



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**EFFECTOS DE LA DEFICIENCIA DE BIOTINA
EN EL ARREGLO DE LA CROMATINA DE
HEPATOCITOS MURINOS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

MARTA CONCEPCIÓN LÓPEZ SANTIBÁÑEZ GUEVARA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ARMIDA BÁEZ SALDAÑA

**COMITÉ TUTOR: DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA
M. en C. ERNESTO ÁVILA GONZÁLEZ**

MÉXICO, D.F.

ABRIL 2010



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.

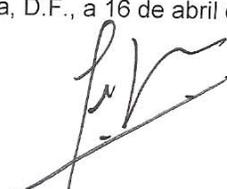
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 18 de enero de 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **Maestra en Ciencias Biológicas (Biología Experimental)** de la alumna **LOPEZ-SANTIBAÑEZ GUEVARA MARTA CONCEPCION** con número de cuenta **88535944** con la tesis titulada **"EFECTOS DE LA DEFICIENCIA DE BIOTINA EN EL ARREGLO DE LA CROMATINA DE HEPATOCITOS MURINOS"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. ARMIDA BAEZ SALDAÑA**:

Presidente: DR. FELIX RECILLAS TARGA
Vocal: DR. MAURICIO DIAZ MUÑOZ
Secretario: DRA. ARMIDA BAEZ SALDAÑA
Suplente: DR. GABRIEL GUTIERREZ OSPINA
Suplente: DRA. PATRICIA RAMOS MORALES

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 16 de abril de 2010.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

AGRADECIMIENTOS:

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM

A los apoyos recibidos por parte de:

- el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT (Becaria num. 215411), y financiamientos (52746 y 82879)
- la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) (PAPIIT IN230905, IIN215208, e IN224308)

A los miembros de mi comité tutorial por el apoyo y sugerencias a largo de estos cuatro semestres:

Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina
M. en C. Ernesto Ávila González

A la Unidad de Microscopía del Instituto de investigaciones Biomédicas y su responsable la Biol. María del Carmen López y Castro

Dedicatoria y agradecimientos personales

DEDICO este trabajo a la memoria de mi abuelo el Dr. Alberto Guevara Rojas, quien sembró en mí el interés por la ciencia y quien siempre ha sido motivo de inspiración en mi vida.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES:

EN PRIMERA INSTANCIA, A LA DRA. ARMIDA BÁEZ SALDAÑA, por su dirección, sus enseñanzas, paciencia, comprensión e invaluable apoyo y estímulo que me permitieron lograr este objetivo.

AL DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA, por la invitación y oportunidad de pertenecer a su laboratorio, por confiar en mí, por sus enseñanzas y por su constante entusiasmo y estímulo para continuar este proyecto.

cDRA. INGRID FETTER, por su invaluable apoyo y guía, consejos y entusiasmo a lo largo de las diferentes etapas del proyecto, desde el manejo del software ImageJ, el apoyo con artículos, la realización y análisis de los ensayos de inmunofluorescencia y la interpretación de los resultados. Ella es parte fundamental de este trabajo.

cDRA. LEONORA OLIVOS, por su imprescindible apoyo en la perfusión de los ratones y la criopreservación de los órganos, y por siempre apoyarme para no que no dejara solos a los "Peques";

cDR. EDUARDO MARTÍNEZ, por su valioso apoyo y paciencia en el manejo del microscopio acoplado al DSU y del software StereoInvestigator, y sus consejos en la interpretación de los resultados. (Y por hacer más amenas las largas horas de análisis en el microscopio);

DRA. ESPERANZA MELÉNDEZ, por su excelente asesoría en el manejo del criostato, y como mi vecina de mesa, porque siempre recibí su apoyo y consejos en cualquier tropiezo que se me presentaba; y

DRA. JULIETA MENDOZA, por su invaluable apoyo en la estandarización de la tinción hematoxilina y eosina

A RAQUEL, PABLO, LILLIAN, MARILÚ, DANNIA Y TODOS MIS COMPAÑEROS DEL LABORATORIO por hacer del laboratorio un lugar agradable y estimulante para trabajar y porque siempre están dispuestos a orientar en cualquier dificultad y a dar palabras de aliento.

Y finalmente, pero en primer lugar, a Juan Carlos y mis tres corazones, José Carlos, Santiago y Pablo, a mis papás y a Dios; porque siempre están a mi lado y sin su enorme paciencia y apoyo incondicional nunca hubiera logrado culminar esta etapa. ¡¡Gracias!!

ÍNDICE

Índice de cuadros y figuras	p. 6
Resumen	p. 7
Abstract.....	p. 8
1. Introducción	p. 9
2. Antecedentes	p. 11
3. Hipótesis	p. 19
4. Objetivos	p. 19
5. Materiales y métodos	p. 19
6. Resultados	p. 23
7. Discusión	p. 27
8. Conclusiones	p. 30
9. Referencias.....	P. 31

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

CUADROS

- Cuadro 1. Genes cuya expresión es modificada por la biotina.....p. 12
- Cuadro 2. Determinación de fracción cromocéntrica en hepatocitos murinos con diferente aporte de biotina y teñidos con DAPI-.....p. 24
- Cuadro 3. Histomorfometría de hepatocitos.....p. 26

FIGURAS

- Figura 1. Medición de superficie cromocéntrica en los núcleos de hepatocitos teñidos con DAPI.p. 22
- Figura 2. Disminución de la fracción de cromocentros y del tamaño nuclear en hepatocitos de ratones deficientes en biotina.....p. 24
- Figura 3. La marca H3K9me3 asociada a heterocromatina pericéntrica se localiza en los cromocentros.....p. 25
- Figura 4. Efecto de la deficiencia nutricional de biotina en la relación núcleo:citoplasmap. 26

RESUMEN

La biotina es una vitamina hidrosoluble que actúa como coenzima en reacciones de carboxilación del metabolismo intermediario. Diversos estudios muestran que este nutriente además modifica la expresión de genes. Sin embargo, es poco claro si este efecto es mediado por cascadas metabólicas o por acciones a nivel de la estructura de la cromatina. En apoyo a esta última posibilidad, estudios bioquímicos sugieren que las histonas son susceptibles de ser biotiniladas. No obstante, la evidencia *in vivo* que apoya la existencia de un proceso de biotinilación de la cromatina es aun escasa, por lo que el uso de modelos animales experimentales que permita abordar este problema se torna fundamental. Por ello, en el presente trabajo empleamos un modelo murino estandarizado de deficiencia de biotina y evaluamos la organización cromatínica en hepatocitos de ratones alimentados con una dieta carente de biotina, en comparación con los grupos control. Los resultados mostraron que en el núcleo de los hepatocitos la deficiencia nutricional de biotina se asocia con la disminución significativa en el contenido estimado de cromocentros de heterocromatina pericéntrica. Se observó también reducción del tamaño nuclear relativo al citoplasma en tejido hepático teñido con hematoxilina y eosina. En conjunto, nuestras observaciones sugieren que la biotina probablemente modifique la organización de la cromatina y apoyan la utilización de este modelo murino como un sistema sensible para estudiar *in vivo* los posibles mecanismos que emplee esta vitamina en la modificación de la expresión genética.

ABSTRACT

Biotin is a water-soluble vitamin that functions as a coenzyme in the carboxylation reactions of the intermediary metabolism. Different studies show that this nutrient also modifies gene expression. However, it remains unclear whether this effect is performed by means of metabolic cascades or through actions at the level of chromatin structure. Supporting biochemical studies suggest that histones are susceptible of biotinylation; yet, the evidence *in vivo* revealing biotinylation actually occurs on the chromatin remains limited. Therefore, it turns out fundamental to employ experimental animal models to approach these studies. Accordingly, we herein took advantage of a standardized biotin deficiency murine model and evaluated the chromatin organization in hepatocytes of mice fed with diet lacking biotin compared to the control groups. The results showed that nutritional biotin deficiency is linked to a significant decrease in the estimated content of chromocenters of pericentric heterochromatin. We also observed a significant reduction of the nuclear size in relation to the cytoplasm in hepatic tissue stained with hematoxylin and eosin. All together, our observations suggest that biotin probably modifies chromatin organization and they support the use of this murine model as a sensible system for the *in vivo* investigation of the possible mechanisms through which biotin modifies gene expression.

1. INTRODUCCIÓN:

La biotina es una vitamina hidrosoluble que funciona como grupo prostético de las carboxilasas, enzimas que catalizan las reacciones de carboxilación que proceden a lo largo de las vías del metabolismo intermediario de glucosa, aminoácidos y ácidos grasos [Friedrich 1988]. La restricción alimentaria de esta vitamina repercute en procesos complejos tales como la regulación del crecimiento corporal y de la función inmune, aunque estas acciones no están asociadas directamente con la función metabólica de la biotina [Báez-Saldaña y cols. 2009-B; 1998 y 2004]. En este sentido, las funciones netamente metabólicas de la biotina parecen complementarse con efectos a nivel genético debido a que se ha observado que esta vitamina afecta los niveles de RNA total, así como las interacciones electrostáticas entre el ADN y las histonas y el grado de metilación, fosforilación y acetilación de estas últimas [Boeckx y Dakshinamurti 1975; Petrelli y cols. 1978]. También se ha mostrado que la biotina tiene efecto sobre la expresión de diversos genes [Rodríguez-Melendez y Zemleni 2003; Dakshinamurti 2005], entre los que destacan aquellos correspondientes a las enzimas carboxilasas [Rodríguez-Meléndez y cols. 2001], a la fosfoenolpiruvato-carboxicinasas y a las glucocinasas hepática y pancreática [Chauhan y Dakshinamurti 1991; Dakshinamurti y Li 1994; Romero-Navarro y cols. 1999; Vilches-Flores y cols. 2009]. Todas estas observaciones sustentan la idea de que la biotina exhibe funciones en la regulación de la expresión genética [Hassan y Zemleni 2006] y los mecanismos para estas acciones son motivo de gran interés y estudio en varios grupos [Dakshinamurti 2005; Rodríguez-Melendez y Zemleni 2003; Vilches-Flores y cols. 2009]. En este contexto, también se ha reportado la

biotinilación de las histonas en células de sangre periférica humana [Stanley y cols. 2001], por lo cual se ha planteado una función epigenética para la biotina, propuesta aún polémica, debido a cuestionamientos sobre las técnicas de análisis empleadas y a que la mayoría de los estudios se han realizado en modelos *in vitro*.

Por lo anterior, en el presente trabajo se evaluó en un modelo *in vivo*, el efecto que ejerce la biotina en el arreglo de la cromatina. Nuestro estudio representa un punto de partida que se apoya en el uso de un modelo animal que permitirá en un futuro esclarecer *in vivo* el modo en que la biotina modula la expresión de genes. A lo largo del trabajo se replicó un modelo murino estandarizado de deficiencia nutricional de biotina [Báez-Saldaña y cols., 1998] y se estimó, mediante técnicas histoquímicas, la alteración en el contenido relativo de cromocentros (conglomerados de heterocromatina constitutiva pericéntrica y visibles por su tinción brillante con DAPI). En el diseño experimental se consideraron 3 grupos de ratones alimentados, a partir del destete y durante 11 semanas, con dietas que contenían diferente disponibilidad de biotina libre. Al final del periodo de experimentación, se obtuvieron cortes histológicos de los hígados de animales sujetos a cada condición y se estimó la superficie relativa ocupada por los cromocentros. Los resultados mostraron que el área total de los cromocentros en los hepatocitos provenientes de animales alimentados con la dieta carente de biotina se redujo en un 29% y en un 19% al ser comparados con los ratones alimentados con la dieta control y la dieta suficiente, respectivamente. Adicionalmente, con apoyo de inmunofluorescencia, se confirmó en estos cromocentros la co-localización de la marca

de tri-metilación de la lisina 9 en histona 3 (H3K9me3). Finalmente, se detectó que la deficiencia de biotina se asoció con la reducción del 27% y 22% del área de corte nuclear con respecto al citoplasma, al compararse con los grupos antes mencionados, respectivamente. De esta forma pensamos que nuestros resultados sugieren que la ausencia de biotina pudiera estar induciendo alteraciones en la organización nuclear de la heterocromatina. Aunque los resultados son preliminares y será necesario evaluar más marcadores de la estructura de la cromatina, este trabajo nos permite proponer que uno de los mecanismos de la biotina para regular la expresión de genes posiblemente sea a través de una acción a nivel de la organización cromatínica.

2. ANTECEDENTES:

La biotina es una vitamina del complejo B que actúa como grupo prostético de carboxilasas en las reacciones de carboxilación del metabolismo intermediario. [Friedrich 1988]. Su deficiencia durante la gestación provoca severas malformaciones en los fetos de ratones, como imperfecciones en el desarrollo de las mandíbulas y de las extremidades, así como paladar hendido; proponiéndose en este último que son ocasionadas por una menor expresión de dos proteínas presentes en el mesénquima de procesos palatinos [Watanabe T y cols 2010]. Aunado a esto, diferentes grupos de investigación han observado que la biotina tiene efectos importantes estimulatorios e inhibitorios en la regulación de la expresión de más de 2000 genes que codifican para proteínas asociadas o no con su papel prostético [Chauhan y Dakshinamurti 1991;

Dakshinamurti y Li 1994; Fernandez-Mejia 2005-rev ; Rodríguez-Meléndez y cols. 2001 y 2003; Solórzano-Vargas y cols. 2002; Pacheco-Alvarez y cols. 2005; Wiedmann y cols. 2003 y 2004]. Algunos de estos genes se presentan en el Cuadro 1 y se agrupan con base en su función conocida.

Cuadro 1. GENES CUYA EXPRESIÓN ES MODIFICADA POR LA BIOTINA	
<p>1. Genes asociados a la función metabólica de la biotina [Rodríguez-Meléndez y cols. 2001; Solórzano-Vargas y cols. 2002; Pacheco-Alvarez y cols. 2005; Zemleni y cols. 2009]</p> <ul style="list-style-type: none"> • holocarboxilasa sintasa (HCS) • propionil coenzima A carboxilasa-(PCC) • transportador multivitamínico dependiente de sodio (SMVT) • acetil coenzima A carboxilasa-1 (ACC-1) • metil-crotonil-coA carboxilasa (MCC) 	
<p>2. Genes asociados al sistema inmune [Wiedmann y cols. 2003; Rodríguez-Meléndez y cols. 2003]</p> <ul style="list-style-type: none"> • Interferón gamma (IFN-γ) • interleucina 4 (IL-4) • cadena γ del receptor de IL-2 • Interleucina 1-beta (IL-1-β) • interleucina 2 (IL-2) 	
<p>3. Genes relacionados con el metabolismo de la glucosa [Chauhan y Dakshinamurti 1991; Dakshinamurti 1994; Romero-Navarro y cols. 1999; Fernandez-Mejia 2005-rev].</p> <ul style="list-style-type: none"> • fosfoenol-pirúvico carboxilasa • glucocinasas hepática y pancreática • insulina • receptor de insulina 	
<p>4. Más de 2000 genes agrupados como genes de: [Rodríguez-Meléndez y Zemleni 2003; Wiedmann y cols. 2003 y 2004]</p> <ul style="list-style-type: none"> • proteínas nucleares • proteínas de unión a nucleótidos, • proteínas con actividad de traducción • proteínas de unión a ADN o a ARN • proteínas con actividad de transferasa, • proteínas que actúan en vías de transducción de señales 	

La regulación de la expresión de los genes está gobernada tanto por la información codificada en el mismo ADN, como por la regulación epigenética que abarca el contexto natural en el que se encuentra organizado el genoma. La epigenética es el conjunto de mecanismos que no involucran modificaciones en la secuencia del DNA y que modulan la estructura de la cromatina a distintos niveles incluyendo la dinámica y la topología nuclear. La estructura central donde se llevan a cabo estos mecanismos es la cromatina, cuya unidad fundamental de empaquetamiento es el nucleosoma, un octámero compuesto por 2 de cada una de las 4 histonas (H2A, H2B, H3 y H4). Los mecanismos conocidos que modulan la estructura cromatínica incluyen la metilación del

ADN en la citosina de dinucleótidos CpG (meCpG), las modificaciones covalentes post-traduccionales de las histonas (siendo la acetilación y la metilación las más estudiadas); la participación de complejos multipéptídicos y protéicos remodeladores, los RNAs no-codificantes y la dinámica y topología nucleares [Recillas-Targa 2004 y 2008]. Estos mecanismos en conjunto organizan al genoma en una de dos formas: en eucromatina, cromatina abierta que se descondensa durante la interfase celular y es considerada como transcripcionalmente activa; y en heterocromatina, una cromatina condensada y silenciada. Estas estructuras regulan el acceso de la maquinaria de transcripción hacia la información genética [Recillas-Targa 2008]. Por ejemplo, las modificaciones de las histonas pueden regular la expresión de genes directamente, afectando la estabilidad de la unión histona-ADN o mediante el reclutamiento de proteínas no-histonas, que se unen a la cromatina mediante una variedad de dominios de unión a la cromatina, y provocan su compactación o su relajación. La heterocromatina, a su vez, puede ser facultativa o constitutiva. La primera es aquella que en un mismo organismo puede estar compactada y por tanto silenciada en un tipo celular; y por el contrario, encontrarse en otro linaje celular relajada y potencialmente expresable. La heterocromatina constitutiva es aquella que permanece compactada durante toda la interfase y en todas las células de un organismo.

La heterocromatina constitutiva está compuesta por secuencias repetidas abundantemente y forma cúmulos de cromatina compacta, visibles al microscopio como grumos adosados a la envoltura nuclear, rodeando al nucleolo y distribuida en el

nucleoplasma; mientras que la eucromatina forma asas en la periferia de estos cúmulos [Vázquez-Nin y cols. 2003]. En los mamíferos, la heterocromatina constitutiva se caracteriza por presentar niveles elevados de tri-metilación de lisina 9 en la histona H3 (H3K9me3) [Martens y cols. 2005], metilación del ADN (meCpG) y desacetilación de la histona H4. Tanto H3K9me3 como meCpG son sitios de unión a proteínas modificadoras de la cromatina, como es el caso del reclutamiento de las proteínas HP1 (heterochromatin protein 1) y la MeCP2 (methyl CpG binding protein 2), reclutadas respectivamente a estos sitios.

En los cromosomas, el estado más compacto de toda la cromatina, la heterocromatina constitutiva se localiza principalmente en grandes bloques que rodean los centrómeros y telómeros, estructuras funcionales de los cromosomas. En los límites de los centrómeros, estas zonas de heterocromatina se denominan regiones pericéntricas (o pericentroméricas). Están formadas por secuencias grandes y repetitivas de ADN, ricas en bases AT y denominadas satélites mayores (ó satélites- γ) [Guenatri y cols. 2004]; y están organizadas en cromatina enriquecida en H3K9me3 y en proteínas HP1- α y - β . [Peters y cols. 2003, Rice y cols. 2003; Martens y cols. 2005; Lachner y cols.2001]. En el ratón la metiltransferasa Suv39h1 es la enzima responsable de la tri-metilación H3K9me3 y provoca el reclutamiento de proteínas HP1 que propagan la formación de heterocromatina y el silenciamiento de genes [Lachner y cols. 2001]. La heterocromatina pericéntrica permanece condensada a lo largo de todo el ciclo celular y durante la interfase las regiones pericéntricas de diferentes cromosomas se fusionan formando cúmulos denominados “cromocentros”, que en muchas células, particularmente las

murinas, se identifican fácilmente porque su ADN se tiñe intensamente con DAPI. La heterocromatina pericéntrica es por tanto una de las principales formas de heterocromatina constitutiva, a la cual se atribuye una función fundamental en la segregación de los cromosomas, en la regulación epigenética y en el mantenimiento de la estabilidad genómica [Maison y Almouzni 2004].

Los cambios en la estructura de la cromatina pueden establecerse de manera estable y heredable, lo que da como resultado una “memoria” epigenética. Pero también estas modificaciones son dinámicas y reversibles; pueden aparecer y desaparecer en cuestión de minutos después de que la célula recibe un estímulo en su superficie [Kouzarides 2007]. Debido a esta reversibilidad, es factible que los estados epigenéticos sean modificados por factores ambientales, como es el caso de la nutrición [Jaenisch y Bird 2003], donde como ejemplo están, por un lado el suministro deficiente de ácido fólico, asociado con la hipometilación e inestabilidad genómica y con defectos en el tubo neural [Jaenisch y Bird 2003]; o el caso contrario, en que la suplementación de donadores de grupos metilo a las madres de ratones *Agouti*, normalmente amarillos y obesos, provoca hipermetilación del gen responsable de este fenotipo e induce que las crías nazcan con pelaje oscuro y sin obesidad [Waterland y Jirtle 2003]. Las alteraciones nutricionales en varias etapas de la vida pueden afectar el epigenoma de un individuo de manera permanente siendo más notorio el efecto si se imponen durante etapas del desarrollo fetal [Müller y Kersten 2003] y pueden contribuir al desarrollo de fenotipos

diferentes, anormales o benéficos y que permitan al individuo adaptarse a condiciones adversas de desnutrición.

El efecto de la biotina en la modulación de la expresión genética, no tiene todavía una explicación clara. Se han propuesto dos mecanismos principales, siendo el primero, que la biotina actúe de manera indirecta, a través de cascadas de señalización, mediadas por guanilato ciclasa soluble, guanosil monofosfato cíclico (GMPC) y proteína cinasa dependiente de GMPC (PKG) [Solórzano-Vargas y cols. 2002; Vilches-Flores y cols. 2009]. Una segunda posibilidad es que la biotina modifique la organización de la cromatina. Distintas evidencias apoyan esta propuesta. En primer lugar, está confirmada la presencia en el núcleo, tanto de la propia biotina [Dakshinamurti y Mistry 1963] como de la holocarboxilasa sintasa (HCS), (enzima con actividad biotiniladora [Chapman-Smith y Cronan 1999]), y que esta enzima se trasloca al núcleo de manera dependiente del aporte de biotina [Narang y cols. 2004]. También se ha mostrado que la HCS es capaz de biotinar histonas *in vitro* [Narang y cols. 2004] y se propone que la adición de biotina ocurre en sitios específicos ocupados por lisinas en las histonas H2A, H3 y H4 [Hassan y Zempleni 2006]. En segunda instancia, desde hace tiempo se conoce que la deficiencia de biotina altera la estabilidad de las interacciones electrostáticas entre las histonas y el ADN, situación que se revierte con la restitución de la vitamina [Petrelli y cols. 1976]. Sumado a esto, la carencia de biotina se relaciona con la reducción en la tasa de fosforilación y metilación de las histonas, aunada al incremento en su acetilación [Petrelli y cols. 1978]. Finalmente, en la última década se ha propuesto la presencia de biotina en las histonas como una

marca epigenética. Se documenta la biotinilación de histonas en células mononucleares de sangre periférica humana, razón por la cual se propone que la biotinilación de histonas ocurre *in vivo* [Stanley y cols. 2001]; y se reporta que la deficiencia de la enzima HCS se asocia con una disminución significativa en la biotinilación de histonas [Narang y cols. 2004), proponiéndose que dicha biotinilación, particularmente aquella que ocurre en el sitio H4K12Bio, está asociada a formación de heterocromatina y a estabilidad genómica [Camporeale y cols 2007; Zemleni y cols. 2009]. Sin embargo, existe controversia en torno a la especificidad de las técnicas empleadas hasta ahora para evidenciar la presencia natural de la biotina como marca epigenética [Bailey y cols. 2008; Healy y cols. 2009]; aunque podría también debatirse que las discrepancias se deban a la falta de resolución de estas técnicas.

En resumen, está claro que la biotina, además de su función prostética en el metabolismo intermediario, también modifica la expresión de genes. El debate sobre los procedimientos empleados para proponer su posible participación en la remodelación de la cromatina, hace necesario el establecimiento de modelos *in vivo* que permitan investigar estas acciones de la biotina. En el presente trabajo se propuso investigar en un modelo *in vivo*, si la biotina ejerce acción sobre la estructura de la cromatina, como un primer paso en el esclarecimiento de los presuntos mecanismos epigenéticos de esta vitamina en la regulación de la expresión genética. Báez-Saldaña desarrolló un modelo con ratones BALB/ cAnN Hsd para estudiar efectos fisiológicos de la deficiencia de biotina a diferentes niveles. En este modelo los ratones son sometidos a una dieta

carente de biotina, preparada con 30% de clara de huevo como única fuente de proteínas, entre las cuales se encuentra la avidina; la cual une a la biotina impidiendo su asimilación en el intestino y asegurando su eliminación [Báez-Saldaña y cols. 1998].

La utilidad del modelo desarrollado por Báez-Saldaña queda reflejada en el hecho de que la deficiencia nutricional de biotina alcanzada afecta de manera significativa el crecimiento corporal y orgánico, el desarrollo y fisiología de órganos linfoides y del sistema inmune y la morfofisiología del sistema reproductor [Báez-Saldaña y cols. 1998, 2004, 2009-A, 2009-B]; efectos todos ellos debidos únicamente a la ausencia de biotina y no dependientes de la cantidad de alimento consumido [Báez-Saldaña y cols. 2004, 2009-B]. Con base en estos argumentos, pensamos que este modelo es adecuado para iniciar la exploración *in vivo* de los posibles mecanismos epigenéticos de la biotina en la regulación de la expresión genética.

3. HIPÓTESIS:

La biotina participa en la modulación de la estructura de la cromatina.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General:

Evaluar el efecto de la biotina sobre la organización de la cromatina en un modelo murino *in vivo* de deficiencia nutricional de esta vitamina.

4.2 Objetivos particulares:

A) Estimar y comparar el contenido de cromocentros (cúmulos de heterocromatina pericéntrica que se tiñen intensamente con DAPI), en hepatocitos de cortes de hígado de ratones sujetos a las dietas control, suficiente y carente de biotina y mediante análisis morfométrico y de microscopía de fluorescencia de alta resolución.

B) Identificar en los cromocentros la marca de trimetilación de la histona H3 en la lisina 9 (H3K9me3), específica de heterocromatina pericéntrica, mediante inmunomarcaje y microscopía de fluorescencia de alta resolución.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Obtención de ratones deficientes en biotina. Se trabajó con un lote de 9 ratones macho de la cepa BALB/cAnN Hsd de 3 semanas de vida, dividido en tres grupos de acuerdo al tipo de dieta que se les proporcionó. Los ratones del grupo control recibieron una dieta comercial estándar para roedores de laboratorio (biotina libre 0.82 mg/kg; cat. 2018S Harlan-Teklad) y los del grupo deficiente, una dieta carente de biotina que contiene 30% de clara de huevo desecada (cat. TD.01363 Harlan-Teklad). Como se

3. HIPÓTESIS:

La biotina participa en la modulación de la estructura de la cromatina.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General:

Evaluar el efecto de la biotina sobre la organización de la cromatina en un modelo murino *in vivo* de deficiencia nutricional de esta vitamina.

4.2 Objetivos particulares:

A) Estimar y comparar el contenido de cromocentros (cúmulos de heterocromatina pericéntrica que se tiñen intensamente con DAPI), en hepatocitos de cortes de hígado de ratones sujetos a las dietas control, suficiente y carente de biotina y mediante análisis morfométrico y de microscopía de fluorescencia de alta resolución.

B) Identificar en los cromocentros la marca de trimetilación de la histona H3 en la lisina 9 (H3K9me3), específica de heterocromatina pericéntrica, mediante inmunomarcaje y microscopía de fluorescencia de alta resolución.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Obtención de ratones deficientes en biotina. Se trabajó con un lote de 9 ratones macho de la cepa BALB/cAnN Hsd de 3 semanas de vida, dividido en tres grupos de acuerdo al tipo de dieta que se les proporcionó. Los ratones del grupo control recibieron una dieta comercial estándar para roedores de laboratorio (biotina libre 0.82 mg/kg; cat. 2018S Harlan-Teklad) y los del grupo deficiente, una dieta carente de biotina que contiene 30% de clara de huevo desecada (cat. TD.01363 Harlan-Teklad). Como se

mencionó en los antecedentes, la avidina presente entre las proteínas de la clara de huevo, secuestra a la biotina impidiendo su bio-disponibilidad. Los ratones del grupo suficiente se alimentaron con la misma dieta del grupo deficiente pero adicionada con biotina de manera tal que bloquee todos los sitios de avidina presentes y además proporcione la vitamina necesaria para su aprovechamiento por el organismo (biotina libre 1.8 mg/kg; cat. TD.01362 Haran-Teklad). Esta dieta se denomina suficiente porque está descrito que permite el adecuado desarrollo del ratón [Báez-Saldaña y cols. 1998 y 2009-B; NRC 1994]. Además, con este modelo murino no se han observado diferencias entre los grupos control y suficiente para diversos parámetros fisiológicos y corporales hasta ahora estudiados [Báez-Saldaña y Ortega 2004, Báez-Saldaña y cols. 1998 y 2009-B]. Todos los ratones recibieron agua y alimento “*ad limitum*” durante 11 semanas y se mantuvieron en condiciones controladas de barrera y luz (ciclos de 12 h luz/12 h oscuridad).

5.2 Disección de hígados y obtención de cortes histológicos: Al finalizar el tiempo de experimentación, los 9 ratones se anestesiaron con 100 µL de pentobarbital sódico [6.3 g/100 mL] hasta verificar su muerte y se perfundieron con paraformaldehído (PFA) al 2% en PBS durante 15 minutos. Posteriormente se extrajeron los hígados y se deshidrataron en sacarosa al 30% en PBS durante 24 horas. Finalmente se congelaron en metil-butano y se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento. Se prepararon cortes de 10 µm de grosor de los hígados congelados empleando un criostato a una temperatura de -22°C y se colocaron en laminillas pretratadas (Fisherbrand Superfrost/Plus cat.12-550-15).

5.3 Tinción de cromocentros Las laminillas se tiñeron con dihidrocloruro de 4',6-diamidin-2-fenil-indol (DAPI) para teñir el ADN. El DAPI es una tinción fluorescente (Ex358/Em461nm) que se une con alta especificidad a la molécula de ADN, preferentemente al de doble cadena, en el surco menor y en regiones ricas en bases AT [Kubista y cols. 1987]. Se obtiene una tinción de mayor intensidad para la cromatina compacta [Manzini y cols. 1983] y en células murinas es especialmente brillante en

cromocentros de heterocromatina pericéntrica, considerada como heterocromatina constitutiva [Maison y Almouzni 2004]. Se empleó una solución de DAPI (Boehringer-Mannheim, cat. 236 276) en PBS (1 µg/mL) incubando durante 30 segundos y se lavaron los cortes con solución de PBS. Finalmente se montaron con el medio *DAKO-mounting solution* (cat. S3023.) dejando secar 24 hrs a temperatura ambiente y se almacenaron a 4°C hasta su análisis.

5.4 Inmunolocalización de la marca H3K9me3 en los cromocentros. La marca H3K9me3 está generalmente enriquecida a lo largo de todo el centrómero de los cromosomas, co-localizando principalmente con las secuencias satélite mayores/gamma correspondientes la heterocromatina pericéntrica y en menor grado con las secuencias menores (heterocromatina céntrica) [Guenatri y cols. 2004]. Las laminillas se pre-trataron para el desenmascaramiento de antígenos, mediante incubación con el reactivo a base de solución de citratos BioSB-ImmunoDNA-Retriever y se realizó la inmunotinción con el anticuerpo primario (2 µg/mL) rabbit-anti-mouse-H3K9me3 (Abcam # ab8898), a 4°C por 67 horas; y con el anticuerpo secundario (1:500) Alexa Fluor 594 donkey anti-rabbit IgG (Invitrogen cat. A-21207) que fluoresce en color rojo (Ex/Em 590/617nm). Se contra-tiñó con DAPI en PBS (1 µg/mL) durante 1 minuto.

5.5 Tinción con hematoxilina y eosina Se tiñeron los cortes de 10 µm con la técnica de hematoxilina-eosina, con tiempos de incubación de 3 minutos para la hematoxilina y 20 segundos con eosina. Se montaron con el medio Cytoseal. (cat. EMS 18006).

5.6 Microscopía y procesamiento de imágenes Las preparaciones se analizaron con un microscopio de epifluorescencia marca Olympus con módulo de disco giratorio (DSU) y controlado por el software Stereo Investigator versiones 6.0 y 8.0 (MicroBrightField Inc.; Wiliston, VT, USA). Para las preparaciones con DAPI e inmunohistoquímicas se emplearon los filtros de emisión correspondientes y para la tinción con hematoxilina y eosina, se empleó el módulo para campo claro. Para todos los

análisis se buscaron campos contiguos a venas centrolobulillares lo más redondas posible y de tamaño similar. Se capturaron las imágenes apiladas (“stacks”) de cortes ópticos de 1 μm y abarcando todo el espesor del corte sobre el eje Z. Las fotomicrográficas se analizaron empleando el software ImageJ v.1.41o (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>); se efectuó la proyección de los cortes ópticos, reapilados por intensidad máxima para las imágenes de epifluorescencia y por promedio, para las de campo claro.

5.7 Estimación del área ocupada por cromocentros En cada imagen capturada se seleccionaron de 3 a 4 núcleos donde el criterio de selección consistió en que los núcleos fueran redondos, aislados, completos y representativos del resto del campo. Se crearon macros para medir la superficie total de los cromocentros y el área de corte del núcleo. El valor de superficie de cromocentros se dividió entre el valor del núcleo, con lo cual se obtuvo la fracción cromocéntrica. Este procedimiento se esquematiza en la Figura 1.

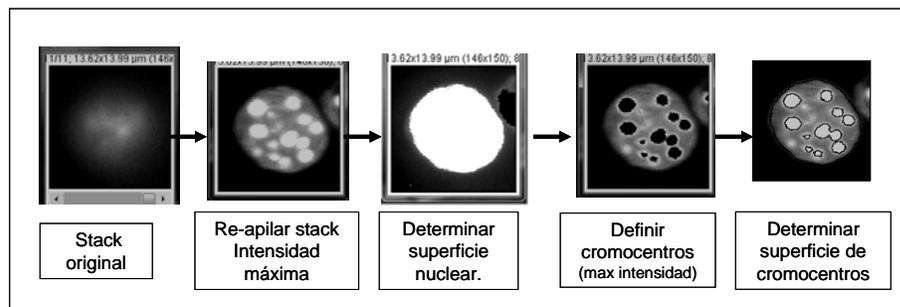


Fig. 1 Medición de superficie cromocéntrica en los núcleos de hepatocitos teñidos con DAPI.

5.8 Determinación de la relación núcleo: citoplasma: Se seleccionaron hepatocitos cuya periferia se pudiera delinear fácilmente y se determinaron las áreas de corte celular y nuclear, para calcular con estos datos la proporción núcleo: citoplasma (N: C) en cada célula.

5.9 Análisis estadístico: Los datos obtenidos en la estimación de proporción de cromocentros y la determinación de la relación núcleo:citoplasma se analizaron empleando el software OriginPro 8 SRO v8.0724 (B724), mediante análisis de varianza (ANOVA) de 1 vía y prueba post hoc de Bonferroni. Los resultados se reportan como promedio \pm error estándar de la media (Promedio \pm ee). El grado de significancia estadística fue de $P < 0.0001$, en el caso de la cuantificación de foci de heterocromatina y $P < 0.05$ para la determinación de la relación núcleo-citoplasma.

6.0 RESULTADOS:

6.1 El contenido relativo de cromocentros y en el área de corte nuclear disminuyen en los hepatocitos de ratones alimentados con la dieta carente de biotina. Con el objeto de estimar el contenido de cromocentros en los núcleos de hepatocitos, se determinó la fracción cromocéntrica, calculando el porcentaje del área nuclear ocupada por los cromocentros. Los datos mostraron que la proporción de cromocentros disminuyó en los hepatocitos de los ratones alimentados con la dieta sin biotina 29% y 19% con relación a los grupos alimentados con dietas control y suficiente respectivamente (Figura 2 y Cuadro 2). Vale la pena mencionar que los hepatocitos de ratones con dieta suficiente mostraron una distribución similar a los de los alimentados con dieta control. También se observó la disminución del área de corte nuclear para los hepatocitos del grupo deficiente, resultado que se confirmó posteriormente mediante la tinción de las células completas.

5.9 Análisis estadístico: Los datos obtenidos en la estimación de proporción de cromocentros y la determinación de la relación núcleo:citoplasma se analizaron empleando el software OriginPro 8 SRO v8.0724 (B724), mediante análisis de varianza (ANOVA) de 1 vía y prueba post hoc de Bonferroni. Los resultados se reportan como promedio \pm error estándar de la media (Promedio \pm ee). El grado de significancia estadística fue de $P < 0.0001$, en el caso de la cuantificación de foci de heterocromatina y $P < 0.05$ para la determinación de la relación núcleo-citoplasma.

6.0 RESULTADOS:

6.1 El contenido relativo de cromocentros y en el área de corte nuclear disminuyen en los hepatocitos de ratones alimentados con la dieta carente de biotina. Con el objeto de estimar el contenido de cromocentros en los núcleos de hepatocitos, se determinó la fracción cromocéntrica, calculando el porcentaje del área nuclear ocupada por los cromocentros. Los datos mostraron que la proporción de cromocentros disminuyó en los hepatocitos de los ratones alimentados con la dieta sin biotina 29% y 19% con relación a los grupos alimentados con dietas control y suficiente respectivamente (Figura 2 y Cuadro 2). Vale la pena mencionar que los hepatocitos de ratones con dieta suficiente mostraron una distribución similar a los de los alimentados con dieta control. También se observó la disminución del área de corte nuclear para los hepatocitos del grupo deficiente, resultado que se confirmó posteriormente mediante la tinción de las células completas.

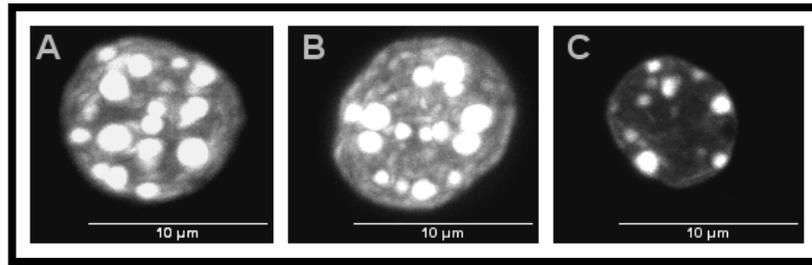


Fig. 2. Disminución de la fracción de cromocentros y del tamaño nuclear en hepatocitos de ratones deficientes en biotina. Fotomicrografías que ilustran cromocentros de heterocromatina pericéntrica teñidos con DAPI en núcleos de hepatocitos de ratones de los grupos (A) Control (B) Suficiente y (C) Deficiente en biotina.

Cuadro 2. Determinación de fracción cromocéntrica en hepatocitos murinos con diferente aporte de biotina y teñidos con DAPI (Promedio \pm ee), (n=108)			
<u>Grupo</u>	<u>Área de corte nuclear</u> (μm^2)	<u>Área estimada de cromocentros</u> (μm^2)	<u>Fracción cromocéntrica</u> (%)
CONTROL	63.30 \pm 1.54	8.45 \pm 0.54	12.97 \pm 0.68
SUFICIENTE	56.82 \pm 1.33 *	6.60 \pm 0.40^a	11.32 \pm 0.52
DEFICIENTE	46.90 \pm 0.99**	4.43 \pm 0.28^{aa}	9.22 \pm 0.50^b

ANOVA de 1 vía, prueba post-hoc de Bonferroni:
******: $P < 0.00001$, Deficiente vs. Control y Suficiente; *****: $P < 0.002$, Suficiente vs Control
aa: $P < 0.00001$ Deficiente vs. Control; $P < 0.001$, Deficiente vs. Suficiente;
a: $P < 0.01$; Suficiente vs Control
b: $P < 0.00001$ Deficiente vs Control; $P < 0.03$, Deficiente vs. Suficiente

6.2 La marca H3K9me3 de heterocromatina pericéntrica se localiza en los cromocentros de los 3 grupos de hepatocitos. Se analizó en los cromocentros la presencia de la marca H3K9me3, enriquecida normalmente en regiones de heterocromatina pericéntrica. Las observaciones cualitativas mostraron una correspondencia precisa entre la tinción de DAPI y la marca para H3K9me3, observada en color rosado en el empalme de las imágenes (Figura 3).

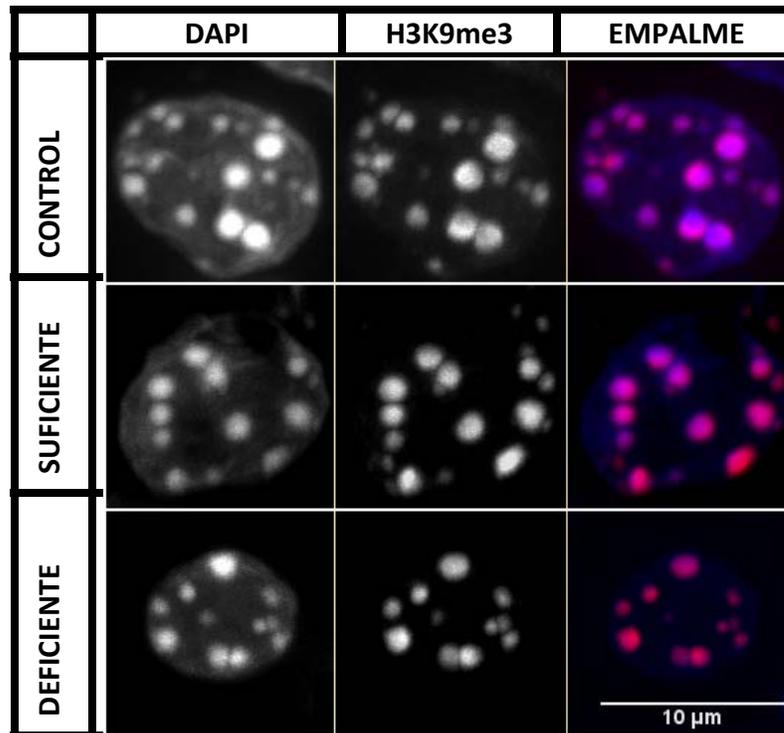


Fig. 3 La marca H3K9me3 asociada a heterocromatina pericéntrica se localiza en los cromocentros. Fotomicrografías que ilustran los cromocentros teñidos con DAPI y la inmunolocalización de la marca H3K9me3 en hepatocitos de los 3 grupos de ratones, Control, Suficiente y Deficiente de biotina. Nótese la co-localización perfecta (rosa) de los cromocentros teñidos con DAPI y la marca H3K9me3.

6.3 Los hepatocitos de ratones alimentados con la dieta carente en biotina conservan el tamaño celular y presentan disminución en la relación núcleo:citoplasma.

La tinción de núcleos con DAPI mostró disminución en el tamaño nuclear de los hepatocitos de los ratones alimentados con la dieta deficiente en biotina (Figura 2 y Cuadro 2), por lo que se decidió verificar si se trataba de la reducción del tamaño de toda la célula o exclusivamente del núcleo, mediante la determinación de la relación núcleo: citoplasma en cortes teñidos con hematoxilina-eosina. Los resultados confirmaron que el tamaño promedio de los hepatocitos no se modifica en función de las dietas y mostraron que la relación núcleo: citoplasma disminuye significativamente

en los hepatocitos de animales alimentados con dieta deficiente en biotina en 27% y 22% comparados con los grupos control y suficiente, respectivamente (Cuadro 3, Figura 4).

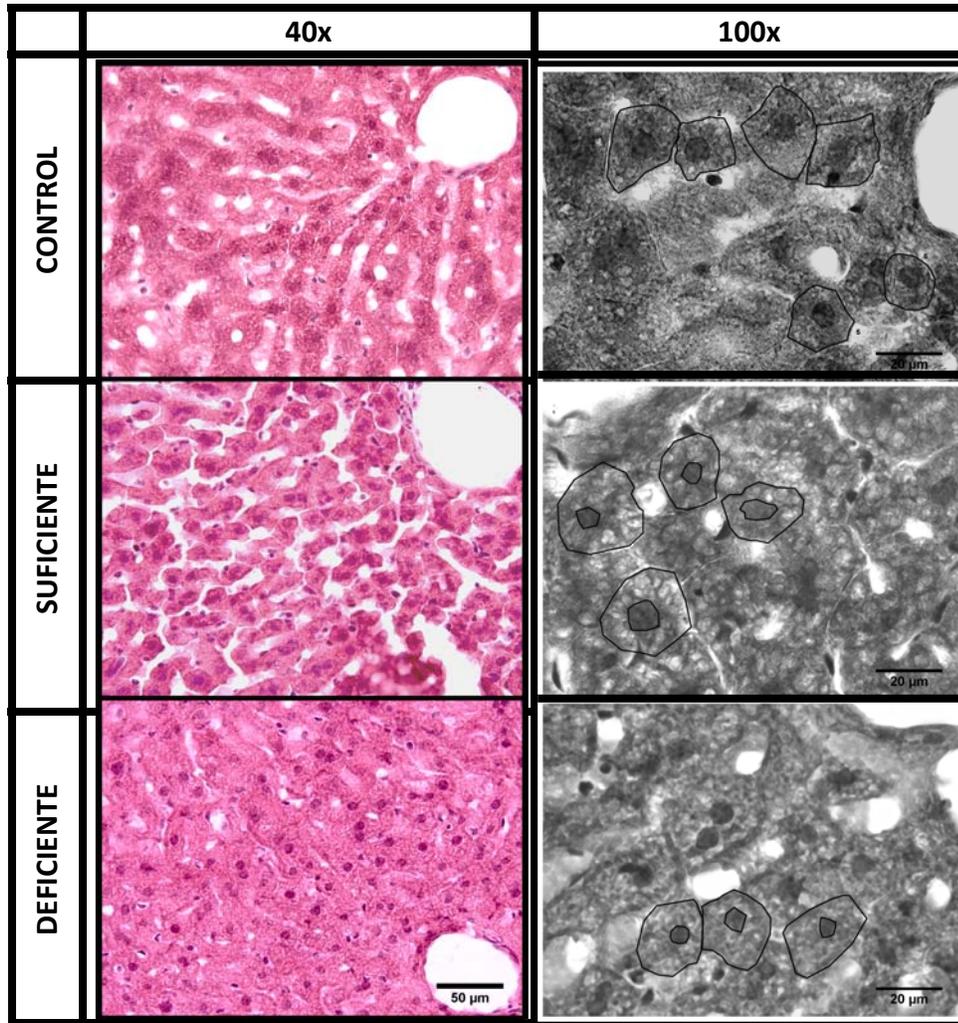


Fig.4 Efecto de la carencia nutricional de biotina en la relación núcleo:citoplasma. Fotomicrografías representativas de cortes de hígado de ratones alimentados con diferente aporte de biotina, teñidos con hematoxilina y eosina. Grupos Control, Suficiente y Deficiente de biotina. Nótese la marcada reducción en la relación núcleo: citoplasma en los hepatocitos del grupo deficiente. Las barras corresponden a 50 μm (40x) y 20 μm (100x).

Cuadro 3. Histomorfometría de hepatocitos.			
(Promedio \pm ee), (n=23 control,20 suficiente,26 deficiente)			
Grupo	Superficie CELULAR	Superficie NUCLEAR	Relación Núcleo: Citoplasma
	(μm^2)	(μm^2)	(%)
CONTROL	324 \pm 21.3	42.0 \pm 2.8	13.4 \pm 0.7
SUFICIENTE	338 \pm 20.7	41.3 \pm 3.1	12.4 \pm 0.7
DEFICIENTE	335 \pm 17.1	31.5 \pm 1.5^a	9.7 \pm 0.5^b

ANOVA de 1 vía, prueba post-hoc de Bonferroni:
a: $P < 0.01$ Deficiente vs. Control y Suficiente b: $P < 0.0002$ Def vs. Cont; $P < 0.01$ Def vs. Suf

7.0 Discusión:

La biotina es una vitamina capaz de modificar la expresión de genes y en años recientes se ha propuesto que dicho efecto lo ejerce mediante una acción epigenética, a través de la unión directa de biotina a las histonas [Hassan y Zemleni 2006]. Sin embargo, este último concepto es aún controvertido dado que muchos de los estudios se han realizado en modelos *in vitro* y existen dudas sobre las técnicas de análisis empleadas [Healy y cols. 2009]. Por consiguiente es necesario utilizar modelos y estrategias que permitan evaluar la propuesta del papel epigenético de la biotina en condiciones *in vivo*. En el presente trabajo se utilizó un modelo murino estandarizado de deficiencia nutricional de biotina [Báez-Saldaña y cols. 1998] que nos permitió evaluar los efectos de la carencia de este nutriente sobre el contenido relativo de heterocromatina en los hepatocitos. Este linaje celular es especialmente representativo debido a que expresa proteínas enzimáticas cuyos genes se saben modificados por biotina [Rodríguez-Meléndez y cols. 2001; Chauhan y Dakshinamurti 1991; Dakshinamurti y Li 1994]. En concordancia con este argumento, nuestros resultados mostraron la asociación del consumo de una dieta carente de biotina con la reducción del contenido relativo de cromocentros, así como con la disminución del área de corte nuclear y la relación núcleo:citoplasma. Los cambios descritos apoyan el empleo de este modelo animal para evaluar *in vivo* los efectos de esta vitamina en la modificación de la expresión genética y sugieren que la biotina podría ejercer una acción a nivel epigenético a través de alteraciones en la organización estructural de la cromatina.

La disminución de la fracción de cromocentros en el grupo de ratones deficientes sugiere que la biotina promueve la remodelación de la cromatina a través de la reorganización de la heterocromatina pericéntrica, la cual sí conserva la marca epigenética de metilación de histona H3K9me3. El argumento se consolida por las observaciones hechas en el grupo suficiente, cuyo contenido cromocéntrico fue similar al del grupo control, indicando que el efecto obedece exclusivamente a la falta de biotina. Podría plantearse que esta vitamina está involucrada en la compactación de la heterocromatina constitutiva, aunque resulta necesario primero analizar su efecto sobre otras proteínas que intervienen en este ensamblaje, como la MeCP2 y la HP1, y sobre la metilación misma del ADN. También sería interesante analizar, mediante inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), la estructura de la cromatina en genes hepáticos específicos que podrían ser los de la glucocinasa hepática y de la fosfoenolpirúvico-carboxicina, modificados opuestamente por la biotina [Chauhan y Dakshinamurti 1991; Romero-Navarro y cols. 1999]. Así mismo, analizar de manera global cambios epigenómicos mediante la técnica ChIP-on-chip (inmunoprecipitación y microarreglos) para comparar los perfiles epigenéticos entre las tres condiciones experimentales de aporte de biotina. Por otra parte, la disminución de cromocentros también podría representar un menor contenido de ADN acomodado en estos sitios, sugiriendo que determinadas regiones del ADN se hubieran relajado. También esto tendría que verificarse empleando diferentes secuencias satélite- γ de cromocentros murinos y mediante FISH revisar si todas siguen presentes o algunas se salen de los cromocentros.

De cualquier modo, la reorganización de cromocentros observada en este trabajo nos plantea por sí misma, que una molécula exógena que procede de la dieta modifica la organización de sitios de heterocromatina constitutiva, mismos que hasta ahora son considerados como sinónimo de estabilidad genómica.

Los resultados también mostraron que el tamaño nuclear de los hepatocitos disminuyó significativamente en los ratones deficientes de biotina. Se sabe que en este linaje celular el área nuclear se asocia directamente con el aumento del índice proliferativo, ya sea por el crecimiento normal del hígado en los ratones jóvenes [Miljutina y cols. 1978], o por procesos malignos [Deprez y cols. 1993; Ikeguchi y cols. 1998]; en ambos procesos debido a que el núcleo de estas células se incrementa antes de entrar en mitosis [Carrière y cols. 1961]. Además, está reportado que la biotina es esencial para la proliferación celular y que su deficiencia arresta a las células en fase G0 [Dakshinamurti y cols 1985; Zempleni y Mock 2001; Takechi y cols. 2008]. De hecho el modelo murino de deficiencia de biotina empleado en este trabajo se asocia con alteración del crecimiento hepático [Báez-Saldaña y Ortega 2004] y con disminución en la proliferación celular inducida por mitógenos [Báez-Saldaña y cols. 1998]. Por lo tanto, el menor tamaño nuclear observado en los ratones deficientes concuerda con la reducción del estado proliferativo de los hepatocitos debido a la falta de biotina.

Finalmente, se sabe que alteraciones nutricionales en varias etapas de la vida pueden afectar el epigenoma de un individuo de manera permanente siendo más notorio el efecto cuando se imponen durante etapas del desarrollo fetal. Tal es el caso

de los defectos en la formación del tubo neural por un aporte deficiente de ácido fólico [Jaenisch y Bird 2003] así como la hipermetilación génica y consecuente modificación fenotípica en los ratones *Agouti* provocada por la suplementación de las madres gestantes con agentes donadores de grupos metilo [Waterland y Jirtle 2003]. En general, nuestro trabajo concuerda con este tipo de efectos y sugiere que la carencia de biotina es capaz de asociarse a reacomodos de la cromatina aún cuando haya sido iniciada en la etapa juvenil. Resultaría interesante analizar, por una parte, si estos resultados se agudizan al provocar la deficiencia durante la gestación además de determinar las consecuencias que tendría en la etapa adulta; y por la otra, si las observaciones del presente trabajo se revierten al restablecer el suministro de biotina.

8.0 CONCLUSIÓN:

Los resultados obtenidos en el presente estudio, sugieren que la biotina tiene efectos en la organización de la heterocromatina. Utilizando un modelo *in vivo* se observó que la deficiencia nutricional de biotina se asocia con la disminución en el contenido de cromocentros en hepatocitos murinos y con la reducción del tamaño nuclear de estas células. Está claro que se requieren más estudios para explicar las acciones moduladoras de esta vitamina en la expresión de genes.

de los defectos en la formación del tubo neural por un aporte deficiente de ácido fólico [Jaenisch y Bird 2003] así como la hipermetilación génica y consecuente modificación fenotípica en los ratones *Agouti* provocada por la suplementación de las madres gestantes con agentes donadores de grupos metilo [Waterland y Jirtle 2003]. En general, nuestro trabajo concuerda con este tipo de efectos y sugiere que la carencia de biotina es capaz de asociarse a reacomodos de la cromatina aún cuando haya sido iniciada en la etapa juvenil. Resultaría interesante analizar, por una parte, si estos resultados se agudizan al provocar la deficiencia durante la gestación además de determinar las consecuencias que tendría en la etapa adulta; y por la otra, si las observaciones del presente trabajo se revierten al restablecer el suministro de biotina.

8.0 CONCLUSIÓN:

Los resultados obtenidos en el presente estudio, sugieren que la biotina tiene efectos en la organización de la heterocromatina. Utilizando un modelo *in vivo* se observó que la deficiencia nutricional de biotina se asocia con la disminución en el contenido de cromocentros en hepatocitos murinos y con la reducción del tamaño nuclear de estas células. Está claro que se requieren más estudios para explicar las acciones moduladoras de esta vitamina en la expresión de genes.

9.0 REFERENCIAS:

- Báez-Saldaña A, Camacho-Arroyo I, Espinosa-Aguirre JJ, Neri-Gómez T, Rojas-Ochoa A, Guerra-Araiza C, Larrieta E, Vital P, Díaz G, Chavira R, Fernandez-Mejia C (2009-A) **Biotin deficiency and biotin excess: effects on the female reproductive system.** *Steroids* 74: 863-9.
- Báez-Saldaña A, Gutiérrez-Ospina G, Chimal-Monroy J, Fernandez-Mejia C, Saavedra R (2009-B) **Biotin deficiency in mice is associated with decreased serum availability of insulin-like growth factor-I.** *Eur J Nutr* 48: 137-44.
- Báez-Saldaña A, Ortega E (2004) **Biotin deficiency blocks thymocyte maturation, accelerates thymus involution, and decreases nose-rump length in mice.** *J Nutr* 134: 1970-7.
- Báez-Saldaña A, Díaz G, Espinoza B, Ortega E (1998) **Biotin deficiency induces changes in subpopulations of spleen lymphocytes in mice.** *Am J Clin Nutr* 67: 431-7.
- Bailey LM, Ivanov RA, Wallace JC, Polyak SW (2008) **Artifactual detection of biotin on histones by streptavidin.** *Anal Biochem* 373: 71-7.
- Boeckx RL, Dakshinamurti K (1975) **Effect of biotin on ribonucleic acid synthesis.** *Biochim Biophys Acta* 383: 282-289.
- Camporeale G, Oommen AM, Griffin JB, Sarath G, Zemleni J (2007) **K12-biotinylated histone H4 marks heterochromatin in human lymphoblastoma cells.** *J Nutr Biochem* 18: 760-8.
- Carrière R, Leblond CP, Messier B (1961) **Increase in the size of liver cell nuclei before mitosis.** *Exp Cell Res* 23: 625-28.
- Chapman-Smith, A. and Cronan, J.E., Jr (1999) **Molecular biology of biotin attachment to proteins.** *J. Nutr* 129: 477S–84S.
- Chauhan J, Dakshinamurti K (1991) **Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats.** *J Biol Chem* 266: 10035-8.
- Dakshinamurti K (2005) **Biotin-a regulator of gene expression.** *J Nutr Biochem* 16: 419-23. Review.
- Dakshinamurti K, Chalifour L, Bhullar RP (1985) **Requirement for biotin and the function of biotin in cells in culture.** *Ann N Y Acad Sci* 447:38-55.
- Dakshinamurti K, Li W (1994) **Transcriptional regulation of liver phosphoenolpyruvate carboxykinase by biotin in diabetic rats.** *Mol Cell Biochem* 132: 127-32.
- Dakshinamurti K, Mistry SP (1963) **Tissue and intracellular distribution of biotin-C-1400H in rats and chicks.** *J Biol Chem* 238: 294-6.
- Deprez C, Vangansbeke D, Fastrez R, Pasteels JL, Verhest A, Kiss R (1993) **Nuclear DNA content, proliferation index, and nuclear size determination in normal and cirrhotic liver, and in benign and malignant primary and metastatic hepatic tumors.** *Am J Clin Pathol.* 99: 558-65.
- Fernandez-Mejia C (2005) **Pharmacological effects of biotin.** *J Nutr Biochem* 16: 424-7. Review.
- Friedrich W (1988) **Vitamins.** Ed. Walter de Gruyter, Berlin- New York, 1998
- Guenatri M, Bailly D, Maison C y Almounzi G (2004) **Mouse centric and pericentric satellite repeats form distinct functional heterchromatin.** *J Cell Biol* 166: 493-505
- Hassan YI, Zemleni J (2006) **Epigenetic regulation of chromatin structure and gene function by biotin.** *J Nutr* 136: 1763-5. Review.
- Healy S, Perez-Cadahia B, Jia D, McDonald MK, Davie JR, Gravel, RA (2009) **Biotin is not a natural histone modification.** *Biochim Biophys Acta* 1789: 719-33.
- Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H, Blauw GJ, Susser ES, Slagboom PE, Lumey LH (2008) **Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans.** *PNAS* 105: 17046–17049.
- Ikeguchi M, Sato N, Hirooka Y, Kaibara N (1998) **Computerized nuclear morphometry of hepatocellular carcinoma and its relation to proliferative activity.** *J Surg Onco* 68: 225-30.
- Jaenisch R, Bird A (2003) **Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals.** *Nat Genet* 33 Suppl: 245-54. Review.
- Kouzarides T (2007) **Chromatin modifications and their function.** *Cell* 128: 693–705.

- Kubista M, Akerman B, Nordén B (1987) **Characterization of interaction between DNA and 4',6-diamidino-2-phenylindole by optical spectroscopy.** *Biochemistry* 26(14):4545-53.
- Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T (2001) **Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins.** *Nature* 410: 116-20.
- Maison C y Almouzni G (2004) **HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 296-304.
- Manzini G, Barcellona ML, Avitabile M, Quadrioglio F (1983) **Interaction of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) with natural and synthetic nucleic acids.** *Nucleic Acids Res* 11: 8861-76.
- Martens JH, O'Sullivan RJ, Braunschweig U, Opravil S, Radolf M, Steinlein P, Jenuwein T (2005) **The profile of repeat-associated histone lysine methylation states in the mouse epigenome.** *EMBO J* 24: 800-12.
- Miljutina NA, Kogan EM, Nekhljudova MA (1978) **Pulsed pattern of proliferation in liver parenchyma of young mice Natural synchronization of DNA-synthesizing hepatocytes.** *Virchows Arch. B Cell Path.* 29: 179-190.
- Müller M, Kersten S. (2003). **Nutrigenomics: goals and strategies.** *Nat Rev Genet* 4: 315-22. Review.
- Narang MA, Dumas R, Ayer LM, Gravel RA (2004) **Reduced histone biotinylation in multiple carboxylase deficiency patients: a nuclear role for holocarboxylase synthetase.** *Hum Mol Genet* 2004 Jan 1;13(1): 15-23.
- NRC (National Research Council) (1994) **Nutrient requirements of laboratory animals. A report of the Committee on Animal nutrition.** Washington, D.C.; National Academy Press p.82.
- Pacheco-Alvarez D, Solórzano-Vargas RS, González-Noriega A, Michalak C, Zemleni J, León-Del-Río A (2005) **Biotin availability regulates expression of the sodium-dependent multivitamin transporter and the rate of biotin uptake in HepG2 cells.** *Mol Genet Metab* 85: 301-7.
- Peters, AH, Kubicek S, Mechtler K, O'Sullivan RJ, Derijck AA, Perez-Burgos L, Kohlmaier A, Opravil S, Tachibana M, Shinkai Y, Martens JHA, Jenuwein T. (2003) **Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin.** *Mol. Cell.* 12:1577–1589.
- Petrelli F, Marsili P, Moretti P (1976) **RNA, DNA, histones and interactions between histone proteins and DNA in the liver of biotin deficient rats.** *Biochem Exp Biol* 12: 461-65.
- Petrelli F, Coderoni S, Moretti P, Paparelli M (1978) **Effect of biotin on phosphorylation, acetylation, methylation of rat liver histones.** *Mol Biol Rep* 4: 87-92.
- Recillas-Targa F, Escamilla-Del-Arenal M (2004) **Participación de la estructura de la cromatina en la regulación de la expresión génica.** *Mensaje Bioquím,* 28: 173-201.
- Recillas-Targa F (2008) **Epigenetic regulation and therapeutic approaches in cancer.** *Curr Top Med Chem* 8: 1367-78. Review.
- Rice JC, Briggs SD, Ueberheide Barber CM, Shabanowitz J, Hunt DF, Shinkai Y, Allis CD. (2003). **Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains.** *Mol.Cell.* 12:1591–98.
- Rodríguez-Meléndez R, Cano S, Méndez ST, Velázquez A (2001) **Biotin regulates the genetic expression of holocarboxylase synthetase and mitochondrial carboxylases in rats.** *J. Nutr* 131: 1909–13.
- Rodríguez-Melendez R, Camporeale G, Griffin JB, Zemleni J (2003) **Interleukin-2 receptor-gamma - dependent endocytosis depends on biotin in Jurkat cells.** *Am J Physiol Cell Physiol* 284: C415-21.
- Rodríguez-Melendez R, Zemleni J (2003) **Regulation of gene expression by biotin (review).** *J Nutr Biochem.* 2003 Dec;14(12): 680-90. Review.
- Romero-Navarro G, Cabrera-Valladares G, German MS, Matschinsky FM, Velazquez A, Wang J, Fernandez-Mejia C (1999) **Biotin regulation of pancreatic glucokinase and insulin in primary cultured rat islets and in biotin-deficient rats.** *Endocrinology* 140 (10): 4595.
- Solórzano-Vargas S, Pacheco-Álvarez D, León-Del-Río A (2002) **Holocarboxylase synthetase is an obligate participant in biotin mediated regulation of its own expression and of biotin-dependent carboxylases mRNA levels in human cells.** *Proc Natl Acad Sci* 99: 5325-30.
- Stanley JS, Griffin JB, Zemleni J (2001) **Biotinylation of histones in human cells.** *Eur J Biochem* 2001, 268: 5424-29.

- Takechi R, Taniguchi A, Ebara S, Fukui T, Watanabe T (2008) **Biotin deficiency affects the proliferation of human embryonic palatal mesenchymal cells in culture.** *J. Nutr.* 138: 680–84.
- Vázquez-Nin GH, Echeverría Martínez OM, Jiménez García LF (2003) **El núcleo interfásico. Morfología y función.**, en Jiménez LF, Merchant H, Biología celular y molecular. Pearson Educación , México.
- Vilches-Flores A, Tovar AR, Marin-Hernandez A, Rojas-Ochoa A, Fernandez-Mejia C (2009) **Biotin increases glucokinase expression via soluble guanylate cyclase/protein kinase G, adenosine triphosphate production and autocrine action of insulin in pancreatic rat islets.** *J Nutr Biochem* (en imprenta)
- Watanabe T, Suzuki A, Ebara S, Negoro M, Fukui T. (2010). **Biochemical alterations in the palatal processes in fetuses of biotin-deficient mice.** *Congenit Anom (Kyoto)* 50:21-8.
- Waterland RA, Jirtle RL (2003) **Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation.** *Mol Cell Biol* 23: 5293-300.
- Wiedmann S, Eudy JD, Zempleni J (2003) **Biotin supplementation increases expression of genes encoding interferon-gamma, interleukin-1beta, and 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase, and decreases expression of the gene encoding interleukin-4 in human peripheral blood mononuclear cells.** *J Nutr* 133: 716-9.
- Wiedmann S, Rodriguez-Melendez R, Ortega-Cuellar D, Zempleni J (2004) **Clusters of biotin-responsive genes in human peripheral blood mononuclear cells.** *J Nutr Biochem* 15: 433-9.
- Zempleni J, Gralla M, Camporeale G, Hassan YI (2009) **Sodium-dependent multivitamin transporter gene is regulated at the chromatin level by histone biotinylation in human Jurkat lymphoblastoma cells.** *J Nutr.* 2009 Jan;139(1): 163-6.
- Zempleni J, Helm RM, Mock DM (2001) **In vivo biotin supplementation at a pharmacologic dose decreases proliferation rates of human peripheral blood mononuclear cells and cytokine release.** *J Nutr* 131: 1479-84.
- Zempleni J, Mock DM (2001) **Biotin homeostasis during the cell cycle.** *Nutr Res Rev.* 14: 45-64.