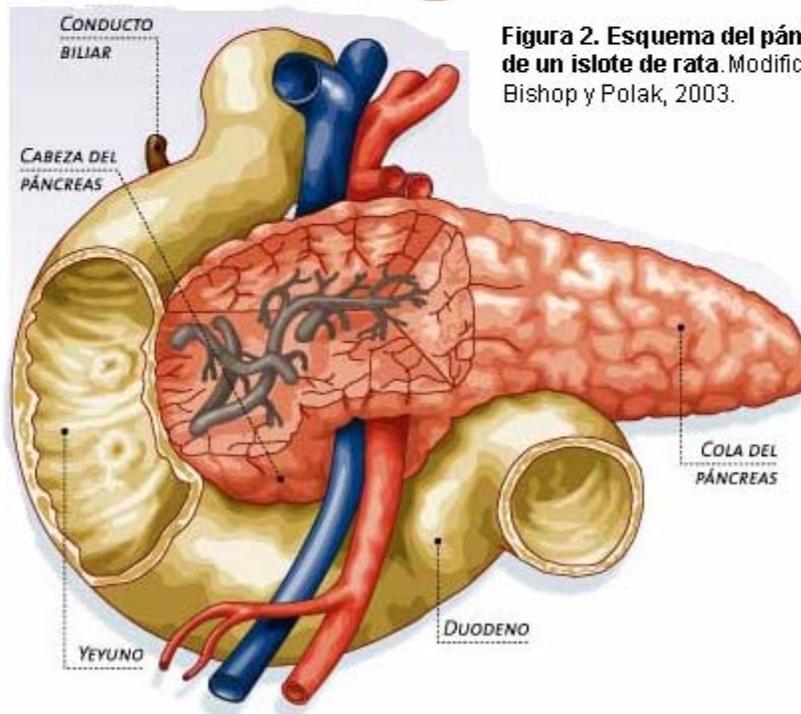
El páncreas exocrino es una glándula acinar ramificada y lobulada. Las células secretoras están agrupadas dentro de los acinos que contienen enzimas digestivas (proteasas, amilasas, lipasas y nucleasas entre otras) y componentes no enzimáticos incluyendo el bicarbonato (Slack, 1995).

Las células endocrinas se agrupan en los islotes de Langerhans, los cuales se encuentran dispersos en todo el páncreas, están compuestos de células epiteliales dispuestas en cordones, entre ellos hay una red de vasos sanguíneos y están separados de los lóbulos vecinos por una fina cápsula de fibras reticulares.

Existen cinco tipos principales de células endocrinas. Las células  $\beta$  secretan insulina, y también un antagonista de la insulina llamado amilina, este tipo celular forma la mayoría de las células en el islote. Las células  $\alpha$  secretan glucagon, las células  $\delta$  secretan somatostatina, las células  $\epsilon$  secretan ghrelina y las células PP secretan polipéptido pancreático. Los islotes ricos en células PP se encuentran particularmente en la parte posterior de la cabeza (Bishop y Polar, 2003).



**Figura 2. Esquema del páncreas y de un islote de rata.** Modificado de Bishop y Polak, 2003.



En los roedores existe un patrón de segregación de las células  $\beta$  en el islote, donde éstas se encuentran en el centro del islote, mientras que los demás tipos celulares se ubican en la periferia, sin embargo en los humanos esta segregación, aunque presente, está menos clara y definida. La proporción de células endocrinas es una fracción pequeña de la masa pancreática total,

aproximadamente 4% del total de células para el caso del ratón, sin embargo la fracción secretora de insulina comprende cerca del 80% de las células del islote pancreático.

Los islotes están irrigados por un extenso laberinto de capilares. Cada islote está normalmente irrigado por 1-3 arteriolas, las cuales abruptamente terminan como capilares y 1-6 vénulas, dependiendo de la talla del islote. Los capilares en los islotes pancreáticos incluyen células endoteliales que están fenestradas para permitir la rápida captación de las hormonas peptídicas y es conocido que los islotes con capilares fenestrados son de 4-7 veces más permeables que los capilares no fenestrados. Los productos hormonales secretados por las células de los islotes dentro del fluido extracelular circundante pueden así atravesar la membrana basal del endotelio antes de que entren al torrente sanguíneo (Norris 1997, Norman 1997).

Son los islotes pancreáticos los que con sus secreciones hormonales, como la insulina y el glucagón, regulan la captación de glucosa tanto en la condición posprandial como en el ayuno, respectivamente. El desequilibrio de estos delicados mecanismos que controlan la homeostasis de la glucosa puede desencadenar la diabetes mellitus.

## ***DIABETES MELLITUS***

La diabetes mellitus se define como un grupo de enfermedades metabólicas caracterizado por hiperglucemia a consecuencia de defectos en la secreción de insulina, la acción de la insulina o ambos (American Diabetes Association 2006).

### ***TIPOS DE DIABETES MELLITUS***

La diabetes no es una alteración simple, sino que es la culminación de un conjunto de desórdenes complejos que generan una deficiencia relativa o absoluta de insulina.

Los niveles de glucosa sanguíneos dependen de la tasa en la cual la glucosa entra a las células y abandona la sangre, así, defectos en algún punto de esta vía metabólica pueden causar diabetes. Estos defectos pueden ser agrupados en aquéllos que causan una disminución absoluta en los niveles de insulina plasmática (deficiencia de insulina) o aquellos que interfieren con la función de la insulina sobre los tejidos blanco (resistencia a la insulina) (German, 2000).

Existen dos tipos principales de diabetes: la diabetes tipo 1 (DM1) y la diabetes tipo 2 (DM2), además de las formas monogénicas conocidas como MODY. La diabetes tipo 1 se presenta cuando hay una destrucción total o parcial de las células  $\beta$  productoras de insulina en los islotes de Langerhans pancreáticos, y es causada por un proceso autoinmune en el 95% de los casos. Los pacientes con diabetes tipo 1 requieren tratamientos con insulina exógena para sobrevivir. Su frecuencia es de cerca del 10% de todos los casos de diabetes (Jarret, 1991).

La DM2 se caracteriza por una disminución en la acción de la insulina y/o una secreción anormal de insulina (ADA 2006). Es una de las enfermedades más frecuentes en el mundo (aproximadamente 90% de los casos totales de diabetes), y los estimados globales predicen aumentos de aproximadamente 50% en el número de casos, para el año 2010, con una mayor incidencia en los países en

vías de desarrollo, debido principalmente a los desequilibrios dietéticos, tales como una ingesta excesiva de carbohidratos y baja en proteínas (Zimmet et al. 2001).

### ***Fisiopatología de la diabetes tipo 1***

La diabetes tipo 1 es una enfermedad autoinmune en la gran mayoría de los casos, no obstante en un 5% de los casos la etiología puede definirse como idiopática (de causa desconocida).

Generalmente, la patología se manifiesta en la niñez. Durante el inicio de la enfermedad pueden ser detectados anticuerpos anti célula  $\beta$  en la circulación sanguínea, entre los que se encuentran anticuerpos contra células del islote (ICA), anticuerpos contra glutamato descarboxilasa (GAD) y anticuerpos contra insulina (IAA). Estos anticuerpos pueden ser utilizados para diagnóstico ya que como tal no causan la destrucción de la célula  $\beta$ . Por otra parte, las células T son las que se infiltran en los islotes (proceso llamado insulinitis) y destruyen las células  $\beta$ . En la mayoría de los casos, éste es un proceso que puede prolongarse meses y hasta años, aun cuando la hiperglucemia ya ha sido crónica y la sintomatología de la diabetes ya se ha manifestado (German, 2000).

### ***Fisiopatología de la diabetes tipo 2***

La diabetes tipo 2 incluye al 90% de los casos de diabetes, y se caracteriza por deficiencias en la acción de la insulina y/o defectos en la secreción de insulina.

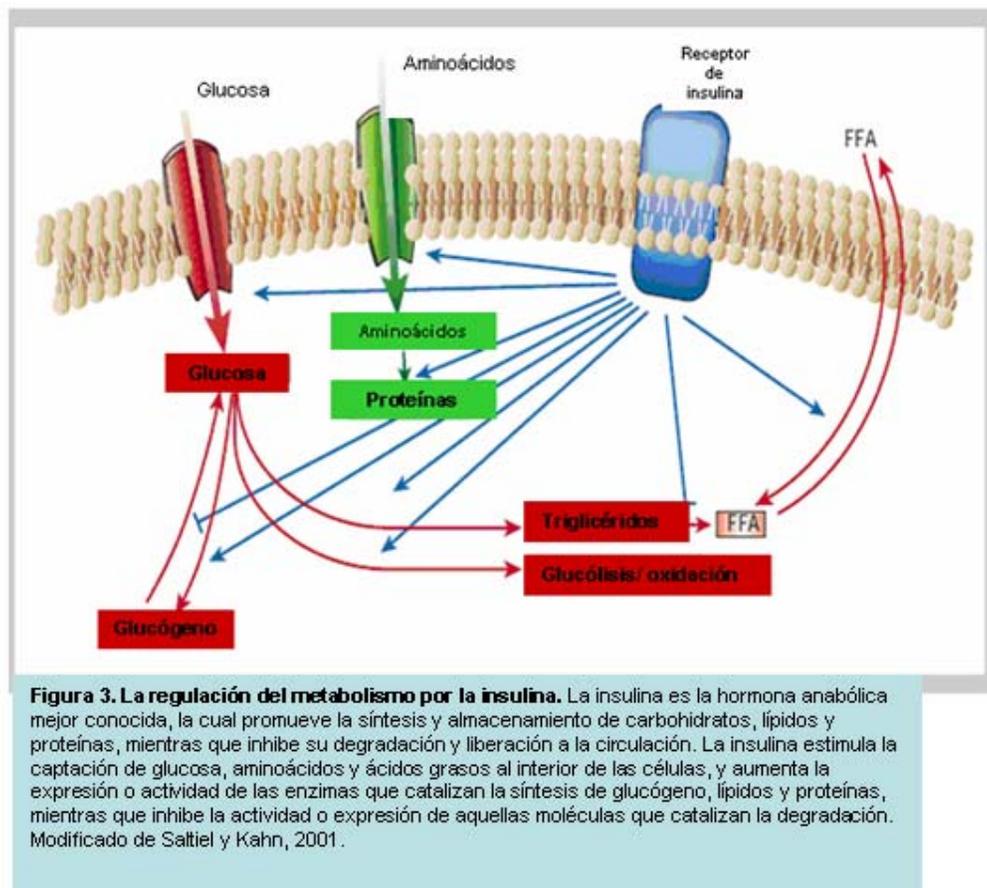
Para entender las alteraciones metabólicas responsables en el desarrollo de la enfermedad, es necesario entender la regulación del metabolismo energético en el organismo.

#### ***Fundamentos de metabolismo energético***

Durante el estado posprandial, los carbohidratos y lípidos en exceso son almacenados en forma de glucógeno y triglicéridos, respectivamente. En estado de ayuno estos reservorios energéticos son degradados para proveer de energía

al organismo. Las reservas de energía son sintetizadas y degradadas como respuesta de mensajes hormonales.

Después de comer, la regulación de la secreción de insulina por las células  $\beta$  pancreáticas junto con la respuesta hacia la insulina por los principales tejidos participantes en el metabolismo de la glucosa, tales como el músculo, el hígado y el tejido adiposo, mantienen la homeostasis de la glucosa en el plasma. La insulina promueve la captación de glucosa, la síntesis de glucógeno en hígado y músculo, así como la formación de lípidos para ser almacenados en el tejido adiposo, y la síntesis de proteínas en la mayoría de las células. **[FIGURA 3]**. El paso limitante en la captación de glucosa en el cuerpo es el transporte de glucosa dentro de las células del músculo esquelético, lo que corresponde a más del 75% de la captación de glucosa (Klip y Paquet, 1990). Asociado con el efecto estimulador de la insulina sobre la síntesis de las reservas energéticas, en el estado prandial, la hormona inhibe la producción de glucosa y la lipólisis. (Barthel y Schmolli 2003).



Durante el estado de ayuno, disminuyen las concentraciones de insulina en plasma mientras que las hormonas contrarreguladoras de insulina, como el glucagon, los glucocorticoides y las catecolaminas, participan en la producción de glucosa degradando el glucógeno y activando la gluconeogénesis, así mismo inician la lipólisis, además de disminuir la síntesis de proteínas y aumentar su degradación (Bolli y Fanelli, 1999).

Además de las hormonas clásicas que participan en la regulación del metabolismo, existe evidencia que las hormonas secretadas por el tejido adiposo, las adipocinas, así como los ácidos grasos libres, influyen en el metabolismo y el gasto energético (Arner, 2005).

## **Metabolismo en la diabetes tipo 2**

La fisiopatología de la diabetes tipo 2 se caracteriza por una disminución en la acción biológica de la insulina y/o un daño en la secreción de la hormona.

Las etapas tempranas de la enfermedad se caracterizan por la resistencia a la insulina; un estado inconveniente donde la insulina es incapaz de ejercer sus efectos biológicos a concentraciones que son efectivas en sujetos sanos (Saltiel y Kahn, 2001). La resistencia a la insulina es considerada como el factor que integra diversas manifestaciones clínicas en el desarrollo del síndrome metabólico, tales como la intolerancia a la glucosa, la hipertensión y las dislipidemias.

La resistencia a la insulina ocasiona una deficiente captación de glucosa y por tanto una inadecuada síntesis de glucógeno en los tejidos periféricos (DeFronzo 1988, Cline 1999).

El escaso almacenamiento de glucógeno en el hígado, así como la actividad de la glucógeno sintasa son también observados en la resistencia a la insulina (Shulman 2000, Bogardus 1984). La resistencia a la insulina causa también una

inhibición defectuosa de la producción de glucosa hepática, lo que ocasiona que se siga produciendo glucosa en un estado posprandial, semejante a un estado de ayuno (Barthel y Schmoll 2003). La resistencia a la acción anti-lipolítica de la insulina también favorece la degradación de los triglicéridos en el tejido adiposo y la producción de ácidos grasos libres, los cuales inhiben la captación de glucosa estimulada por la insulina así como el metabolismo en el músculo esquelético, estimulan la gluconeogénesis hepática (Boden y Shulman 2002, Shulman 2000) e interfieren con la señalización del receptor de insulina (Saltiel y Kahn, 2001). Se conoce además que cambios en los niveles de adipocinas en suero contribuyen al estado de resistencia a la insulina (Rajala y Scherer, 2003).

La resistencia a disminuir los niveles de glucosa en suero determina que se presente un ligero aumento en las concentraciones de glucosa lo cual estimula la secreción de insulina y se genere hiperinsulinemia. En un inicio, la hiperinsulinemia es capaz de contrarrestar la resistencia a la insulina. El estado diabético se desarrolla cuando la secreción de insulina no puede compensar el estado crónico de resistencia a la insulina, y es en ese momento cuando la hiperglucemia se presenta tanto en el ayuno como en un estado posprandial (Reaven,1988).

## **COMPLICACIONES CLÍNICAS EN LA DIABETES**

La deficiencia de insulina que se genera en la diabetes tipo 1 y en la diabetes tipo 2 mal controlada, conlleva a *complicaciones patológicas a corto plazo*.

### ***Complicaciones patológicas a corto plazo***

La falta de insulina en los órganos blanco para esta hormona, es interpretado como un estado de ayuno, y las células responden para compensar la situación. El hígado secreta glucosa producida por glucogenólisis y gluconeogénesis, el músculo degrada proteínas y libera aminoácidos, mientras que el tejido adiposo libera ácidos grasos. Los niveles de glucosa sanguíneos continúan aumentando hasta que se sobrepasa el límite para reabsorber glucosa en los túbulos proximales renales y la glucosa aparece en la orina (*glucosuria*). La glucosuria genera en la persona diuresis elevada que se describe como orinar frecuentemente (*poliuria*) y padecer sed excesiva (*polidipsia*).

Los cambios repentinos en la concentración de glucosa plasmática causan *visión borrosa* debido a que la glucosa en plasma se equilibra lentamente con la glucosa extracelular en los lentes del ojo (Kohner et al. 2001).

El estado catabólico inducido por la deficiencia de insulina y la degradación de los tejidos trae consigo la pérdida de grasa y masa muscular además de una falta de calorías debida a la glucosuria, que se presentan como *pérdida de peso corporal, debilidad (caquexia) y fatiga*. La deficiencia de insulina también afecta disminuyendo la función del sistema inmune, lo que ocasiona un aumento en la probabilidad de contraer infecciones (Frayn, 1986).

La pérdida continua de líquidos corporales ocasionada por la glucosuria genera una *hiperosmolaridad* que puede llevar a un estado mental alterado y en ocasiones causar *coma hiperosmolar* (Soler et al. 1973).

Sin embargo, en el momento que se presenta la escasez absoluta de insulina ya existe cetosis lo suficientemente severa para ocasionar *cetoacidosis*, tiempo antes que se presente coma hiperosmolar.

Cuando los niveles de insulina están disminuidos se favorece la producción de cuerpos cetónicos a causa de un aumento en la cantidad de ácidos grasos y en la  $\beta$ -oxidación, además de un incremento en la cetogénesis hepática y la disminución del metabolismo de los cuerpos cetónicos en tejidos periféricos (Mc Garry y Foster, 1980).

Los niveles de ácidos grasos libres aumentan a consecuencia de la degradación excesiva de triglicéridos en los adipocitos, esto se lleva a cabo al aumentar la actividad de la lipasa sensible a hormonas (lipasa intracelular), que en condiciones normales es inhibida por la insulina. En el hígado, se aumenta la  $\beta$ -oxidación porque los niveles de malonil CoA (inhibidor de la Carnitina Acil Transferasa I, que controla la entrada de ácidos grasos a la mitocondria, paso limítrofe en el catabolismo de los ácidos grasos) están disminuidos dado que no existe el citrato como sustrato al inicio de la gluconeogénesis activa ni la inhibición de Acetil CoA carboxilasa. El acetil CoA, producto de la  $\beta$ -oxidación, se acumula en la mitocondria ya que el ciclo de Krebs está reducido a causa de que el oxalacetato es llevado a la gluconeogénesis y además que los altos niveles de NADPH y ATP de la  $\beta$ -oxidación inhiben el ciclo. El exceso de acetil CoA es entonces el sustrato para la producción elevada de cuerpos cetónicos (Mc Garry y Foster, 1980).

En la cetogénesis, que causa una cetonemia, y ésta lleva a un estado de cetoacidosis, gran parte de la acetil coenzima A es utilizada en la síntesis de ácido  $\beta$ -hidroxibutírico y ácido acetoacético. El acetoacetato es convertido en acetona a través de la descarboxilación espontánea no enzimática en relación lineal a su concentración (Tavera y Coyote, 2006).

Los cuerpos cetónicos acetoacetato y  $\beta$ -hidroxibutirato atraviesan las membranas tanto mitocondrial como celular y son liberados hacia la circulación sanguínea ocasionando cetonemia.

La acidosis es secundaria a la sobreproducción de ácido  $\beta$ -hidroxibutírico y acetoacético. En condiciones fisiológicas de pH, estos dos cetoácidos se disocian completamente y el exceso de hidrogeniones se une al bicarbonato, originando un descenso en los niveles séricos del mismo. Los cuerpos cetónicos circulan en forma aniónica, lo cual origina acidosis de anión elevado, característico de la cetoacidosis (Tavera y Coyote, 2006).

La utilización de los cuerpos cetónicos por los tejidos periféricos es activada por la insulina. Si la producción de cuerpos cetónicos excede su utilización en tejidos periféricos, los niveles de éstos en el plasma comienzan a aumentar. En el plasma, el acetoacetato se convierte espontáneamente en acetona, que al ser volátil confiere un olor frutal característico de la respiración de pacientes diabéticos con niveles elevados de cuerpos cetónicos (Tavera y Coyote, 2006).

En la cetogénesis descompensada se sobrepasa la capacidad de los riñones para excretar los cuerpos cetónicos, y el aumento de estos metabolitos disminuye el pH sanguíneo. La tasa respiratoria aumenta en un intento para disminuir el pH expulsando  $\text{CO}_2$ , y produciendo un patrón de respiración caracterizado por ser rápido y profundo que recibe el nombre de *respiración de Kussmaul* (Fitzgerald et al. 1961).

Concomitante al aumento en los niveles de glucosa ocurre una diuresis osmótica, en donde es muy frecuente que el paciente no puede compensarla bebiendo líquidos debido a las náuseas y el vómito que potencian la pérdida de volumen (hipovolemia). Como resultado, la hipotensión puede aumentar la secreción de epinefrina acelerando la producción de cuerpos cetónicos. El aumento en los niveles de glucosa y la excesiva pérdida de agua a causa de la diuresis osmótica y la hiperventilación, aumenta la osmolaridad del suero y en conjunto con la disminución del pH, se puede afectar el nivel de consciencia (Cruz-Caudillo y Sabatini, 1995).

Desde el punto de vista clínico, generalmente la cetoacidosis diabética se acompaña de náuseas, vómito, respiración difusa y nivel de consciencia alterado. Asimismo se presenta caquexia, somnolencia, hiporreflexia, hipotensión, taquicardia, signos de deshidratación y respiración de Kussmaul con aroma cetósico (Fitzgerald et al. 1961)

Las anormalidades clínicas de la cetoacidosis diabética que ponen en riesgo la vida de un diabético son la acidosis metabólica, la hiperosmolaridad, la hipovolemia y los desequilibrios electrolíticos (hipocalemia el más común) (Cruz-Caudillo y Sabatini, 1995).

### ***Complicaciones patológicas a largo plazo en la diabetes.***

Las complicaciones diabéticas a largo plazo se dividen en complicaciones microvasculares y macrovasculares.

#### ***Complicaciones microvasculares***

Las complicaciones microvasculares derivan del daño a los vasos sanguíneos de menor calibre, los capilares y arteriolas precapilares, producido por el adelgazamiento de la membrana basal del endotelio. El adelgazamiento de la membrana puede observarse al momento del diagnóstico de la diabetes, sin embargo la patología tisular requiere de años para desarrollarse y ser detectada clínicamente (Brownlee, 2001).

Las complicaciones microvasculares comprenden la retinopatía, nefropatía y neuropatía.

Aunque las manifestaciones clínicas de las complicaciones microvasculares se presentan en todos los tipos de diabetes, éstas son más comunes en la diabetes tipo 1 que en la diabetes tipo 2. El riesgo para desarrollar complicaciones microvasculares está estrechamente relacionado al nivel de control glicémico: una concentración más baja de glucosa en plasma propicia una menor incidencia de desarrollar complicaciones microvasculares (Brownlee, 2001).

Los signos que indican daño en la microvasculatura de la retina del ojo comprenden microaneurismos, hemorragias internas, exudados y edema retinal, y en conjunto conforman la retinopatía no proliferativa. La fuga de capilares dentro de la mácula puede causar pérdida de la visión. Mientras que un aumento compensatorio en el crecimiento de nuevos vasos es llamado retinopatía proliferativa que puede causar hemorragia vítrea y desprendimiento de retina (Kohner et al. 2001).

El cuadro clínico de la nefropatía diabética se caracteriza por proteinuria, que se detecta por un aumento en la concentración de albúmina en la orina (microalbuminuria). Cuando este signo es detectado y el paciente no lleva un control glucémico adecuado, éste puede evolucionar hacia insuficiencia renal crónica al grado de causar la muerte en el paciente tras la falla renal (Viberti, 1983).

La neuropatía diabética afecta los nervios de manera individual o en grupo. La forma mas común de neuropatía en personas diabéticas es la neuropatía periférica diabética y se manifiesta como adormecimiento y dolor de las extremidades inferiores, que evoluciona hacia una pérdida de la sensibilidad donde se pueden involucrar también las extremidades superiores.

La neuropatía autonómica es también un trastorno común que se presenta como hipotensión en la postura, taquicardia, gastroparesis (motilidad gástrica deficiente causando retardo en el vaciado gástrico), diarrea, constipación, retención urinaria e impotencia sexual (Young et al. 1998).

### ***Complicaciones macrovasculares***

Las complicaciones macrovasculares son características también en todas las formas de diabetes pero son más comunes en la diabetes tipo 2. Estas complicaciones comprenden al infarto al miocardio, los accidentes cerebrovasculares, la enfermedad vascular periférica y las amputaciones (Brownlee, 2001).

La diabetes es hoy la segunda causa de muerte en México debido a las complicaciones de la enfermedad. El estudio de la fisiopatología de estas complicaciones y sus posibles tratamientos es difícil en humanos, además que conlleva implicaciones éticas, por ello es muy frecuente el uso de modelos animales con los cuales se trabaja de una manera controlada y con los cuales se pueden ensayar distintos tratamientos.

## **MODELOS ANIMALES DE DIABETES EXPERIMENTAL**

Los modelos animales de diabetes asemejan los cambios fisiológicos y patológicos característicos de los diferentes tipos de diabetes, y son importantes para entender de una mejor manera el desarrollo de esta compleja enfermedad y así proponer tratamientos farmacológicos contra este padecimiento. Los modelos experimentales de diabetes pueden inducirse por tóxicos, por virus o bien ser de origen genético producidos a través de cruzas, mutaciones espontáneas o ingeniería genética (Mc Neill, 2000).

Los modelos animales de diabetes tipo 2 de origen genético más frecuentemente estudiados son los ratones db/db, ob/ob, KK, NZO, y la rata Zucker fa/fa. En la mayoría de estos modelos se manifiestan distintos grados de glucemia, insulinemia y obesidad (Mc Neill, 2000).

Los modelos genéticos de diabetes mellitus tipo 1 incluyen a los ratones NOD y a las ratas diabéticas BB. En estos animales, la diabetes aparece espontáneamente con una dependencia total de insulina exógena para que el animal sobreviva. La inducción viral de diabetes mellitus dependiente de insulina permite identificar el papel que llevan a cabo los factores ambientales en la patogénesis de la diabetes humana (Mc Neill, 2000).

Los agentes químicos que producen diabetes se clasifican dentro de tres categorías (Mc Neill, 2000), que incluyen agentes que 1) dañan específicamente a las células  $\beta$  (estreptozotocina); 2) que causan inhibición temporal de la producción de insulina y/o su secreción (alloxana) y 3) que disminuyen la eficacia metabólica de la insulina sobre los tejidos donde actúa (dexametasona). El agente químico empleado más comúnmente es la estreptozotocina (STZ).

**Estreptozotocina.** La estreptozotocina además de ser miembro de las drogas antineoplásicas alquilantes, posee amplio espectro como antibiótico y muy frecuentemente es usado para inducir diabetes mellitus en animales experimentales a través de sus efectos tóxicos sobre la célula  $\beta$  pancreática.

La STZ es un derivado monofuncional nitrosourea análogo de la glucosa, aislado del fungoide *Streptomyces achromogenes*. Su estructura molecular corresponde a una molécula de 2-desoxi-D glucosa sustituida en el C2 con un grupo N-metil-N-nitrosourea. [FIGURA 4].

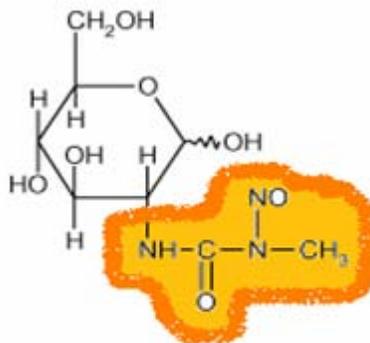


FIGURA 4. Estructura química de la Estreptozotocina (STZ). En color se observa el grupo Nitrosoureico que sustituye a una molécula de D-glucosa.

La dosis intravenosa que más frecuente se usa para inducir modelos de diabetes tipo1 es de entre 40 y 60 mg/kg de peso (Like y Rossini, 1976). Mientras que con un tratamiento intraperitoneal de 100 mg/kg de estreptozotocina (Szkudelski, 2001) se pueden desarrollar modelos que asemejan diabetes tipo 2.

El daño selectivo de la estreptozotocina a las células  $\beta$  pancreáticas está ligado a la capacidad del transportador GLUT2 de transportarla al interior de las mismas (Bolzan 2002, Hosokawa 2001). Reducciones en la expresión de GLUT2 previenen su acción diabetogénica (Schnedl et al. 1994). La estreptozotocina en el interior de la célula  $\beta$  produce daños por alquilación del DNA (Szkudelski, 2001). El daño masivo en el DNA

produce un aumento cercano a 500 veces en la actividad de la poli ADP-ribosa polimerasa (PARP-1), una enzima nuclear que convierte a la  $\beta$ -nicotinamida-adenín-dinucleótido (NAD) en polímeros de poli (ADP)ribosa (PAR), los cuales participan en la reparación del daño al DNA (Cipriani et al. 2005, Pieper et al. 1999). La hiperactivación de esta enzima por estrés genotóxico, disminuye rápidamente las concentraciones celulares de su substrato, la NAD. Esta disminución de la NAD, produce una disminución en la producción de ATP y la célula, en un esfuerzo por sintetizar más NAD, consume más ATP presentándose una crisis energética que culmina en la muerte de la célula por necrosis (Pieper et al. 1999, Cipriani et al. 2005). La activación de la PARP-1 y los efectos subsecuentes son denominador común del daño citotóxico producido por diferentes agentes (Virag y Szabo, 2002), por lo que acciones dirigidas a contrarrestar estos efectos constituyen herramientas para el tratamiento de diabetes. Recientemente, varios estudios también han encontrado que la activación de PARP-1 promueve una cascada de eventos que provocan disfunción mitocondrial y la activación de apoptosis (Chiarugi 2002, Cipriani et al. 2005). En animales transgénicos con PARP-1 abatida o inhibidores de la actividad de la PARP-1 se previene el daño producido por la estreptozotocina a las células  $\beta$  pancreáticas (Pieper et al. 1999, Pieper et al. 1999, Burkart et al. 1999). Igualmente, la repleción de NAD disminuye el efecto tóxico de la estreptozotocina (ver sección Nicotinamida).

Otros efectos asociados a la toxicidad de la estreptozotocina son: la inhibición del ciclo de Krebs (Turk et al. 1993) y del consumo de oxígeno de la mitocondria (Nukatsuka et al.1990). Igualmente, el efecto de la estreptozotocina reduce la actividad de enzimas mitocondriales como la ceto-glutarato deshidrogenasa (Rasschaert et al. 1992) y la glutamato deshidrogenasa (Eizirik et al. 1988), reduce también la abundancia del mitARN del citocromo b (Nukatsuka et al.1990, Svensson et al. 1991) y del translocador del nucleótido de adenina (Welsh et al. 1991). Estos eventos repercuten en un aumento de nucleósidos, sustratos de la xantina oxidasa, enzima presente en altas cantidades en la célula  $\beta$ . La reacción de esta enzima forma aniones superóxido (Szkudelski, 2001) que también afectan a la célula  $\beta$ . Además de

los mecanismos tóxicos de la estreptozotocina anteriormente descritos, la acción del óxido nítrico también parece contribuir al efecto deletéreo de ésta, sin embargo existe controversia sobre este mecanismo (Papaccio et al. 2000).

**Nicotinamida.** La toxicidad de la estreptozotocina puede ser atenuada por la nicotinamida. El modelo de diabetes en ratas producido por estreptozotocina y nicotinamida lleva a un estado de hiperglucemia de larga duración sin elevada mortalidad (Masiello et al. 1990, Masiello y Bengamini 1977, Mistry et al. 1962, Bouix et al. 1995, Vital et al. 2006).

La nicotinamida, también conocida como niacinamida o vitamina B3, es una amida del ácido nicotínico soluble en agua, es un precursor de la coenzima  $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleótido ( $\text{NAD}^+$ ) y aumenta la relación ATP/ADP en la cadena del transporte de electrones en la mitocondria (Ishaque y Al-Rubeai, 2002). La nicotinamida protege parcialmente a las células  $\beta$  pancreáticas del efecto tóxico de la estreptozotocina (Schein et al. 1967, Dulin y Wyse 1969), aportando sustrato para la síntesis de NAD, lo que evita que la célula disminuya el contenido de ATP, presente crisis energética y muera. Así la toxicidad de la estreptozotocina puede ser atenuada por la nicotinamida. Este modelo animal de diabetes inducido por nicotinamida y estreptozotocina genera un estado de hiperglucemia crónica sin elevada mortalidad (Masiello et al. 1990).

***Hipótesis:***

La biotina modifica el metabolismo de los carbohidratos tanto en condiciones fisiológicas normales como en el estado diabético, entonces, es posible que la biotina tenga un efecto protector sobre el desarrollo de diabetes.

***Objetivo general:***

Analizar en un modelo experimental de diabetes inducido por estreptozotocina y nicotinamida, si la biotina tiene un efecto protector sobre el desarrollo de la enfermedad.

***Objetivos particulares:***

- 1) Montar un modelo experimental de diabetes inducida por STZ y nicotinamida.
- 2) Evaluar en este modelo los parámetros metabólicos alterados en diabetes:
  - El peso corporal
  - La sobrevivencia
  - La producción de cuerpos cetónicos ( $\beta$ -hidroxibutirato)
  - La tolerancia a la glucosa
  - La sensibilidad a la insulina.
- 3) Analizar si el pretratamiento con biotina tiene un efecto protector en la inducción de diabetes.
- 4) Analizar si la administración de biotina después de la inducción de diabetes modifica los parámetros metabólicos alterados en la diabetes.
- 5) Analizar si el pretratamiento con biotina mantiene la morfología del islote pancreático después de 4 semanas de la inducción de diabetes.

## **Material y Metodología**

**Materiales:** se adquirieron los reactivos de las siguientes fuentes: estreptozotocina (STZ) (SIGMA, MO, USA), nicotinamida (SIGMA, MO, USA), citrato de sodio y sales (JT BAKER, Xalostoc, MEX), PBS, biotina (ROCHE, Lausana, Suiza), Sevorane (Abott, CA, USA), anestésal (Pfizer, CA, USA), anticuerpos insulina G-pig  $\alpha$  insulina (ICN, CA, USA), glucagon mouse  $\alpha$  glucagon (SIGMA, MO, USA), anticuerpos secundarios FITC y CY5 (Jackson ImmunoResearch, USA).

**Animales de experimentación:** Los animales se obtuvieron del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) de la UNAM. En todo momento los animales se trataron de acuerdo con los lineamientos del Comité de Ética para el manejo de animales del IIB. Se utilizaron 80 ratas macho de la cepa Wistar con un peso promedio de 250-300 gramos. Al inicio del experimento se les midió el peso corporal y la glucosa sanguínea en ayuno de 16 h. Las ratas se seleccionaron de manera aleatoria, y en cada caja fueron colocadas 2 a 3 ratas, con acceso *ad libitum* a alimento y agua.

**Medición de peso corporal.** Las ratas de ambos experimentos se pesaron cada semana desde el inicio del experimento. Esto se realizó en una balanza (Ohaus) para animales propiedad del bioterio del IIB.

**Modelo experimental de diabetes:** A las ratas se les administró nicotinamida (87.5 mg/kg de peso corporal) vía intraperitoneal, disuelta en solución salina al 0.9%. Después de 15 min se les inyectó estreptozotocina (STZ) (90 mg/kg de peso) vía intraperitoneal, disuelta en una solución buffer de citratos 0.1 M (pH 4.5) preparada justo al momento. A las ratas control se les administró igual volumen de

la solución salina sin nicotinamida y solución de buffer de citratos siguiendo el mismo orden y tiempos.

**Obtención de suero.** Al inicio del tratamiento con biotina o PBS, antes de la inducción de diabetes y una vez a la semana durante las cuatro semanas después del desarrollo de diabetes, se midió la glucosa sanguínea. Las ratas fueron ayunadas por 16 horas (de las 18:00 a las 11:00 del día siguiente), se anestesiaron con Sevorane y se obtuvo sangre por punción del plexo intraorbital retrobulbar y la sangre fue recolectada en un tubo eppendorf de 1.5 mL. Se recolectaron aproximadamente 700  $\mu$ L de sangre que se dejaron a temperatura ambiente. Posteriormente la sangre se centrifugó a 10 000 rpm durante 8 min a 4°C y se obtuvo el suero. El suero de cada animal se refrigeró a -20°C hasta su análisis.

**Medición de glucosa en sangre.** La glucosa sanguínea se midió colocando una gota de sangre en un glucómetro (Medisense Optium Xceed Abbot, CA, USA) y mediante la reacción de la glucosa oxidasa proporciona la concentración de dicho metabolito.

**Prueba de tolerancia a la insulina:** Esta prueba refleja la sensibilidad a la insulina y mide la captura de glucosa principalmente en el músculo. La prueba se realizó en ratas alimentadas ad libitum, se les administró insulina (1 U/kg de peso corporal) intraperitoneal (IP) y se midió la glucosa en una gota de sangre obtenida de la cola a los 0, 15, 30 y 60 min después de la inyección de la hormona. La prueba fue realizada entre las 11:00 y las 14:00 h (Goren et al. 2004, Vital et al. 2006).

**Curva de tolerancia a la glucosa:** Esta prueba refleja la acción biológica de la insulina secretada por la estimulación de glucosa, en la captura de glucosa en músculo y grasa, además de la inhibición de la gluconeogénesis hepática. Las ratas diabéticas pretratadas con biotina durante cuatro semanas fueron

mantenidas en ayuno por 16 h. Se obtuvo una muestra de sangre, por medio de una incisión en la cola del animal para determinar el tiempo 0. Después de la obtención de la muestra de sangre en ayunas, se les administró solución de glucosa al 10 % (2 g/kg de peso) por vía intraperitoneal, y a los min 15, 30, 60 y 120 después de la inyección se midió la glucosa. La medición de glucosa se realizó utilizando un glucómetro automático (Glucómetro Medisense Optium Xceed).

**Medición de cuerpos cetónicos:** La medición de cuerpos cetónicos se hizo, mediante una incisión en la cola de la ratas, de donde se obtuvo una gota de sangre que fue colocada en una tira reactiva para medir cuerpos cetónicos (Glucómetro MediSense Optium Xceed). Las tiras de prueba de cetona  $\beta$  son biosensores que miden el Beta-hidroxibutirato ( $\beta$ -OHB), fisiológicamente la más importante de los tres tipos de cuerpos cetónicos que se encuentran en la sangre. Un biosensor electroquímico es un dispositivo químico que responde a cambios específicos en el potencial o en la corriente eléctrica como consecuencia de la presencia de una especie química que interactúa con él.

Para aumentar la selectividad de estos dispositivos se utilizan elementos bioquímicos o biológicos (enzimas, anticuerpos, ácidos nucleicos, células, tejidos, microorganismos) como elementos sensores. Estos biosensores necesitan de un elemento interno sensible a la interacción elemento sensor-analito y que transporta una señal hasta un dispositivo de medida y procesamiento de la información capturada (transductor electroquímico).

Cuando se aplica la muestra de sangre a la tira de prueba, el  $\beta$ -OHB presente en la sangre reacciona con los productos químicos presentes en la tira de prueba (biosensor), produciendo una pequeña corriente eléctrica. Esta corriente se puede medir y se transduce, para luego aparecer el resultado en el monitor. La intensidad de la corriente depende de la concentración de  $\beta$ -HOB presente en la muestra de sangre.

**Análisis del páncreas:** Al final del experimento las ratas fueron sacrificadas con una inyección IP de pentobarbital sódico, y fue disecado el páncreas para realizar un análisis inmunohistoquímico.

Los páncreas de las ratas fueron colocados en una solución de paraformaldehído al 4% (paraformaldehído en polvo disuelto en buffer de sales) para su fijación a una temperatura de 4°C.

Posterior a la fijación, los páncreas fueron lavados con agua corriente durante 2 h y después fueron deshidratados en alcoholes con distintas concentraciones con el siguiente orden: etanol al 50, 70, 80, 90 y 96 %, alcohol absoluto, alcohol xilol y xilol. Después de este proceso se embebieron en parafina (Paraplast 58-60 °C) dentro de moldes de plástico.

Con los páncreas embebidos en los bloques de parafina, se realizaron con un microtomo, 3 cortes de 5 micras cada uno, obtenidos de la porción de la cola del páncreas, que fueron montados en la laminilla de vidrio para obtener la preparación histológica.

Para comenzar con la inmunohistoquímica, las preparaciones histológicas se colocaron en un horno a 60 °C para ser desparafinados e inmediatamente después fueron colocados en los alcoholes pero en un orden contrario al de la deshidratación. Al final de la técnica de los alcoholes, las preparaciones fueron lavadas con PBS.

Para iniciar la inmunohistoquímica, los cortes fueron incubados en TBS con tritón al 0.3% y suero normal de cabra durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron toda la noche con el anticuerpo contra insulina (desarrollado en cobayo, dilución 1:1000 marca ICN) a una temperatura de 4 °C. Al día siguiente se agregó el anticuerpo secundario acoplado a fluoresceína FITC (1:50) anti-cobayo para detectar insulina y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó el anticuerpo contra glucagon (desarrollado en ratón, dilución 1:5000 marca SIGMA) y se dejó incubar a 4 °C durante 4 h.

Después se incubó durante 2 h con el anticuerpo secundario acoplado a CY5 (1:50) para detectar glucagon.

Finalmente las preparaciones histológicas fueron observadas en el microscopio confocal (Axioplan 2 Imaging Zeiss) del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y editadas con el programa PASCAL.

El FITC fue excitado con una longitud de onda de 494 nm, mientras que CY5 fue excitado a 650 nm de longitud de onda.

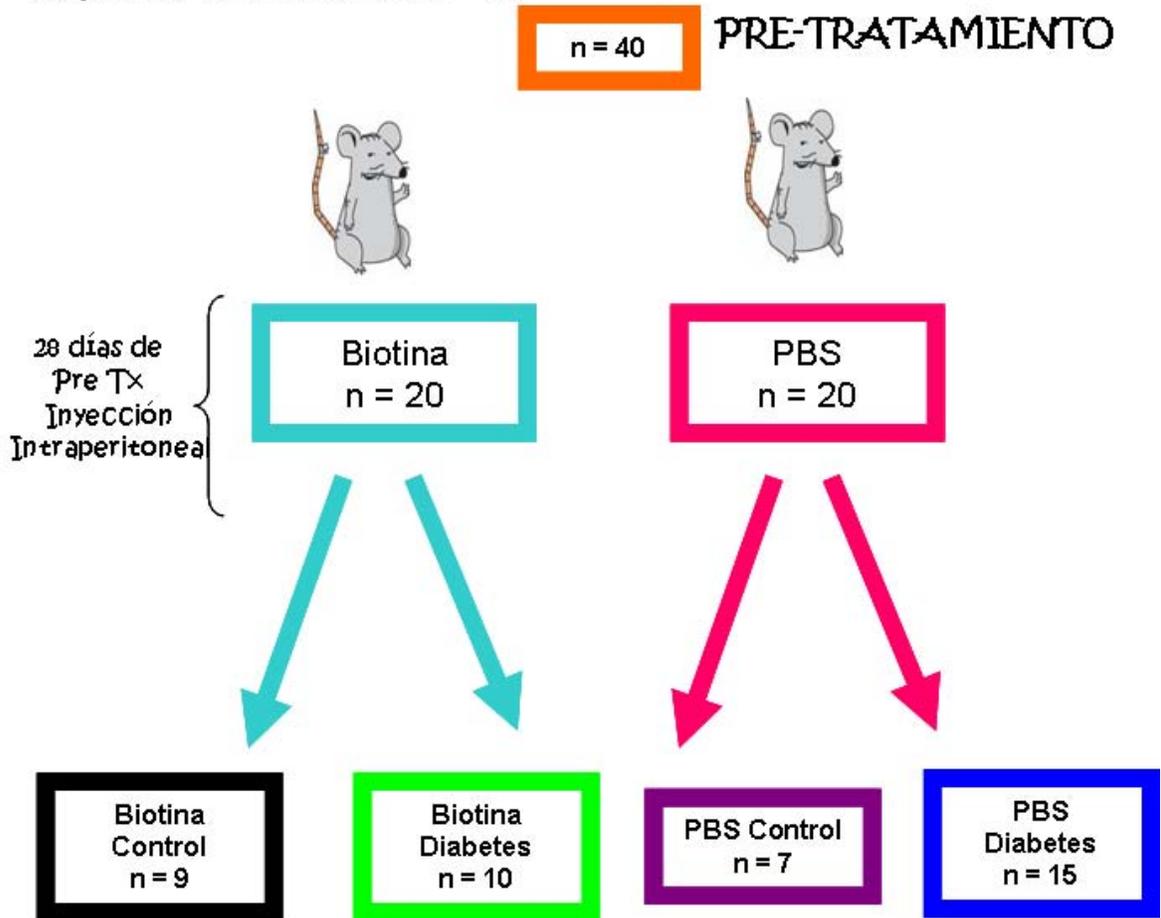
**Análisis estadístico:** los datos son presentados como la media  $\pm$  error estándar, las diferencias significativas fueron evaluadas con pruebas de ANOVA, con un valor de significancia  $p < 0.05$ . Para todas las pruebas estadísticas se utilizó el programa STAT VIEW versión 4.5 para Windows 1992-1997.

### ***Modelo Experimental:***

El objetivo fue determinar si el pretratamiento con biotina durante 28 días tiene un efecto protector previo en el desarrollo de diabetes inducida por estreptozotocina atenuada con nicotinamida. Para cumplir con este objetivo se trabajó con 40 ratas, que se dividieron en 2 grupos de 20 ratas cada grupo: uno de ellos se inyectó vía intraperitoneal (IP) con biotina a una dosis de 2 mg/kg y el otro con PBS durante 28 días. Después de las 4 semanas de tratamiento, 10 ratas del grupo tratado con biotina (Biotina- Diabetes) y 15 ratas del grupo tratado con PBS (PBS-Diabetes) fueron inyectadas IP con nicotinamida (87.5 mg/kg) y estreptozotocina (90 mg/kg) para inducir diabetes. La otra parte de cada grupo recibió por vía IP buffer de citratos, que es el vehículo donde es disuelta la STZ (Biotina- control y PBS-control). Antes de la inducción de diabetes y una vez a la semana en las siguientes cuatro semanas después de la inducción, se obtuvieron muestras de sangre y se obtuvo el suero de donde se analizaron las concentraciones sanguíneas de glucosa, además se analizaron parámetros como el peso corporal y la sobrevivencia en cada grupo. A la tercer semana después de la inducción se realizaron la curva de tolerancia a la glucosa y la prueba de sensibilidad a la insulina en las condiciones que marcan ambas pruebas.

Transcurridas las cuatro semanas después de la inducción se realizó el sacrificio de los animales por medio de una inyección vía IP de Anestesal (anestésico pentobarbital sódico), para después hacer la disección del páncreas.

## DISEÑO EXPERIMENTAL:



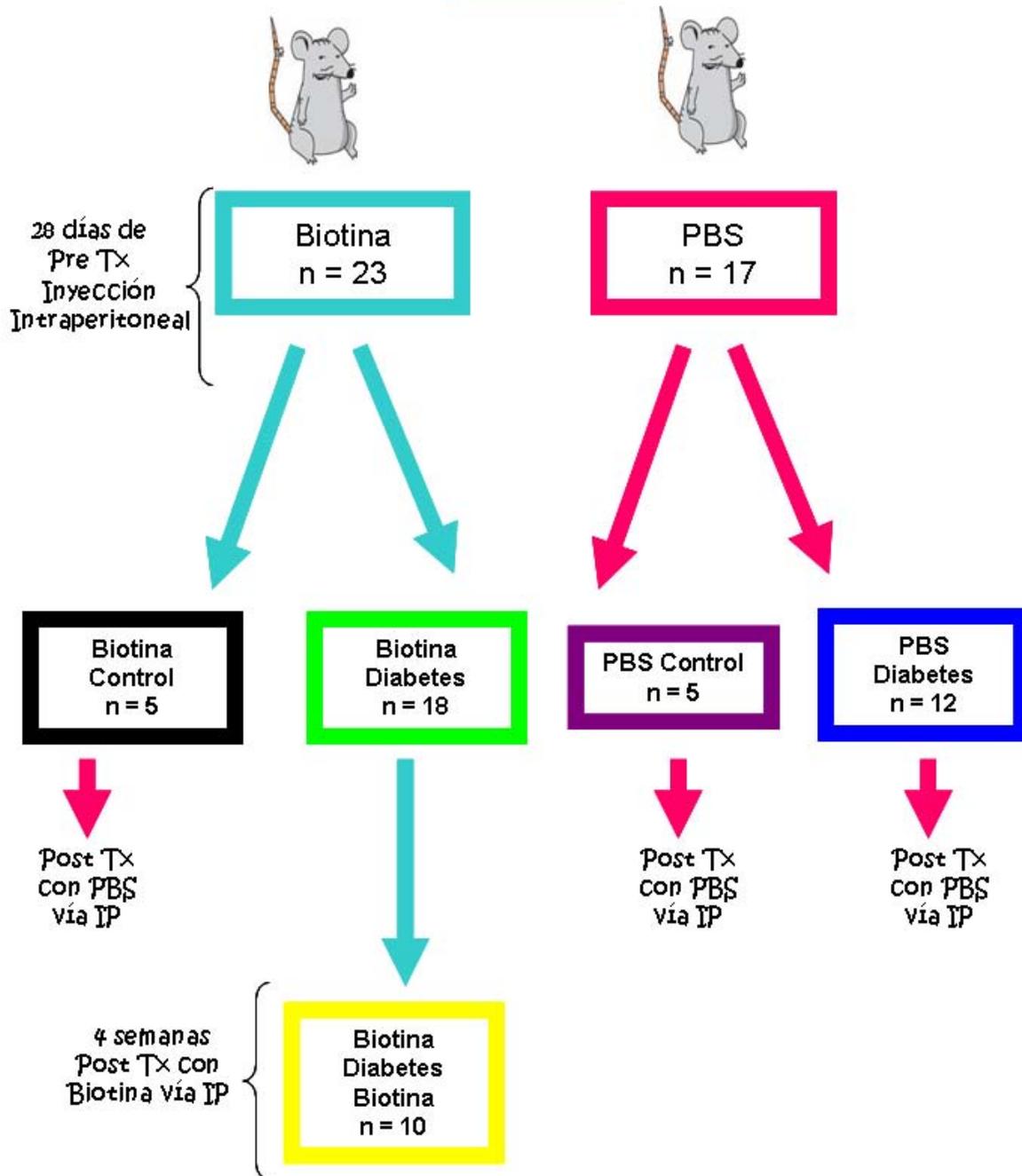
Nuestro siguiente objetivo fue analizar si la administración continua de biotina aun después de la inducción de diabetes evita un daño mayor a las células  $\beta$  por la acción tóxica de la STZ. Para lo cual a un grupo de ratas que recibió el pretratamiento durante 28 días antes de la inducción de diabetes, se le siguió tratando con biotina aún después de la inducción (Biotina-Diabetes-Biotina). Se utilizaron 40 ratas de las cuales al inicio del experimento se dividieron en dos grupos, un grupo de 23 ratas fue tratado vía IP durante 28 días con biotina, mientras que las ratas restantes, es decir, el grupo control fue inyectado con PBS. Después de las 4 semanas de tratamiento se llevo a cabo la inducción de diabetes, 18 ratas del grupo tratado con biotina (Biotina-Diabetes) y 12 ratas

tratadas con PBS (PBS-Diabetes) fueron inyectadas con nicotinamida (87.5 mg/kg) y 15 minutos después con STZ (90 mg/kg), mientras que las ratas restantes de cada grupo fueron inyectadas con el vehículo como grupos control (Biotina-control y PBS-control). Durante 4 semanas después de la inducción de diabetes, del grupo de ratas que ya había recibido biotina en el pretratamiento, 10 ratas continuaron recibiendo biotina IP post inducción (Biotina-Diabetes-Biotina). Después de la inducción de la diabetes se obtuvieron muestras sanguíneas de la cola de ambos grupos de ratas, tanto de las que recibieron biotina como pretratamiento (Biotina-Diabetes), como de las que recibieron PBS (PBS-Diabetes) y se determinaron los cuerpos cetónicos por medio de tiras reactivas. Antes de la inducción y durante las 4 semanas posteriores que se continuó con el tratamiento se obtuvieron muestras de sangre, para realizar mediciones de algunos parámetros metabólicos.

# DISEÑO EXPERIMENTAL:

n = 40

POST-TRATAMIENTO



## Resultados

En un modelo experimental de diabetes inducido por nicotinamida/estreptozotocina, analizamos si la biotina es capaz de proteger el desarrollo de diabetes.

### **Desarrollo de Diabetes.**

El análisis de las concentraciones de glucosa en la sangre demuestran (**Figura 1**) que en los grupos inyectados con nicotinamida+STZ, tanto las ratas Biotina-Diabetes como PBS-Diabetes, desarrollaron hiperglucemia (valores mayores o iguales a 200 mg/dL). En el grupo Biotina-control el pretratamiento durante 28 días con biotina no modificó las concentraciones de glucosa.

### **La sobrevivencia de los animales.**

Una diferencia notable entre los dos grupos se encontró en la sobrevivencia de los animales diabéticos. En el grupo Biotina-Diabetes observamos que el 90% sobrevivieron durante las 4 semanas que duró la experimentación, en tanto que en el grupo PBS-Diabetes el porcentaje de sobrevivencia registrado fue del 65% a la segunda semana después de la inducción, y al final del experimento este porcentaje disminuyó hasta el 35% (**Figura 2**). En el grupo Biotina-control la biotina no modificó la sobrevivencia de los animales.

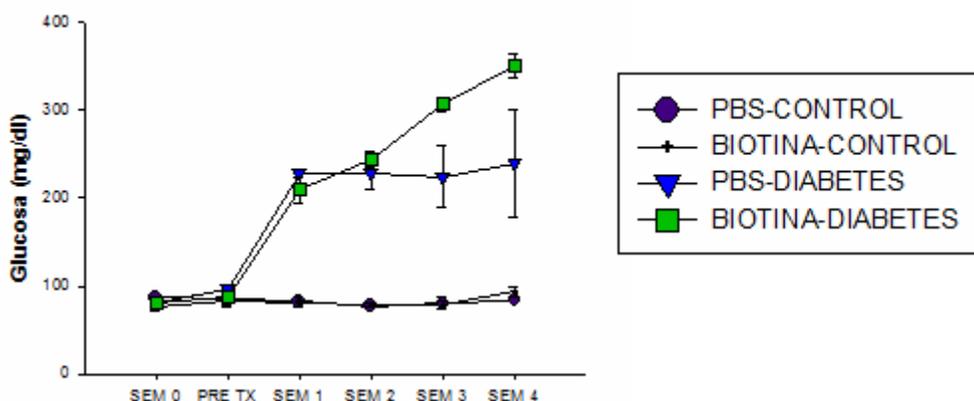


Figura 1. Efecto de la biotina sobre la hiperglucemia.

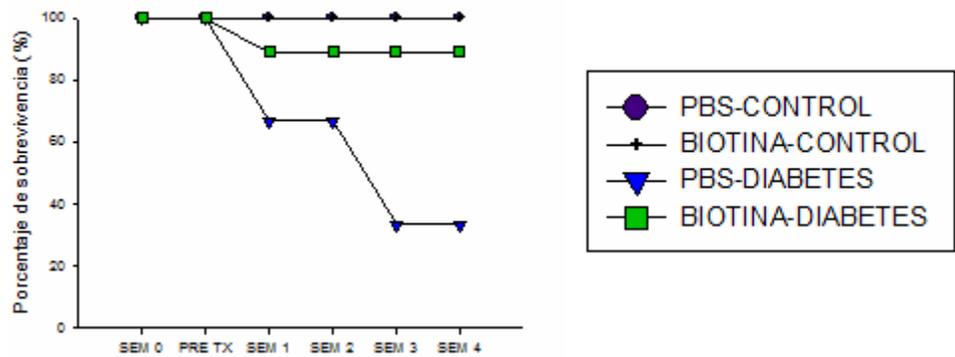


Figura 2. La sobrevivencia de los animales.

### ***Peso corporal.***

Durante los 28 días de pretratamiento con biotina o con PBS no se observaron diferencias significativas en la ganancia de peso entre los 4 grupos experimentales (Figura 3). Posterior a la inducción de DM con nicotinamida+STZ, los animales diabéticos perdieron aproximadamente 25% de peso. No se observó diferencia en la pérdida de peso entre los grupos Biotina-Diabetes y PBS-Diabetes. Los grupos Biotina-Control y PBS-Control se observó que continuaron con su patrón normal de crecimiento.

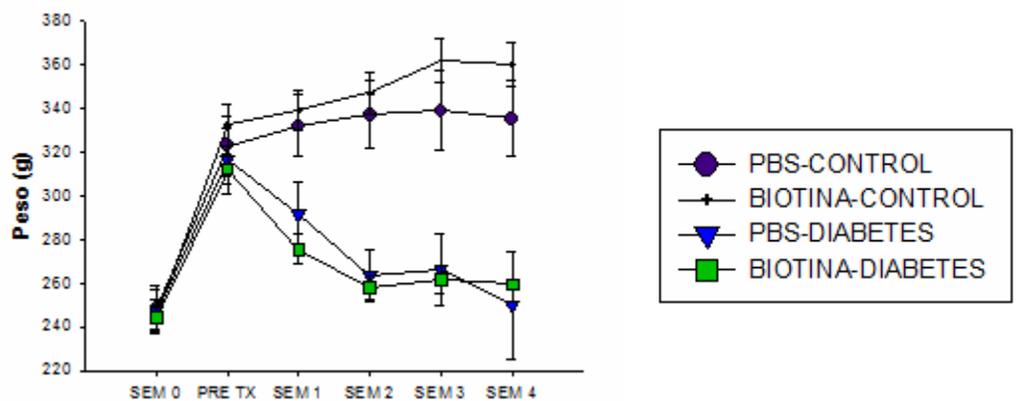


Figura 3. El peso corporal de los animales.

### **Prueba de tolerancia a la glucosa.**

Esta prueba refleja tanto la secreción de la insulina después de un estímulo con glucosa, como la acción de la insulina en la captura de ésta en los tejidos periféricos principalmente en el músculo, tejido que almacena más del 85% de la glucosa en estas condiciones (Saltiel y Kahn, 2001). La prueba se realizó con el fin de determinar si el pretratamiento con biotina modifica la homeostasis de la glucosa. Los resultados encontraron que no hubo diferencias en la curva de tolerancia a la glucosa entre los grupos control (**Figura 4**). En el grupo de las ratas diabéticas, los niveles de glucosa al inicio de la prueba se encontraron más elevados en las ratas Biotina-Diabetes con respecto al grupo PBS-Diabetes. No se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de glucosa a los 30, 60 y 120 minutos post inyección del azúcar entre los animales Biotina-Diabetes y PBS-Diabetes. La glucemia en ambos grupos de ratas diabéticas fue significativamente mayor con respecto a los dos grupos de ratas control (**Figura 4**).

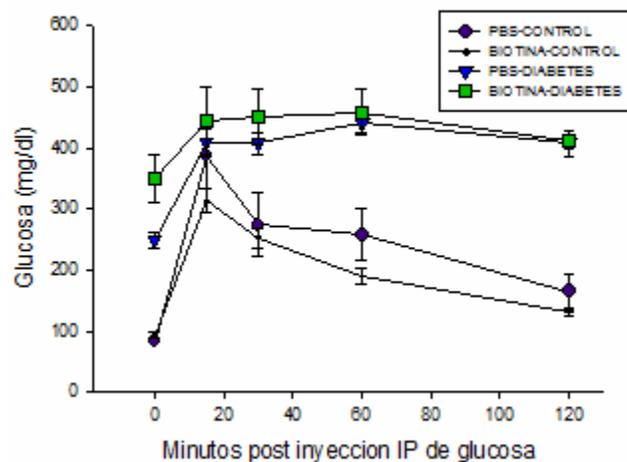


Figura 4. Curva de tolerancia a la glucosa. Los datos representan media y error.\* $p \leq 0.05$ .

### **Prueba de sensibilidad a la insulina.**

Esta prueba refleja la sensibilidad a la insulina de los tejidos periféricos dependientes de insulina en captar la glucosa sanguínea tras la administración de una dosis farmacológica de la hormona. Los resultados obtenidos demostraron que los grupos control, presentaron curvas de tolerancia a la insulina típicas, no habiendo diferencias significativas entre las ratas Biotina-Control y PBS-Control (**Figura 5**). Se observaron anomalías en las curvas de sensibilidad a la insulina en las ratas diabéticas: a los 15 minutos de la prueba, tanto en las ratas Biotina-Diabetes como en las PBS-Diabetes, no presentaron disminuciones en las concentraciones de glucosa. Posterior a este tiempo, en las ratas PBS-Diabetes, se observó una reducción en la glucemia, alcanzándose concentraciones de glucosa similares a la de los grupos control; en tanto que el grupo Biotina-Diabetes fue refractario a la acción de la insulina, no observándose reducciones en las concentraciones de glucosa ni a los 30 ni a los 120 minutos (**Figura 5**).

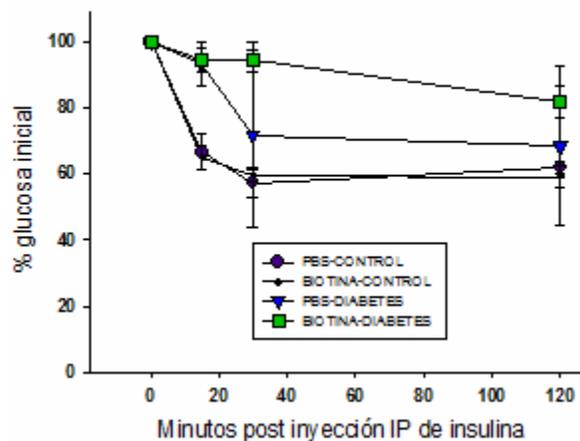


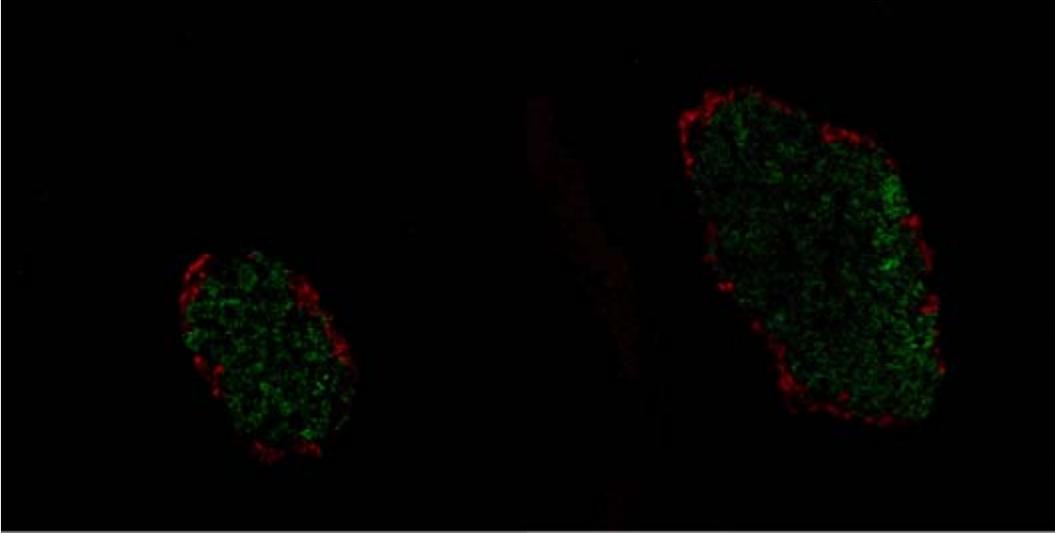
Figura 5. Curva de sensibilidad a la insulina. Los datos representan media y error.

\* $P \leq 0.05$

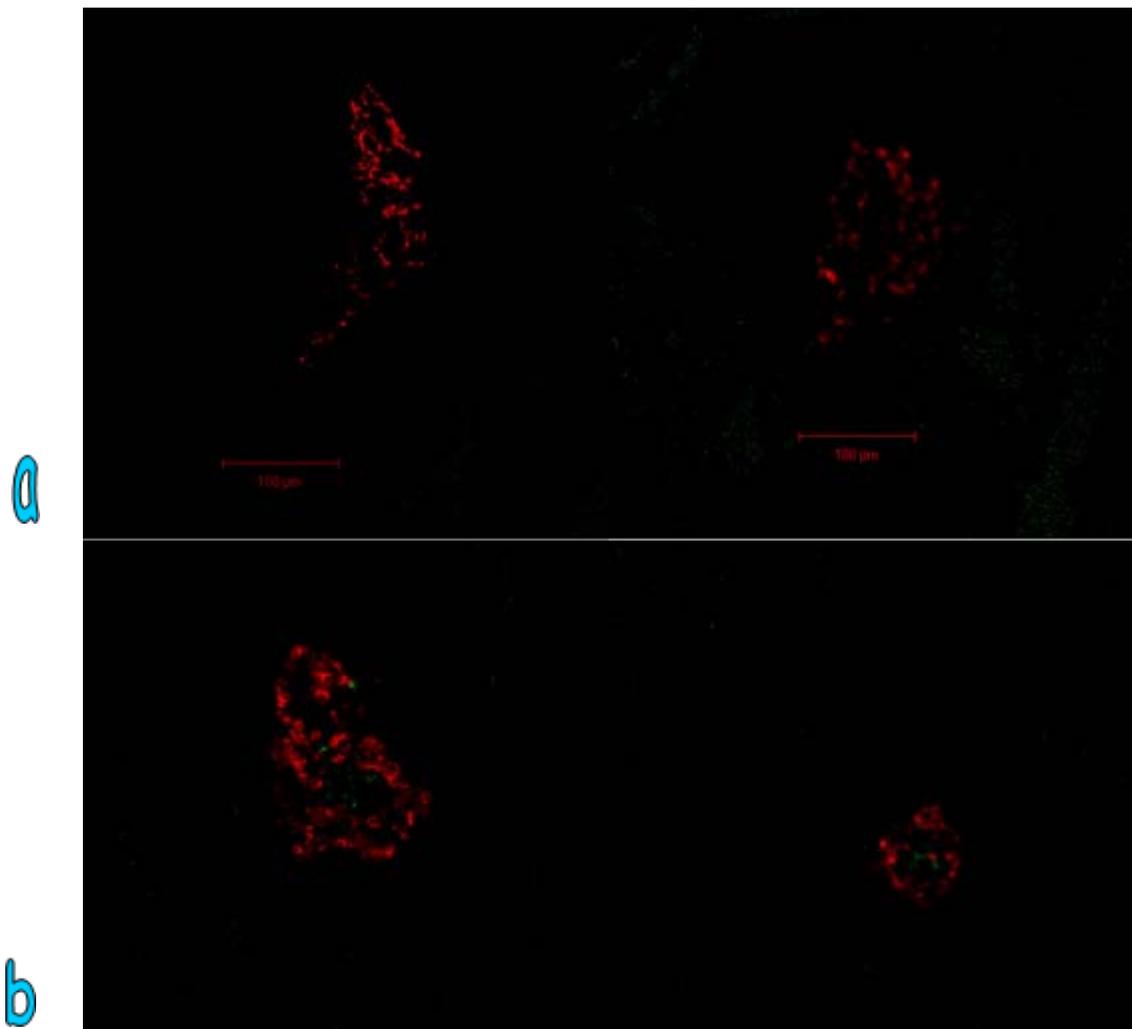
**Morfología de los islotes pancreáticos.** También analizamos el efecto del pretratamiento con biotina sobre la morfología del islote pancreático. Después de cuatro semanas de la inducción de la diabetes con STZ y nicotinamida, se realizó la comparación de la estructura de los islotes pancreáticos entre el grupo de ratas control y las ratas diabéticas que recibieron o no el pretratamiento con biotina, por medio de una doble inmunohistoquímica de fluorescencia.

**Descripción de la distribución de los islotes en el corte de páncreas.** Los islotes pancreáticos de ratas control presentaron la forma típica redondeada con las células  $\beta$  al centro del islote y las células  $\alpha$  en la periferia (**Figura 6, panel A**).

En los cortes de páncreas de los animales diabéticos (Biotina-Diabetes y PBS-Diabetes), el número de islotes fue escaso y de estructura desorganizada. No obstante que el daño por la STZ fue visible en ambos grupos, existen algunas diferencias en el arreglo de las células entre los islotes en cada grupo. En los islotes de ratas diabéticas pretratadas con PBS (**Figura 6 panel B**) los islotes presentaron una forma alargada, de apariencia colapsada e indefinida. No se observó presencia de fluorescencia correspondiente a la insulina y las células  $\alpha$  en lugar de localizarse en la periferia el centro del islote, se encontraron al centro de éste ocupando el espacio que corresponde normalmente a las células  $\beta$ . Sin embargo en los islotes de las ratas diabéticas pretratadas con biotina (**Figura 6, panel B**) la mayoría de éstos asemejaron más la forma redondeada típica de un islote, se observaron todavía algunas células conteniendo insulina al centro del islote y las células  $\alpha$  se encontraron en la periferia del islote, lo que sugiere que la biotina preserva mejor a los islotes del daño producido por la estreptozotocina.



**Figura 6 panel A.** Inmunofluorescencia representativa de dos islotes pancreáticos de ratas control macho. Insulina en verde y glucagon en rojo.



**Figura 6 panel B.** Inmunofluorescencia representativa de dos islotes pancreáticos de ratas diabéticas control (a) y dos islotes de ratas diabéticas pretratadas con biotina (b) durante 4 semanas. Insulina en verde y glucagon en rojo.

En una segunda etapa del proyecto comparamos el efecto de la administración de biotina a diferentes tiempos de la inducción de diabetes. Para lo cual en un segundo lote de animales se adicionó un nuevo grupo experimental de ratas (Biotina-Diabetes-Biotina), que además de recibir el pretratamiento durante 28 días antes de la inducción de diabetes, continuó recibiendo una dosis de biotina después de la inducción.

### ***Desarrollo de diabetes.***

El análisis de las concentraciones de glucosa en la sangre mostró (**Figura 7**) que en las ratas tratadas con biotina únicamente desarrolló hiperglucemia (glucemia en ayuno > 200 mg/dL) el 80% de los animales, mientras que en el grupo control el 100% de los animales desarrolló la enfermedad (Tabla 1). Por lo tanto, el pretratamiento con biotina durante 28 días sí protege del desarrollo de diabetes cuando las ratas reciben nicotinamida+STZ.

<b>Desarrollo de diabetes</b>	
PBS 100%	Biotina 80%

**Tabla 1. Desarrollo de diabetes en ratas.**

Como era esperado, los grupos pretratados con PBS o con biotina que no recibieron la nicotinamida+STZ (grupos control) no desarrollaron hiperglucemia.

### ***La sobrevivencia de los animales.***

Al igual que en el lote anterior, se observó una diferencia notable en la sobrevivencia de los animales. En el grupo Biotina-Diabetes observamos mayor sobrevivencia que en el grupo PBS-Diabetes. Interesantemente, entre los grupos pretratados con biotina, las ratas Biotina-Diabetes, mostraron mayor sobrevivencia

que los animales (Biotina-Diabetes-Biotina) que continuaron con el tratamiento con biotina (Figura 8). Del mismo modo en el grupo Biotina-Control la biotina per se no modificó la sobrevivencia de los animales.

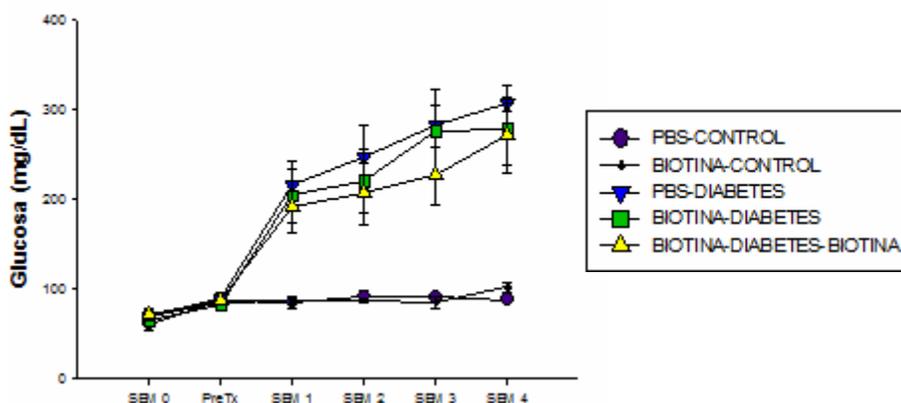


Figura 7. Efecto de la biotina sobre la hiperglucemia

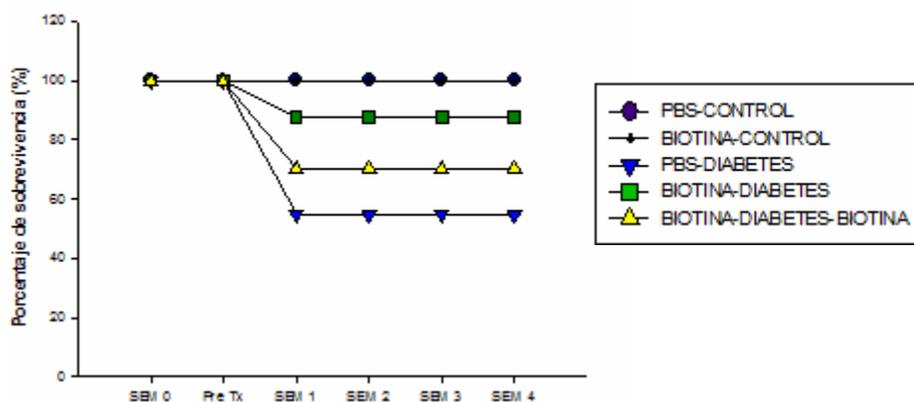


Figura 8. La sobrevivencia de los animales.

### ***El peso corporal.***

Durante los 28 días de pretratamiento con biotina o con PBS no se observaron diferencias significativas en la ganancia de peso entre los 5 grupos experimentales (**Figura 9**). Posterior a la inducción de diabetes, los animales diabéticos perdieron peso. A diferencia de los resultados en el experimento anteriormente descrito, observamos diferencias significativas ( $*p < 0.05$ ) en peso entre los grupos de

animales Biotina-diabetes y PBS-Diabetes, en estos últimos la disminución de peso fue mucho más pronunciada que en las ratas Biotina-Diabetes (**Figura 9**). No se observaron diferencias significativas en la pérdida de peso entre las ratas Biotina-Diabetes y Biotina-Diabetes-Biotina.

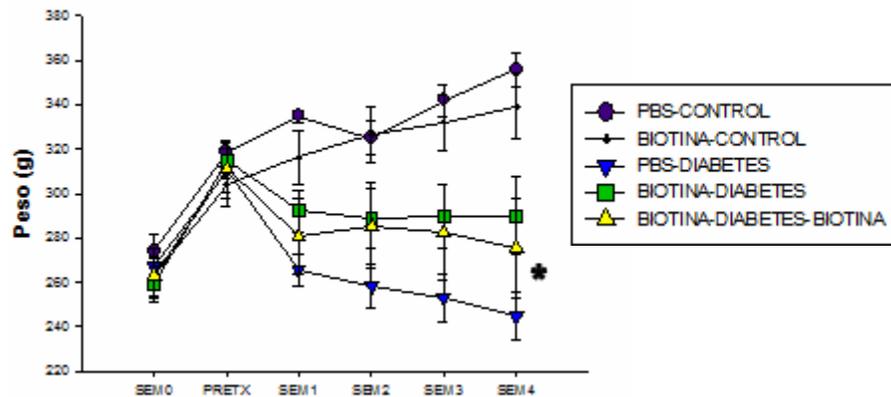
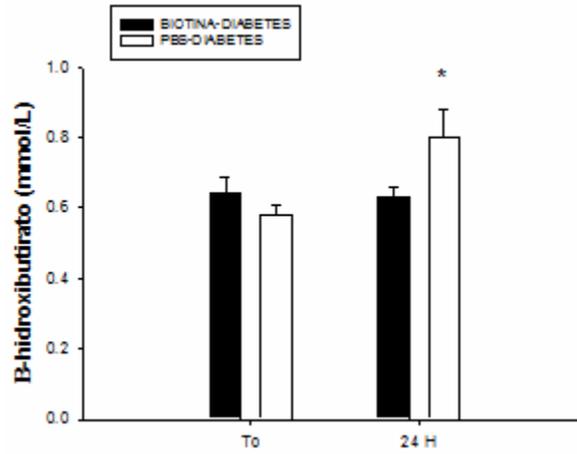


Figura 9. El peso corporal de los animales.

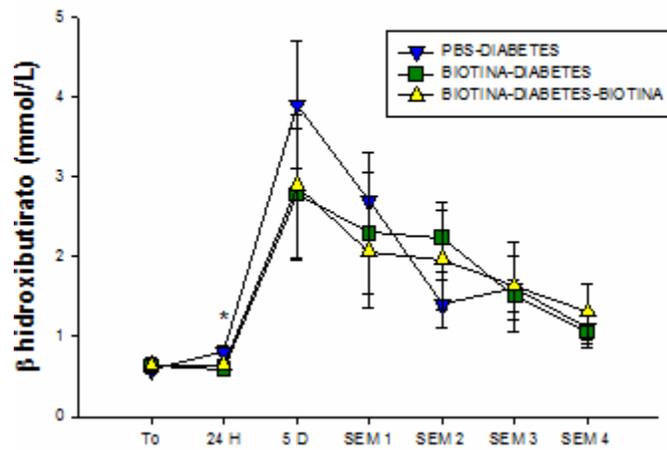
### ***Concentración de cuerpos cetónicos.***

Dado que la muerte en el estado diabético agudo se debe a la formación de cuerpos cetónicos, evaluamos si el aumento en la sobrevivencia observada en las ratas tratadas con biotina modifica las concentraciones de éstos. En la figura 10 panel A, se observa que la formación de cuerpos cetónicos a las 24 horas después de la inducción de diabetes fue significativamente ( $*p<0.05$ ) menor en las ratas Biotina-Diabetes con respecto a las ratas PBS-Diabetes. Este efecto fue similar entre las ratas Biotina-Diabetes-Biotina y las que únicamente recibieron el pretratamiento (Biotina-Diabetes). A los 5 días posteriores a la inyección de Nicotinamida+STZ, encontramos que las ratas PBS-Diabetes, presentaron mayores concentraciones de cuerpos cetónicos que los animales Biotina-Diabetes, sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Figura 10 panel B). En este tiempo tampoco observamos diferencias en las concentraciones de los cuerpos cetónicos entre los animales biotina-diabetes-biotina y biotina-diabetes. Posterior a los 5 días de la inducción de diabetes no hubo diferencias

significativas en las concentraciones de cuerpos cetónicos entre ninguno de los tres grupos.



**Panel A**



**Panel B**

Figura 10. Efecto de la biotina sobre las concentraciones de cuerpos cetónicos ( $\beta$ -hidroxibutirato) en ratas diabéticas. \* $p \leq 0.05$ .

## ***Discusión***

En este trabajo de Tesis demostramos que en un modelo experimental de diabetes inducida por estreptozotocina atenuada con nicotinamida en ratas, el pretratamiento con biotina [2 mg/kg peso] durante 4 semanas disminuye la probabilidad de desarrollar diabetes, aumenta la sobrevivencia y disminuye las concentraciones de cuerpos cetónicos en las que si desarrollan diabetes. Dado que la muerte en el estado diabético agudo se produce por cetoacidosis, la reducción de la mortalidad observada en las ratas tratadas con biotina podría estar ligada a efectos de la biotina sobre el metabolismo de los cuerpos cetónicos, impidiendo la formación de éstos.

También observamos menor daño en la morfología del islote pancreático y un pequeño remanente de células conteniendo insulina en los islotes de las ratas tratadas con biotina. La biotina y la estreptozotocina coinciden en muchos de sus efectos de manera opuesta. Las acciones tóxicas de la estreptozotocina sobre las células beta pancreáticas comprenden disminuciones de ATP, en tanto que existen evidencias que éste nucleótido se aumenta con el tratamiento de dosis farmacológicas de biotina. En el islote pancreático estudios realizados por Sone y su grupo de trabajo (Laychock et al. 1991) demostraron que islotes estimulados con 100  $\mu$ M de biotina aumentan la producción de ATP. Igualmente, en nuestro laboratorio encontramos (Vilches, enviado a publicación) que islotes incubados con 1  $\mu$ M de biotina aumentan su contenido de ATP. Estudios en el hígado también sugieren que la biotina aumenta el ATP. Investigaciones por Dakshinamurti encontraron que la biotina aumenta la actividad y expresión de enzimas glucolíticas (Dakshinamurti et al. 1970, Zhang et al. 1997, Dakshinamurti et al. 1970, Dakshinamurti y Li 1994). Por otro lado, Sone et al. 2004, encontraron que en mitocondrias hepáticas, el estado tres de la cadena respiratoria aumenta en respuesta a biotina. Nuestras observaciones de que existe menor daño en la morfología de los islotes en las ratas diabéticas tratadas con biotina podrían estar ligadas a menor depleción de ATP y por ende un menor daño causado por la STZ,

lo que podría ocasionar una menor pérdida de la morfología de los islotes, con respecto a los islotes de los animales no tratados con biotina. Esta posibilidad será estudiada en el futuro en el laboratorio.

Como se señaló en la sección de antecedentes, diversos estudios en humanos y en animales han encontrado que dosis farmacológicas de biotina reducen la hiperglucemia (Coggeshal et al. 1985, Maebashi et al. 1993, Zhang et al. 1997, Reddi et al. 1988). En nuestros estudios no encontramos reducciones en las concentraciones de glucosa en respuesta a la administración de biotina, este efecto podría deberse a la intensa resistencia a la insulina que observamos en las ratas diabéticas pretratadas con biotina. La razón de la resistencia a la insulina en este grupo de animales es difícil de explicar ya que existen reportes por nosotros y otros grupos que sugieren que el tratamiento con dosis farmacológicas de biotina aumentan la sensibilidad a la hormona en individuos y en modelos experimentales de resistencia a la insulina (Báez- Saldaña y Zendejas et al. 2004, Reddi et al. 1988). También hemos encontrado que la biotina no afecta la sensibilidad a la insulina en modelos experimentales que no presentan resistencia a la hormona (Vital et al. 2006), esta falta de efecto también se observa en los resultados de este trabajo, ya que en las ratas que no recibieron la inyección de nicotinamida+STZ no se observó diferencia en la curva de tolerancia a la insulina entre los animales tratados con PBS y los tratados 28 días con biotina. El efecto de resistencia que encontramos en las ratas diabéticas podría ser inherente a éste modelo experimental, sin embargo se requerirán otros estudios para determinar los mecanismos que producen resistencia a la insulina en los animales diabéticos tratados con biotina.

En resumen, en un modelo experimental de diabetes inducida por estreptozotocina/ nicotinamida en la rata, encontramos que el pretratamiento con biotina reduce la mortalidad en los animales y reduce el daño de los islotes pancreáticos. Este modelo será útil para abordar los mecanismos moleculares mediante los cuales la biotina produce estas acciones.

## **Conclusiones**

- La biotina tiene un efecto protector parcial sobre el desarrollo de diabetes inducida con estreptozotocina bajo la protección de nicotinamida.
- La biotina disminuye la mortalidad en las ratas diabéticas.
- La biotina disminuye la producción de cuerpos cetónicos (cetogénesis hepática), posiblemente sea este mecanismo el que participe en el aumento en la sobrevivencia de los animales tratados con biotina.
- La morfología de los islotes pancreáticos de ratas diabéticas pretratadas con biotina sugieren un menor daño tanto morfológico como histológico, no obstante se debe realizar un estudio más profundo y detallado para establecer de una mejor manera el efecto que pudiese tener la biotina sobre la anatomofisiología pancreática.

## Referencias

- ADA, Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*, 2006. 29(supplement 1): p. S43-S48.
- Arner P. 2005 Insulin Resistance in Type 2 diabetes. *Current Mol. Med.*5: 333-9.
- Báez-Saldaña A., Zendejas-Ruiz I., Revilla-Monsalve C., Islas-Andrade S., Cárdenas A., Rojas-Ochoa A., Vilches A., Fernández-Mejía C. 2004 Effects of biotin on pyruvate carboxylase, acetyl-CoA carboxylase, propionyl-CoA carboxylase, and markers for glucose and lipid homeostasis in type 2 diabetic patients and nondiabetic subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 79(2):238-243.
- Barthel A., Schmolli, D. 2003 Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285, E685-692.
- Bishop A., Polak J. The anatomy, organization and ultrastructure of the islets of Langerhans en *Textbook of diabetes* 1. Third edition. Blackwell Publishing 2003. USA.
- Boden G., Shulman G.I. 2002 Free fatty acids in obesity and type-2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and b-cell dysfunction. *Eur. J. Clin. Invest.* 32 Suppl. 3, 14-23.
- Bogardus C., Lillioja S., Stona K., Mott D. 1984 Correlations between muscle glycogen synthase activity an in vivo insulin action in man. *J. Clin. Invest.* 73, 1185-1190.
- Bolli G.B., Fanelli C.G. 1999 Physiology of glucose counterregulation to hypoglycemia. *Endocrinol. Metab. Clin. North .Am.* 28: 467-93.
- Bolzán A., Bianchi M. 2002 Genotoxicity of Streptozotocin (Review) *Mutat. Res.* 512: 121-134.
- Borboni P., Magnaterra R., Rabino R.A., Staffolanni R., Porzio O., Sesti G., Fusco A., Mazzanti L., Lauro R., Marlier J.N.J.L. 1996 Effect of biotin on glucokinase activity, mRNA expression and insulin release in cultured B cell. *Acta Diabetol.* 33:154-8.
- Bouix O., Reynier M., Guintrand-Hugret R., Orsetti A. 1995 Protective effect of gamma-hydroxybutyrate and nicotinamide on low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice. *Horm. Metab. Res.* 27:216-20.
- Brownlee M. 2001 Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 414: 1134-45.

- Burkart V., Wang Z., Radons J., Heller B., Herceg Z., Wagner E., Kolb H. 1999 *Nature Med.* 5:314-19.
- Chapman-Smith A., Cronan J.E. Jr. 1999 The enzymatic biotinylation of proteins: a post-translational modification of exceptional specificity. *Trends Biochem. Sci.* 24:359-63.
- Chatterjee N., Kumar C., Ortiz A., Rubin S., Said H. 1999 Molecular mechanism of the intestinal biotin transport process. *Am. J. Physiol.* 277(46):605-613.
- Chauhan J., Dakshinamurti K.C. 1991 Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats. *J. Biol. Chem.* 266:10035-8.
- Chiarugi A. 2002 Poly (ADP-ribose) polymerase: killer or conspirator? The 'suicide hypothesis' revisited. *Trends pharmacol.* 23:122-129
- Cipriani G., Rapizzi E., Vannacci A., Rizzuto R., Chiarugi A. 2005 Nuclear poly (ADP-ribose) polymerase-1 rapidly triggers mitochondrial dysfunction. *J. Biol. Chem.* 280; 17227-34
- Cline G.W., Petersen K.F., Krssak M., Shen J., Hundal R.S., Trajanoski Z., Inzucchi S., Dresner A., Rothman D.L., Shulman G.I. 1999 Impaired glucose transport as a cause of decreased insulin-stimulated muscle glycogen synthesis in type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* 341, 240-246.
- Coggeshal J.C., Heggens J.P., Robson M.C. Beker H. 1985 Biotin status and plasma glucose in diabetes. *Ann. NY Acad. Sci.* 447:389-92.
- Cohen N., Thomas M. 1982 Biotin transport into fully differentiated 3T3-L1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 108(4): 1508-16.
- Collins J.C., Paietta E., Green R., Morell A.G., Stockert R.J. 1998 Biotin dependent expression of the asialoglycoprotein receptor in HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* 263: 11280-3.
- Cruz-Caudillo J., Sabatini S. 1995 Diabetic Hyperosmolar Síndrome. *Nephron.* 69: 201-10.
- Dakshinamurti K., Chauhan J. 1994 Biotin binding proteins. In: *Vitamin receptors: vitamins as ligands in cell communication.* EEUU: Cambridge University Press. p. 200-49.
- Dakshinamurti K., Cheah-Tan C. 1968 Liver glucokinase of the biotin deficient rat. *Can. J. Biochem.* 46(1): 75-80.

- Dakshinamurti K., Ho Chong Hong. 1970 Regulation of key hepatic glycolitic enzymes. *Enzymol. Biol. Clin.* 11(5): 423-8.
- Dakshinamurti K., Li W. 1994 Transcriptional regulation of liver phosphoenolpyruvate carboxykinase by biotin in diabetic rats. *Mol. Cell Biochem.* 132:127-132.
- Dakshinamurti K., Tarrago-Litvak L., Hong H.C. 1970 Biotin and glucose metabolism. *Can. J. Biochem.* 48(4): 493-500.
- De la Vega L., Stockert R. 2000 Regulation of the insulin and asialoglycoprotein receptors via cGMP-dependent protein kinase. *Am. J. Physiol - Cell Physiol.* 279:C2037-C2042.
- DeFronzo, R.A. 1988 The triumvirate:  $\beta$  cell, muscle, liver: a collusion responsible for NIDDM. *Diabetes* 37, 667-687.
- Dulin W.E., Wyse B.M. 1969 Reversal of streptozotocin diabetes with nicotinamide. *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.* 130:992-994
- Eizirik D., Sandler S., Sener A., Malaisse W.J. 1988 Defective catabolism of D-glucose and L-glutamine in mouse pancreatic islets maintained in culture after streptozotocin exposure. *Endocrinology* 123:1001-7.
- Final report on the safety assessment of biotin. 2001 *Int. Journ. of Toxic.* 20:1-12.
- Fitzgerald M.G., O'Sullivan D., Malins F. 1961 Fatal diabetic ketoacidosis. *B.M.J.* 1:247-50.
- Frayn K.N. 1986 Hormonal control of metabolism in trauma and sepsis. *Clin. Endocrinol.* 24: 577-99.
- Furukawa Y., Ohinata K., Ikai M., Maebashi M., Zhang H., Kimura S. 1995 Biotin-stimulated insulin secretion in biotin-deficient rats. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 18: 35-42.
- German, M. Lecture: Introduction to Diabetes, Type 1 [http://www.diabetes.ucsf.edu/EN/our\\_educators/michael\\_german\\_md/](http://www.diabetes.ucsf.edu/EN/our_educators/michael_german_md/)
- German, M. Lecture: Pathophysiology of Type 2 Diabetes <http://germanlab.ucsf.edu/diabetes.html>
- Goren H.J., Kulkarni R.N., Kahn C.R. 2004 Glucose homeostasis and tissue transcript content of insulin signaling intermediates in four inbred strains of mice: C57BL/6, C57BLKS/6, DBA/2, and 129X1 *Endocrinology* 145(7):3307-23.

- Hiriart, M. El páncreas endocrino. Tomado de Fisiología Médica. René Drucker Colín, compilador. 2002. El manual moderno.
- Hosokawa M., Dolci W., Thorens B. 2001 Differential sensitivity of GLUT1- and GLUT2-expressing beta cells to streptozotocin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289:1114-1117
- Hymes J., Wolf B. 1996 Biotinidase and its roles in biotin metabolism. *Clin. Chem. Acta* 225: 1-11.
- Ishaque A., Al-Rubeai M. 2002 Role of vitamins in determining apoptosis and extent of suppression by bcl-2 during hybridoma cell culture. *Apoptosis* 7:231-239
- Jarret, J.R., The epidemiology of diabetes mellitus. *Insulin-dependent diabetes mellitus. Textbook of diabetes*, ed. G.W. Pickup J. 1991, Oxford: Blackwell Science. 47-53.
- Jitrapakdee S., Wallace J.C. 2003 The biotin enzyme family: conserved structural motifs and domain rearrangements. *Curr. Protein Pept. Sci.* 4(3): 217-29.
- Klip A., Paquet M.R. 1990 Glucose transport and glucose transporters in muscle and their metabolic regulation. *Diabetes Care* 13, 228-243.
- Kohner E., Stratton I.M., Aldington S. 2001 Relationship between the severity of retinopathy and progression in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabet. Med.* 18:178-84.
- Koutsikos D., Fourtounas C., Kapetanaki A., Agroyannis B., Tzanatos H., Rammos G., Kopelias I., Bosiolis B., Bovoleti O., Darema M., Sallum G. 1996 Oral glucose tolerance test after high-dose i.v. biotin administration in normoglycemic hemodialysis patients. *Renal Failure* 18, 131-78.
- Koutsikos D., Agroyannis B., Tzanatos-Exarchou H. 1990 Biotin for diabetic peripheral neuropathy. *Biomed. Pharmacother.* 44, 511-4.
- Lamhonwah A.M., Quan F., Gravel R.A. 1987 Sequence homology around the biotin-binding site of human propionyl-CoA carboxylase and pyruvate carboxylase. *Arch. Biochem. Biophys.* 254:631-6.
- Laychock S.G., Modica M.E., Cavanaugh C.T. 1991 L-arginine stimulates cyclic guanosine 3',5'-monophosphate formation in rat islets of Langerhans and RINm5F insulinoma cells: evidence for L-arginine: nitric oxide synthase. *Endocrinology* 129: 3043-52.

- Like A., Rossini A. 1976 Streptozotocin induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science* 193: 415-417.
- Mc Garry J., Foster D. 1980 Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production. *Annu. Rev. Biochem.* 49: 395-420
- Maebashi M., Makino Y., Furukawa Y., Ohinata K., Kimura S., Takao S. 1993 Therapeutic evaluation of the effect of biotin on hyperglycemia in patients with non-insulin diabetes mellitus. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 14: 211-18.
- Manthey K.C., Griffin J.B., Zempleni J. 2002 Biotin supply affects expression of biotin transporters, biotinylation of carboxylases and metabolism of interleukine-2 in Jurkat cells. *J. Nutr.* 132(5): 887-92.
- Masiello P, Bergamini E. 1977 Nicotinamide and streptozotocin diabetes in the rat. Factors influencing the effectiveness of the protection. *Experientia.* 33:1246-7.
- Masiello P., Nvelli M., Fierabracci V., Bergamini E. 1990 Protection by 3-aminobenzamide and nicotinamide against streptozotocin-induced  $\beta$ -cell toxicity in vivo and in vitro. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 69: 17-32.
- Mc. Neill, J. Experimental models of diabetes. 2000 CRC Press LLC. USA 5-6 p.
- Mistry S.P., Dakshinamurti K., Modi V.V. 1962 Impairment of glucose utilization in biotin deficiency. *Arch. Biochem. Biophys.* 96: 674-5.
- Norman W. Anthony. *Hormones*. Second Edition. 1997. Academic Press. USA. p. 193-226.
- Norris O. David. *Vertebrate Endocrinology*. Third Edition 1997. Academic Press Inc. USA. p. 506-535.
- Nukatsuka M., Yoshimura Y., Nishida M., Kawada J. 1990a Alopurinol protects pancreatic  $\beta$  cells from the cytotoxic effect of streptozotocin: in vitro study. *J. Pharmacobiochem.* 13:259-62.
- Pacheco-Alvarez D., Solórzano S., León del Río A. 2002 Biotin in metabolism and its relationship to human disease. *Arch. Med. Res.* 33: 439-47.
- Papaccio G., Pisanti F.A., Latronico M., Ammendola E., Galdieri M. 2000 Multiple low-dose and single high-dose treatments with streptozotocin do not generate nitric oxide. *J. of Cellular Biochemistry* 77:82-91.

- Pieper A.A., Brat D.J., Krug D.K., Watkins C.C., Gupta A., Blackshaw S., Verma A., Wang Z.Q., Snyder S.H. 1999 Poly(ADP-ribose) polymerase-deficient mice are protected from streptozotocin-induced diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:3059-3064
- Pieper A.A., Verma A., Zhang J., Snyder S.H. 1999 Poly (ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death. *Trends Pharmacol. Sci.* 20:171-181
- Rajala, M.W., Scherer, P.E. 2003 Minireview: The adipocyte at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology* 144, 3765-3773.
- Rasschaert J., Eizirik D.L., Malaisse W.J. 1992 Long term in vitro effects of streptozotocin, interleukin-1, and high glucose concentration on the activity of mitochondrial dehydrogenases and the secretion of insulin in pancreatic islets. *Endocrinology.* 130(6):3522-8.
- Reaven G.M. 1988 Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes.* 37: 1596-607.
- Reddi A., DeAngelis B., Frank O., Lasker N., Baker H. 1988 Biotin supplementation improves glucose and insulin tolerances in genetically diabetic KK mice. *Life Sci.* 42 (2): 1323-30.
- Rodríguez-Meléndez R. 2000 Importancia del metabolismo de la biotina. *Rev. Inv. Clin.* 52:194-199.
- Rodríguez-Meléndez R., Camporeale G., Griffin J.B., Zemleni J. 2003 Interleukin-2 receptor  $\gamma$ -dependent endocytosis depends on biotin in Jurkat cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 284: C415-C421.
- Rodriguez-Melendez R., Cano S., Mendez S.T., Velázquez A. 2001 Biotin regulates the genetic expression of holocarboxylase synthetase and mitochondrial carboxylases in rats. *J. Nutr.* 131: 1909-13.
- Rodríguez-Meléndez R., Zemleni J. 2003 Regulation of gene expression by biotin (review). *J. Nutr. Biochem.* 14: 680-90.
- Romero-Navarro G., Cabrera-Valladares G., German M.S., Matchinsky F.M., Wang J., Fernández-Mejía C. 1999 Biotin regulation of pancreatic glucokinase and insulin in primary cultured rat islets and in biotin deficient rats. *Endocrinology.* 140: 4595-4600.
- Saltiel, A.R., Kahn, C.R. 2001 Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414, 799-806.

- Scheerger S.B., Zempleni J. 2003 Expression of oncogenes depends on biotin in human small cell lung cancer cells NCI-H69. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 73(6): 461-7.
- Schnedl W.J., Ferber S., Johnson J.H., Newgard C.B. 1994 STZ transport and cytotoxicity: specific enhancement in GLUT2 –expressing cells. *Diabetes* 43:1326-1333.
- Schein P.S., Cooney D.A., Vernon M.L. 1967 The use of nicotinamide to modify the toxicity of streptozotocin diabetes without loss of antitumor activity. *Cancer Res.* 27:2324-2332
- Shulman, G.I. 2000 Cellular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 106, 171-176.
- Slack, J. 1995 *Developmental Biology of the pancreas.* *Development* 121: 1569-1580
- Soler N., Bennett M., FitzGerald M. 1973 Intensive care in the management of diabetic ketoacidosis. *Lancet* 635-9.
- Solórzano-Vargas S., Pacheco-Alvarez D., León del Río A. 2002 Holocarboxylase synthetase is an obligate participant in biotin-mediated regulation of its own expression and of biotin-depend carboxylases mRNA levels in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99(8): 5325-30.
- Sone H., Sasaki Y., Komai M., Toyomizu Y., Furukawa Y. 2004 *Biochem Biophys Res Commun* 314 :824-9.
- Spence J.T., Koudelka A.P. 1984 Effects of biotin upon the intracellular level of cGMP and the activity of glucokinase in cultured rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 259(10): 6393-6.
- Stockert R.J., Morell A. 1990 Second messenger modulation of the asialoglycoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* 265(4): 1841-6.
- Stockert R.J., Paietta E., Racevskis J., Morell A.G. 1992 Posttranscriptional regulation of the asialoglycoprotein receptor by cGMP. *J. Biol. Chem.* 267(1): 56-9.
- Stockert R.J., Ren Q. 1997 Cytoplasmic protein mRNA interaction mediates cGMP-modulated translational control of the asialoglycoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* 272(14): 9161-5.
- Svensson C., Welsh N., Krawetz S.A., Welsh M. 1991 Exhibition of specific alterations in activities and mRNA levels of rat islet glycolytic and

mitochondrial enzymes in three different in vitro model systems for attenuated insulin release. *Diabetes* 40(6):771-6.

- Szkudelski T. 2001 The mechanisms of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.* 50:536-546.
- Tavera M., Coyote N. 2006 Cetoacidosis Diabética. *An. Med. (Mex)* 51(4) 180-187.
- Viberti G.C. 1983 Microalbuminuria and diabetes. *Lancet.* i: 352.
- Virag L., Szabo C. 2002 The therapeutic potential of poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacological Rev.* 54: 375429.
- Vital P., Larrieta E., Hiriart M. 2006 Sexual dimorphism in insulin sensitivity and susceptibility to develop diabetes in rats. *J. Endocrinol.*190:425-432
- Welsh N., Pääbo S., Welsh M. 1991 Decreased mitochondrial gene expression in isolated islets of rats injected neonatally with streptozotocin. *Diabetologia.* 34(9):626-31.
- Yoshikawa H., Tajiri Y., Sako Y., Hashimoto T., Umeda F., Nawata H. 2002 Effects of biotin on glucotoxicity of lipotoxicity in rat pancreatic islets. *Metabolism.* 51(2): 163-8.
- Young M.J., Breddy J.L, Veves A. 1998 Screening for neuropathy. *Diabetic Foot.* 1:22-5.
- Zhang H., Osada K., Sone H., Furukawa Y. 1997 Biotin administration improves the impaired glucose tolerance of streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 43(3): 271-80.
- Zimmet, P., K.G. Alberti, and J. Shaw, Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, 2001 414(6865): p. 782-7.