



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DE LA BIOTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES EN EL
ISLOTE PANCREÁTICO DURANTE EL PERIODO DE POST-
ABLACTACIÓN.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

GUSTAVO RAFAEL RAMÍREZ MONDRAGÓN

MÉXICO, D.F.

2015





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Jesús Fernando Montiel Aguirre

VOCAL: Profesor: Martha Leticia Jiménez Pardo

SECRETARIO: Profesor: María Cristina Fernández Mejía

1er. SUPLENTE: Profesor: José Pedraza Chaverri

2° SUPLENTE: Profesor: Tzvetanka Dimitrova Dinkova

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, DEPARTAMENTO DE MEDICINA GENÓMICA Y TOXICOLOGÍA AMBIENTAL, UNIDAD DE GENÉTICA DE LA NUTRICIÓN.

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

ASESOR DEL TEMA:

Dra. María Cristina Fernández Mejía

SUSTENTANTE:

Gustavo Rafael Ramírez Mondragón

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis fue dirigida por:

Dra. María Cristina Fernández Mejía

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental
Instituto de Investigaciones Biomédicas
UNAM/ Instituto Nacional de Pediatría

Este trabajo de tesis fue realizado en la Unidad de Genética de la Nutrición del Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM / Instituto Nacional de Pediatría

El trabajo realizado para esta tesis fue posible gracias al apoyo de:

Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (DGAPA) PAPIIT-
IN210714

Se agradece el apoyo técnico de:

M. en C. Wilma Inés Tixi Verdugo, Biol. Everardo Ruiz Mora, Biol. Sergio Rafael Patiño Carrillo y Biol. Maura Flores Aguilar, Unidad de Genética de la Nutrición del Instituto de Investigaciones Biomédicas

ÍNDICE

A. RESUMEN.....	7
B. INTRODUCCIÓN.....	9
<i>B.1. El Páncreas.....</i>	<i>9</i>
<i>B.1.1. Organogénesis Pancreática.....</i>	<i>9</i>
<i>B.2. Desarrollo postnatal del islote pancreático.....</i>	<i>10</i>
<i>B.2.1. Ventana Crítica postnatal.....</i>	<i>11</i>
<i>B.3. Los islotes pancreáticos.....</i>	<i>11</i>
<i>B.3.1. Composición de los islotes pancreáticos.....</i>	<i>11</i>
<i>B.3.2. Arquitectura de los islotes pancreáticos.....</i>	<i>12</i>
<i>B.4. La Célula beta (β).....</i>	<i>12</i>
<i>B.5. Insulina.....</i>	<i>13</i>
<i>B.5.1. Estructura de la insulina.....</i>	<i>13</i>
<i>B.5.2. Síntesis de la insulina.....</i>	<i>13</i>
<i>B.5.3. Transcripción y Regulación.....</i>	<i>14</i>
<i>B.5.4. Secreción de Insulina.....</i>	<i>15</i>
<i>B.6. Biotina.....</i>	<i>19</i>
<i>B.6.1. Características fisicoquímicas.....</i>	<i>19</i>
<i>B.6.2. Metabolismo y Absorción.....</i>	<i>19</i>
<i>B.6.3. Rol Clásico de la Biotina como Cofactor de Carboxilasas.....</i>	<i>20</i>
<i>B.6.4. Efectos de la Biotina sobre la Expresión Genética.....</i>	<i>20</i>
<i>B.7. Mecanismos de Acción.....</i>	<i>21</i>
<i>B.7.1. Activación de la Guanilato Ciclasa Soluble.....</i>	<i>21</i>
<i>B.7.2. Biotinilación de Histonas.....</i>	<i>22</i>
C. Antecedentes Directos.....	23
D. Planteamiento del Problema.....	24
E. Hipótesis.....	24
F. Objetivo.....	25
G. Objetivo Particular.....	25
H. Métodos.....	25
<i>H.1. Modelo Experimental.....</i>	<i>25</i>
I. Resultado.....	28
<i>I.1. Efectos de la suplementación con biotina por 24 hrs. sobre la expresión del RNAm de factores transcripcionales.....</i>	<i>28</i>

I.2. Efectos de la suplementación con biotina por 24 hrs. sobre la expresión del RNAm de proteínas relacionadas con secreción de insulina.....29

I.3. Efectos de la suplementación con biotina por 24 hrs. sobre la expresión del RNAm de genes relacionados con la morfología del islote pancreático.....30

J. Discusión de Resultados.....31

K. Conclusiones.....33

L. Bibliografía.....34

RESUMEN

La biotina es una vitamina hidrosoluble del complejo B que, además de participar como grupo prostético de las carboxilasas, a concentraciones farmacológicas posee efectos sistémicos sobre la proliferación, el desarrollo, la reproducción y el metabolismo. Estudios en nuestro laboratorio han encontrado que la suplementación de biotina en la dieta durante ocho semanas aumenta la secreción de insulina en respuesta a la glucosa y la expresión de genes críticos en el desarrollo del islote pancreático, así como cambios en la citoarquitectura del mismo. En estudios previos se analizó cuál es el efecto de dosis farmacológicas de biotina sobre la maduración del islote pancreático en periodo de post-ablactación, un periodo en que se efectúan los eventos cruciales que determinan su funcionamiento en la etapa adulta. Los estudios revelaron disminuciones en la expresión del RNAm de genes críticos para el funcionamiento del islote que no son concordantes ni con los aumentos en la secreción de insulina ni con la tolerancia a la insulina que se observa en estos ratones. Una explicación de estas discrepancias podría deberse a un abrupto aumento en la expresión del mensajero en tiempos anteriores a la semana de tratamiento, dando como consecuencia una respuesta de retroalimentación negativa sobre la transcripción, por lo que este trabajo se propone analizar esta hipótesis.

Ratones BALB/cAnN Hsd machos recién destetados fueron alimentados con una dieta control o con una dieta suplementada con biotina durante las 24 horas posteriores a la ablactación. En los islotes pancreáticos obtenidos de estos ratones evaluamos la expresión de genes del islote pancreático por PCR cuantitativo. Los resultados encontraron que la suplementación con biotina disminuyó la expresión del RNAm de factores transcripcionales que regulan la expresión y secreción de insulina, como *Foxa2* y *Pdx-1*. También disminuyó el RNAm del gen de la insulina (*Ins2*) y del canal de calcio dependiente de voltaje tipo L subunidad alfa 1d (*Cacna1d*), genes que de igual manera participan en la expresión y secreción de insulina; al igual que la abundancia del mensajero de actina beta (*Actb*) y *cadherina* (*Cdh1*), genes que participan en el desarrollo y estructuración del islote pancreático. En contraste la administración de la dieta aumentó la expresión relativa del mensajero de glucocinasa (*Gck*), una enzima

que desempeña un rol importante en el metabolismo de glucosa, y de la molécula de adhesión neural 1 (*Ncam1*) indispensable en el mantenimiento de la cito-arquitectura del islote pancreático.

En conclusión, la suplementación con biotina es capaz de modificar desde el primer día de administración la expresión de genes que regulan la producción y secreción de insulina, así como de aquellos que participan en la regulación de la cito-arquitectura del islote pancreático. Estos resultados no apoyan nuestra hipótesis inicial en la cual se propuso que la disminución de la expresión de genes observada a los siete días de tratamiento podría deberse a una respuesta de retroalimentación negativa por un aumento abrupto en la expresión de estos genes en etapas tempranas anteriores a los 7 días de tratamiento. Datos recientemente obtenidos en nuestro laboratorio otorgan claves para la interpretación de estos resultados.

INTRODUCCIÓN

El Páncreas

El páncreas es una glándula mixta compuesta por una parte exocrina y una parte endocrina. La parte exocrina está constituida por una población celular pequeña que comprende el sistema ductal intralobular e intercalado y también está formada por el tejido acinar. Los acinos pancreáticos son cúmulos celulares que sintetizan, almacenan y secretan enzimas digestivas y zimógenos que consecuentemente son vertidos al duodeno y utilizados en la digestión. La parte endocrina consiste de grupos de células secretoras de hormonas que se encuentran dispersas en el tejido exocrino, estos grupos son denominados islotes de Langerhans o islotes pancreáticos[1], [2].

Organogénesis pancreática

El páncreas tiene su origen embriológico como dos brotes que se desarrollan en las secciones dorsal y ventral del duodeno, que se fusionan para formar un órgano único. El brote ventral forma la parte posterior de la cabeza del páncreas, mientras que el brote dorsal comprende el resto del órgano [3].

El endodermo, tejido del cual surge el páncreas, consiste en una capa celular que se especifica durante la gastrulación. Los genes requeridos para la formación del endodermo incluyen a Wnt/ β -catenin, Nodal, GATA4/6, FoxA2, Sox17 y Mix [4]–[6].

La diferenciación del dominio pancreático dentro del endodermo intestinal es mediada por la combinación de las señales derivadas por el mesodermo, incluyendo a TGF β (transforming growth factor), ácido retinoico y factores de crecimiento del fibroblasto (FGF) [4]. La diferenciación del tejido puede observarse al día embrionario 8.5, con la expresión de Pdx-1 (pancreatic duodenal homeobox 1) en dos dominios ventrales y, después, con la expresión en el dominio dorsal en 8.5-8.75. Al día 9.5 se observa la generación de brotes en el epitelio que rodea a la mesénquima, los progenitores multipotentes que dan origen a las células endocrinas, ductales, acinares se encuentran localizadas en los extremos emergentes y marcadas por varios factores transcripcionales, entre ellos Pdx-1 [7].

Al día 9.5 embrionario se observan algunas células endocrinas positivas a glucagón. La mayoría de las células endocrinas (α , β , δ , ϵ y PP) con capacidad de expresar hormonas que conforman a los islotes emergen alrededor del periodo embrionario que comprende a los días 13.5-14.5. En este periodo también es posible observar la aparición de células acinares. Conforme la embriogénesis progresa, el crecimiento del órgano y la diferenciación celular continua, formando los cúmulos celulares del tejido acinar y los islotes pancreáticos de células endocrinas derivadas de la delaminación del epitelio [6], [8].

Recientemente se ha observado que varios factores transcripcionales desempeñan roles críticos durante el desarrollo pancreático, la distinción de linajes celulares y la función pancreática, entre ellos la familia forkhead y Pdx-1 [6].

La familia de factores transcripcionales Forkhead incluye a Foxa1 (HNF3 α), Foxa2 (HNF3 β) y Foxa3 (HNF3 γ). Foxa2 es el primero en ser expresado al día embrionario 6.5 en el endodermo intestinal y la notocorda precediendo a la formación del páncreas [9]. Se ha observado que errores en la expresión de Foxa2 derivan en la inviabilidad del embrión [10] determinando que Foxa2 es una proteína que ejerce un papel clave en la morfogénesis pancreática [11].

Pdx-1 es un miembro del conjunto de genes Parahox, importantes en el desarrollo embrionario, que se halla regulado directamente por Foxa2 [12], [13]. Es expresado en el día embrionario 8.5, en las regiones del endodermo dorsal y ventral que dan origen a los brotes pancreáticos [14].

Estudios tempranos en ratones con expresión nula de Pdx-1, mostraron agénesis pancreática [15]. Estudios posteriores sugieren que mientras que Pdx-1 no es esencial para la inducción del desarrollo pancreático, si es requerido para el crecimiento y desarrollo del linaje pancreático [16]. En ratones sin modificaciones, la expresión de Pdx-1 continua en el epitelio pancreático y se ve progresivamente restringido a las células beta pancreáticas y a reducidos subgrupos de célula delta y PP [17].

Desarrollo postnatal del islote pancreático.

Como se señaló en la sección anterior, el islote pancreático se diferencia en las etapas embrionarias [18], es en este lapso de tiempo cuando se genera la diversidad celular de linaje pancreático. Pero es hasta después de la ablactación cuando el desarrollo normal de la célula beta culmina en dos eventos cruciales de maduración:

- A) Se perfecciona el mecanismo secretor de glucosa en respuesta a la glucosa y se aumenta la producción de insulina por célula, lo que resulta en la maduración de la secreción de insulina en respuesta a glucosa [19], [20].
- B) Se aumenta el número de células beta [21], [22], y se lleva a cabo la remodelación del islote pancreático, el cual adquiere la citoarquitectura típica de un islote adulto [23].

Dichos procesos determinan la maduración del islote, lo que marca el final de los procesos de desarrollo encaminados a alcanzar la plena capacidad funcional de éstos (Gilbert, 2003), este periodo ha recibido el nombre de ventana crítica [24], [25].

Ventana crítica postnatal

Una ventana crítica es definida como un periodo de cambios importantes tanto estructurales como funcionales que se producen durante el desarrollo normal de un órgano cuando este es expuesto a cambios en su medio, lo cual es capaz de originar consecuencias en la vida tardía [24].

El periodo post-natal es una ventana crítica, en donde acontecen cambios drásticos en la forma de vida, que empiezan con el nacimiento, el periodo de lactancia y finalmente el destete. El desarrollo post-natal del islote es de vital importancia para alcanzar un control efectivo de la glucemia en etapas posteriores de la vida. Al nacer los islotes muestran una secreción de insulina escasa y sin respuesta a la glucosa, comparada con las células beta de los animales adultos [26], [27]. Esta condición refleja una inmadurez funcional. No se encuentra bien determinado cuando es el momento en el que se adquiere la secreción de insulina estimulada por glucosa, sin embargo, se cree que este cambio está dado en etapas tempranas del destete y podría estar asociada por una reorganización morfofisiológica del islote, lo cual también se observa en este periodo.

Se sabe que el tamaño de los islotes, su número y composición, pueden ser alterados en respuesta a cambios nutricionales [28]. Se ha encontrado que las dietas con un alto contenido de carbohidratos durante la lactancia pueden causar hiperinsulinemia y obesidad en las ratas adultas. Estas modificaciones podrían derivar en un alto riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 [29], [30]. También, la desnutrición proteica e hipercalórica afecta el desarrollo del islote y favorece el desarrollo de hiperglucemia [28], [29], [31]–[33]

Los islotes pancreáticos

Los islotes están conformados por una variedad de tipos celulares, incluyendo células endoteliales, nervios, fibroblastos y principalmente células endocrinas [1], [34].

Composición de los islotes pancreáticos

El islote contiene al menos 5 tipos de células secretoras: células alfa (α) secretoras de glucagón, células beta (β) que secretan insulina, células delta (δ) secretoras de somatoestatina, las células (ϵ) que secretan grelina y las células PP que secretan polipéptido pancreático. En humanos, las células beta corresponden alrededor de un 54% de la población celular, 35% a células alfa y 11% a células delta [35]. En el ratón la proporción varía ligeramente, las células beta comprenden un 75% de la población celular del islote pancreático, las células alfa

conforman el 19% y las delta 6% [35]. Las células PP secretoras de polipéptido pancreático, el cual se propone funge como auto regulador de la función secretora, varían de acuerdo a la región del páncreas, las células épsilon son abundantes durante el desarrollo embrionario y el nacimiento, mientras que su abundancia es menor en la etapa post-natal.

Arquitectura de los islotes pancreáticos

La composición celular de los islotes pancreáticos no es la única característica que difiere en base a la especie, sino también la cito-arquitectura (estructura de organización celular). Los roedores, en particular los murinos, presentan islotes en cuya conformación se observan células beta en el centro y las otras poblaciones celulares se hallan replegadas hacia la periferia, donde los bordes se ven ocupados por las células alfa. En contraste, la distribución celular en los islotes pancreáticos humanos presenta una cito-arquitectura homogénea, en la cual las células beta y no-beta se encuentran dispersas sin organización aparente [36]. Se ha especulado que la diferencia entre organización y composición celular del islote pancreático en diferentes modelos puede estar relacionada a la función de los mismos [35].

También se ha encontrado que otras características de los islotes difiere entre especies. Estudios realizados en humano y ratón, sugieren que en los primeros, las concentraciones intracelulares de calcio se incrementan en respuesta a un menor umbral de concentraciones de glucosa. Asimismo, las oscilaciones de calcio intracelular en los islotes humanos, no se encuentran coordinadas de la misma manera como se observan en los islotes de ratón, lo cual es atribuido a la diferencia en observada en la composición celular[37].

La célula beta (β)

Las células beta son un tipo de célula endocrina altamente especializadas que se localizan en los islotes de Langerhans, cuya función es la de controlar la síntesis, procesamiento, almacenamiento y secreción de insulina en respuesta a la concentración de glucosa y otros nutrientes específicos en la circulación sanguínea. En el funcionamiento de las células beta tienen un papel importante los factores transcripcionales quienes en conjunto tienen la tarea de modular la expresión de la insulina y otras proteínas que colaboran en el proceso de síntesis y secreción de la hormona con base en las demandas metabólicas del organismo [38], [39].

Insulina

Es una hormona peptídica crítica en la regulación del metabolismo que además tiene acciones sobre la división y crecimiento celular a través de sus efectos mitogénicos [40].

Estructura de la insulina

La insulina humana es una proteína dimérica de dos cadenas polipeptídicas denominadas A y B, de 21 y 30 aminoácidos respectivamente, unidas por un par de puentes disulfuro [40], [41] (figura 1).

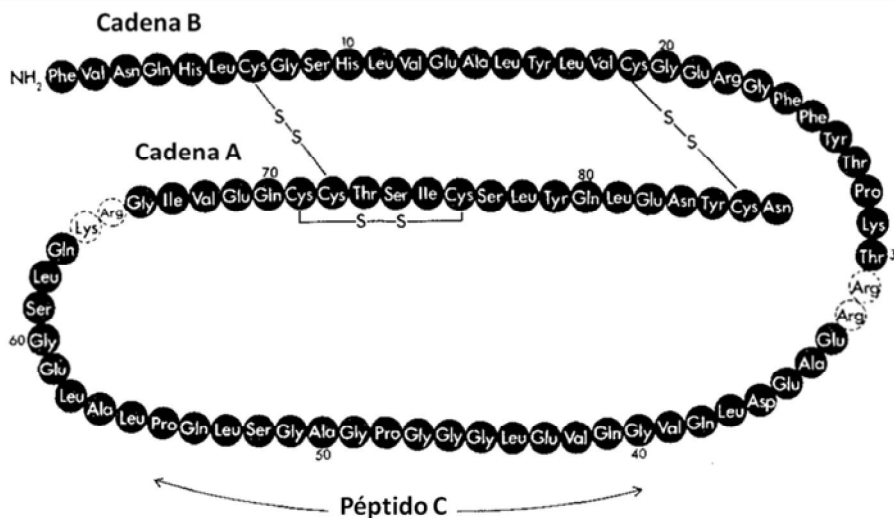


Fig.1 Estructura covalente de la proinsulina humana.

Modificada de Oyer et. al. 1971 [41]

Síntesis de la insulina

El precursor de la insulina, la proinsulina es sintetizada en las células beta del islote pancreático. La proinsulina se sintetiza en los ribosomas del retículo endoplasmático rugoso a partir de mRNA en la forma de pre-proinsulina, la cual está formada por la síntesis secuencial del péptido señal, la cadena B, el péptido de unión C y la cadena A. El péptido señal interactúa con la partícula de reconocimiento de señal, una ribonucleoproteína del citosol que facilita la separación de la preproinsulina naciente del compartimiento citosólico y la envía a la vía secretora. La preproinsulina se transloca al lumen del retículo endoplasmático rugoso, donde una peptidasa especializada escinde el péptido señal. La remoción del péptido señal produce la proinsulina, que adquiere su característica conformación tridimensional, al doblarse y formar tres puentes disulfuro en el retículo plasmático[1], [42]. Vesículas secretoras transfieren la

proinsulina del retículo endoplasmático rugoso al aparato de Golgi (AG), donde la proinsulina es cortada por las prohormona convertasas PC2 y PC1/3 para formar la insulina y el péptido C, éstos se empaquetan en gránulos cuyo ambiente acuoso rico en zinc y calcio favorece la formación de hexámeros de insulina de arreglo cristalino romboédrico alrededor de una molécula de zinc (Zn²⁺). Estos gránulos pueden almacenarse por periodos largos antes de ser liberados, cada célula beta puede contener de 10000 a 13000 gránulos secretorios[39], [41]–[45].

Transcripción y regulación

La insulina está codificada por un solo gen en los humanos (INS, cromosoma 11p15.5) y dos genes en los ratones (Ins1, 19, 49.0 cM e Ins2, 7, 69.1 cM). Existen diversos factores cis-activadores y trans-activadores asociados a la activación específica en la célula beta del enhancer del gen de la insulina. Además, la misma insulina puede actuar de forma autócrina para regular esta activación mediada por enhancers [46].

El enhancer de este gen está constituido por los elementos A, C y E, cuyos motivos de unión pueden encontrarse en el gen de roedores y humanos. Estos sitios son estimulados por una gran variedad de factores transcripcionales que actúan de manera concertada y sinérgica formando importantes redes transcripcionales, que no sólo regulan la expresión del gen de insulina, sino también la de otros genes íntimamente relacionados con los procesos de síntesis y secreción.

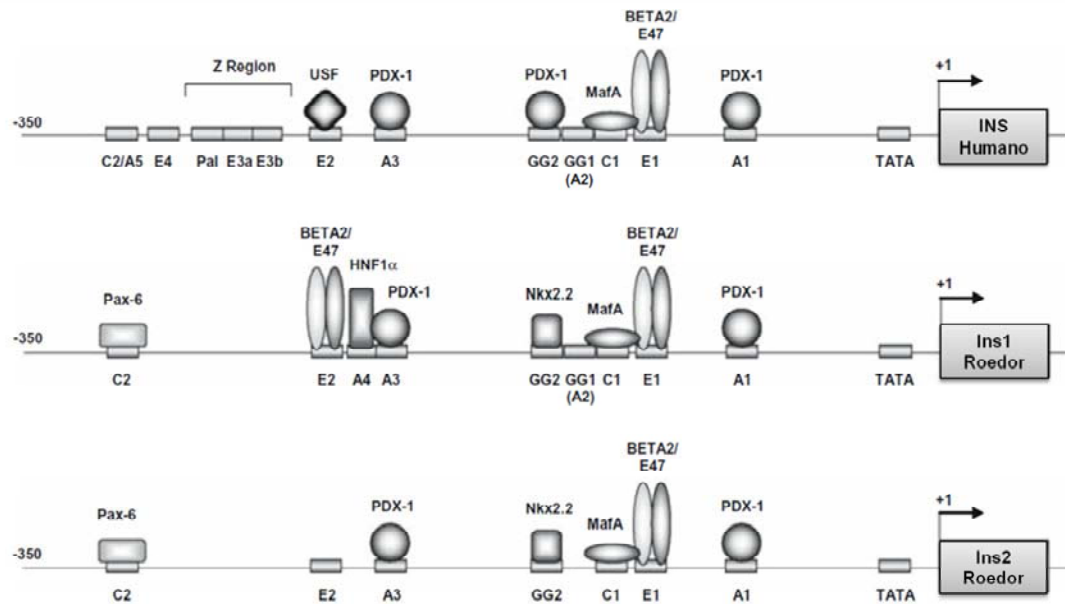


Fig.2 Regulación transcripcional del gen de la insulina.

Modificada de Artner et. al. 2008[46].

La síntesis de insulina es regulada por las concentraciones de glucosa a nivel transcripcional y post-transcripcional, tres reguladores transcripcionales específicos de célula beta, Pdx-1 (pancreatic and duodenal homeobox-1), NeuroD1 (neurogenic differentiation 1) and MafA (V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homologue A) han demostrado que participan de forma crucial en la inducción transcripcional del gen de insulina, activando la expresión de manera coordinada y sinérgica en respuesta al aumento de glucosa en circulación [47], [48].

Secreción de insulina

La glucosa es el principal inductor de la secreción de insulina, aunque otros macronutrientes, hormonas, factores humorales y estímulos neurales pueden modular esta respuesta. La secreción de insulina en respuesta a la glucosa es un proceso de múltiples pasos que requiere de: el transporte y el metabolismo de la glucosa; cambios electrofisiológicos; y la fusión de gránulos secretores que contienen insulina con la membrana plasmática de la célula-beta.

La secreción de insulina en respuesta a glucosa es pulsátil [49]. Los pulsos secretorios se asocian a oscilaciones en la concentración de calcio (Ca^{2+}) en respuesta a estímulos de glucosa[50]. Las oscilaciones químicas en la glucólisis inducida por glucosa es una característica presente en todas las células, en las células beta estas oscilaciones se acompañan de variaciones en la concentración de insulina, consistentes en fase y periodo temporal, con el fin de mantener los niveles óptimos de glucosa [51].

Los pulsos secretorios también están regulados y sincronizados con otros tipos celulares presentes en el islote pancreático, la insulina y el glucagón tienen patrones secretorios asíncronos que reflejan el comportamiento observado en periodos de post-prandio y ayuno[49].

La secreción de insulina en respuesta a glucosa muestra un patrón bifásico. Poco después de que la célula beta recibe el estímulo de glucosa hay un primer pico de secreción de insulina, seguido de una disminución en la secreción. Una segunda fase sostenida de secreción de insulina sigue a este decremento, la cual puede continuar durante horas hasta que se alcance la euglicemia. A pesar de que los mecanismos que participan en la primera fase de secreción de la insulina, (o fase de disparo) son bien conocidos, los mecanismos que regulan la segunda fase de secreción sostenida (o fase de amplificación) no han sido elucidados por completo, y se ha sugerido la participación de diversos agentes en esta fase. La mayoría de estos agentes se relacionan con el metabolismo de la glucosa al interior de la célula beta.

Un aumento en la concentración de glucosa en circulación induce la “primera fase” de la secreción de insulina mediada por glucosa, liberando insulina almacenada en los gránulos secretores localizados en el interior de la célula beta. La glucosa entra a la célula por difusión facilitada a través de transportadores GLUT, en la célula beta pancreática la glucosa es transportada por GLUT2 en roedores y GLUT1 en humanos. La absorción de glucosa en la célula beta es sensada por la glucocinasa, la cual se encarga de fosforilar la glucosa entrante a glucosa-6-fosfato (G6P), molécula que a través de su metabolismo por la glicolisis y el ciclo de Krebs genera una ganancia neta de ATP, provocando el cierre de los canales de potasio (K^+) dependientes de ATP, un hetero-octámero formado por cuatro subunidades de receptor a sulfonilurea 1 (SUR1) y cuatro unidades del canal rectificador de entrada de K^+ Kir6.2 [52]. El aumento de la concentraciones de K^+ intracelular provoca la despolarización de la membrana y la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje y el consecuente aumento de la concentración intracelular del mismo [53], [54]. Junto con el calcio movilizado de las reservas intracelulares, este proceso lleva a la fusión de los gránulos secretores que contienen insulina con la membrana plasmática, que deriva en la secreción pulsátil de insulina [40], [55]–[57].

La existencia de una segunda fase de insulina fue reportada en los años 60, al observar que al perfundir el páncreas total con glucosa, la secreción de insulina se incrementaba a partir de los 2 minutos posteriores a la infusión con glucosa, alcanzando un pico a los 4 min. Una segunda fase, más lenta, subsecuente a este aumento se mantiene durante todo el periodo de infusión con glucosa [57]. Al ser perfundido con tolbutamida, una sulfonilurea que actúa como bloqueador de los canales de potasio, sólo se observó el primer el primer pico, perteneciente a la primera fase de secreción o fase de disparo, sugiriendo que la segunda fase y por consiguiente la secreción bifásica, solo se genera en respuesta a glucosa [57].

Durante los años 90 se encontraron mecanismos de secreción de insulina independientes de la acción iónica (activación de los K_{ATP}) [58], [59]. Ahora se sabe que la secreción de insulina en respuesta a glucosa comprende una primera fase rápida de secreción, ocasionada por una vía de disparo (o un mecanismo independiente de K_{ATP}), seguida de una segunda fase sostenida que depende de una vía de amplificación (o un mecanismo independiente de K_{ATP}) [60], [61].

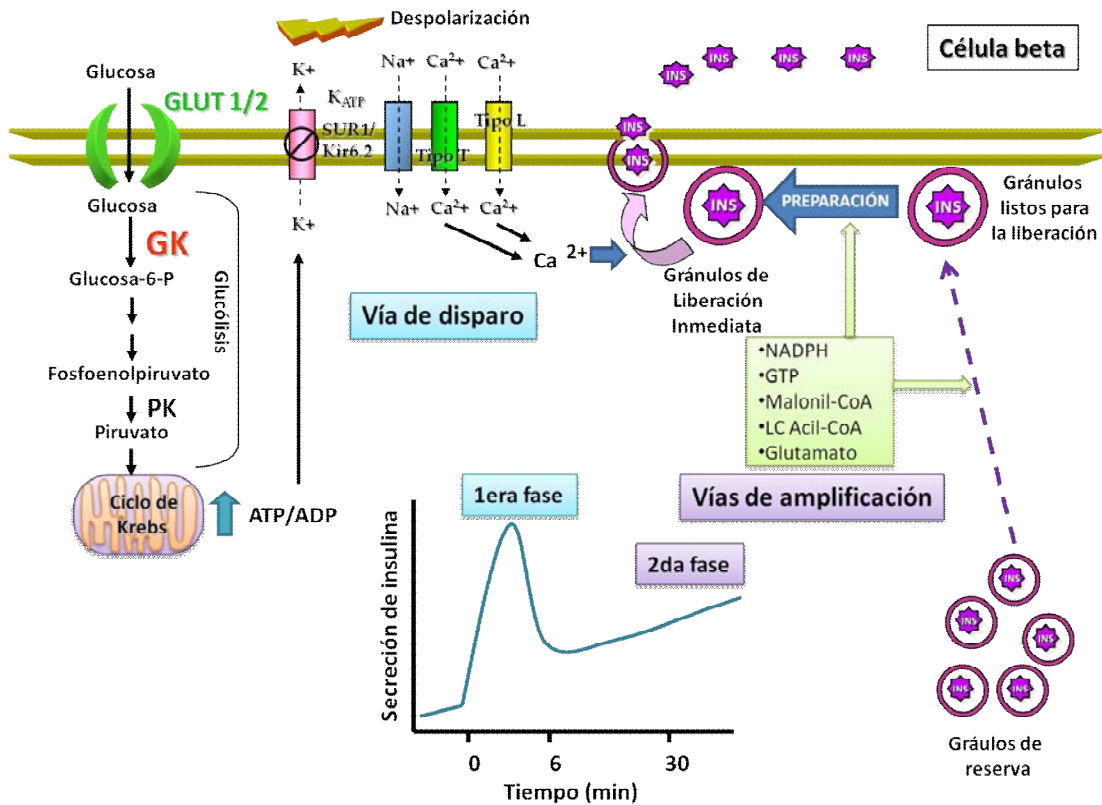


Fig.3 Mecanismos de la secreción bifásica de insulina en respuesta a glucosa

Factores de acoplamiento metabólico y la secreción de insulina en respuesta a glucosa

El metabolismo de la glucosa en la célula beta puede generar señales o factores acoplamiento metabólico que poseen la capacidad de iniciar y sostener la segunda fase de secreción de insulina. Existen diversas vías de señalización que al activarse contribuyen al mantenimiento o aumento de la respuesta de secreción inducida por glucosa, como las vías de PKA [62], [63], PKC [63], [64] y PKG [65].

Modulación de la secreción de insulina por nutrientes

Se ha propuesto que los ácidos grasos libres regulan la liberación de insulina en el páncreas, siendo esenciales para la secreción de insulina en respuesta a la glucosa [66]. Se ha observado que los ácidos grasos pueden incrementar las concentraciones de calcio intracelular [Ca²⁺]_i, estimulando la secreción de insulina,

por un mecanismo que propone que acción la acción de los ácidos grasos involucra la activación de la vía de PKC [67], [68].

Los aminoácidos obtenidos a través del consumo de la dieta también estimulan la secreción de insulina. Estos aminoácidos actúan por lo general de forma conjunta, y los mecanismos de secreción en los que participan son el incremento de ATP proveniente del ciclo de Krebs, la despolarización de la membrana o el incremento en el $[Ca^{2+}]_i$ [69], [70].

Existe también evidencia de que ciertas vitaminas son capaces de potenciar la secreción de insulina, entre las que se encuentran la vitamina A, la vitamina D y la biotina. La vitamina A es esencial para la secreción de insulina [71], y es capaz de incrementar la expresión del RNAm de glucocinasa [72], GLUT2 [73] y la misma insulina [72].

La vitamina D también incrementa de manera dosis dependiente la síntesis de insulina en respuesta a glucosa, acelerando el proceso de conversión de proinsulina a insulina [74] además de potenciar la secreción de insulina mediante el aumento de las concentraciones de $[Ca^{2+}]_i$ como consecuencia de la apertura de canales de calcio dependiente de voltaje, lo cual conlleva a un efecto insulínico [75], [76].

Estudios realizados por nuestro grupo de trabajo y otros laboratorios han encontrado que la vitamina biotina actúa como un estimulador de la secreción de insulina y de la expresión de genes relacionados con el proceso síntesis y secreción.

Biotina

La biotina es una vitamina hidrosoluble del complejo B, también conocida como vitamina B₈, esencial para el desarrollo, homeostasis y crecimiento de los seres vivos. Un nutriente esencial para el ser humano, en el cual las deficiencias de esta vitamina son de rara incidencia, dado que la misma se encuentra ampliamente distribuida en la dieta (levaduras, productos cárnicos, huevo, leguminosas y cereales), además de ser sintetizada por bacterias de la flora intestinal [77][78].

La biotina fue descubierta al observarse que ratas alimentadas con clara de huevos crudas presentaban dermatitis severa, disfunción muscular y alopecia podían ser tratadas al administrar un factor extraído del hígado, el cual se identificó como biotina.

Características fisicoquímicas

Químicamente la biotina corresponde al ácido hexahidro-2-oxo-1H-tieno-[3,4d]imidazol-4-pentóico, un ácido monocarboxílico con peso molecular de 244.31 g/mol, estable a temperatura ambiente, soluble en agua (0.02% p/v) y etanol (0.08% p/v) y susceptible a la oxidación [79].

Es un compuesto bicíclico, uno de sus anillos cuenta con un grupo ureido (-N-CO-N-) mientras que el otro contiene azufre como parte de un anillo tetrahidrotiofeno. Cuenta además con una cadena de ácido valérico que le confiere un carácter ácido [79].

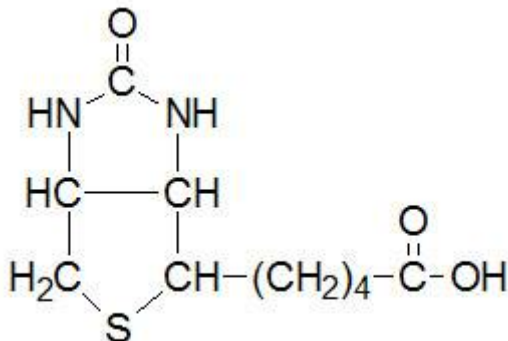


Fig.4 estructura química de la biotina

Metabolismo y Absorción

La biotina también puede encontrarse ligada a un residuo de lisina, en la forma de biocitina. La biotinidasa es la enzima responsable de catalizar la hidrólisis,

escindiendo la molécula y aumentando la biodisponibilidad de la biotina libre consumida en la dieta [80].

Una vez que la biotina es consumida en la dieta y procesada por peptidasas, proteasas y la biotinidasa, la biotina es absorbida por los enterocitos en la porción distal del duodeno y proximal del yeyuno. Para ser absorbida la biotina requiere de un transportador, este proceso es llevado a cabo por el transportador múltiple de vitaminas dependientes de sodio [81]. El SMVT funciona como simportador electrogénico, transportando la biotina junto con sodio, en una estequiometría 2:1 sodio sustrato [79].

Después de su absorción en el intestino, la biotina pasa al plasma, donde es principalmente transportada por la biotinidasa [82] y puede encontrarse libre en un 81% y unida a proteínas de manera covalente en un 12% y de manera reversible en un 7% [83]. La absorción de la biotina se impide por la avidina, una glicoproteína presente en la clara de huevo. Este efecto se produce debido a la unión no covalente de la vitamina con la proteína [79].

Desde el torrente sanguíneo la biotina pasa a los órganos. El hígado, es el órgano que absorbe biotina en mayor cantidad para su metabolismo, haciéndolo a través del el transportador múltiple de vitaminas dependientes de sodio , mecanismo que también está presente en otros tejidos con este transportador [81].

Rol clásico de la biotina como cofactor de carboxilasas

La biotina funciona como grupo prostético de las enzimas acetil-Coa carboxilasa (ACC-1 y ACC-2), piruvato carboxilasa (PC), metilcrotonil-Coa carboxilasa y propionil-Coa carboxilasa (PCC). Estas son sintetizadas como apo-carboxilasas inactivas; la holocarboxilasa sintetasa (HCS) cataliza la activación mediante la unión covalente a un residuo de lisina [84]. Estas enzimas mencionadas anteriormente son responsables de catalizar reacciones de procesos metabólicos fundamentales como la gluconeogénesis, la síntesis de ácidos grasos (β -reducción) y el catabolismo de aminoácidos [85], [86].

Efecto de la biotina sobre la expresión genética

Al final de la década de los 60, se observó que la biotina , además de su intervención en las reacciones de carboxilación, en concentraciones farmacológicas participa en la regulación de la transcripción de genes y en la estructura cromosómica. Estudios han demostrado que la biotinidasa y la holocarboxilasa sintetasa median la unión covalente de la biotina a histonas, afectando la estructura de la cromatina [87], [88].

La biotina participa en la regulación de la transcripción de enzimas que la utilizan como sustrato y grupo prostético, la holocarboxilasa sintetasa (HCS)[89], la acetil coenzima A carboxilasa (ACC), la piruvato cinasa (PC) y la propionil coenzima A carboxilasa (PCC) [90]. También actúa en la regulación de la expresión de otras enzimas y proteínas que no la utilizan como sustrato o de las cuales su actividad no depende de ella como cofactor, como la glucocinasa hepática [91], [92], fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPCK) [92], [93], insulina y glucocinasa pancreática [94].

Ensayos de microarreglos han mostrado que una variedad de genes son afectados por la biotina. Estudios en células humanas mononucleares de sangre periférica (PMBC) se observó que en adultos sanos suplementados con 8.8 $\mu\text{mol/día}$ de biotina durante un periodo de 3 semanas, mostraban un aumento en la expresión de 139 y un decremento en la expresión de 131 genes en comparación con los controles, sugiriendo que el genoma humano contiene grupos de genes que responden a concentraciones farmacológicas de biotina [95]. Muchos de estos genes desempeñan funciones como proteínas de unión a ADN, proteínas de unión a ARN, proteínas de unión a nucleótidos, con actividad de transferasa o traduccional [96]. Otro estudio realizado en células humanas de hepatocarcinoma (HepG2) encontró 1803 genes que respondieron a la vitamina [97].

Han sido propuestas dos vías que podrían participar en la acción de esta vitamina: La activación de la guanilato ciclasa soluble y la biotinilación de histonas [98], [99].

Mecanismos de acción

Activación de la guanilato ciclasa soluble

Diversos estudios han encontrado que la biotina incrementa la actividad de la enzima guanilato ciclasa. Estudios previos encontraron que la biotina en una concentración de biotina 1 μM produce un aumento del doble al triple de la actividad de la guanilato ciclasa en el hígado, riñon, colon, cerebelo y corazón. [100], [101].

En otros estudios se encontró que el aumento producido por biotina en la actividad de la glucocinasa hepática estaba precedido por un incremento en las concentraciones intracelulares de GMP cíclico, sugiriendo que la biotina ejercía su efecto a través de este segundo mensajero [102]. La activación de la guanilato ciclasa aumenta la síntesis de GMP cíclico [90], el cual estimula a la proteína cinasa G (PKG), provocando la fosforilación y activación de proteínas que incrementan la transcripción génica [96], [103].

Estudios por Solorzano y cols [85] encontraron que el vínculo entre la biotina y la activación de la guanilato ciclasa está dado por el Biotinil-AMP, un intermediario en reacción catalizada por la holocarboxilasa sintetasa en la síntesis de las holocarboxilasas dependientes de biotina. El mecanismo mediante el cual se produce este efecto se desconoce.

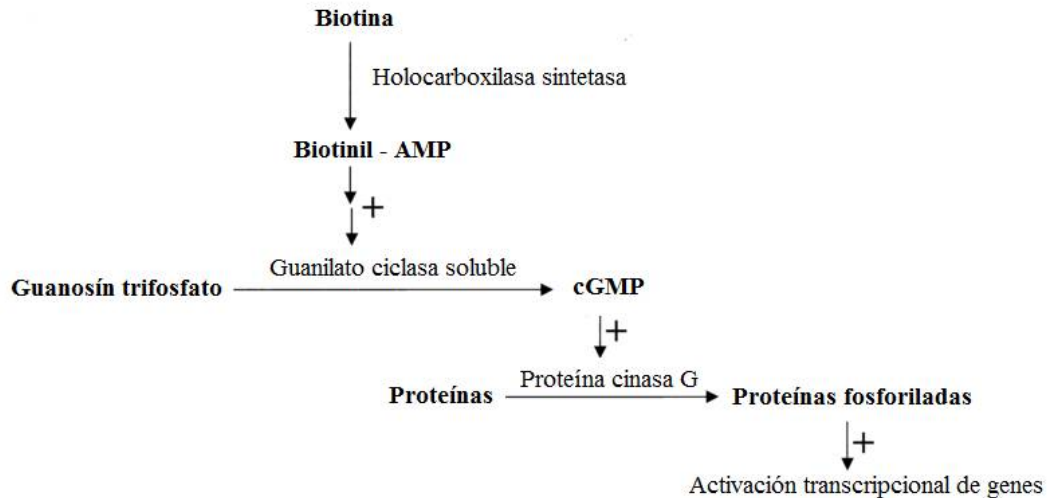


Fig. 5 Regulación de la expresión de genes por biotinil-AMP [103]

Biotinilación de histonas

La cromatina está compuesta principalmente de DNA y proteínas de unión a DNA como las histonas, éstas últimas desempeñan un rol importante en la estructuración y doblado del DNA a cromatina. En mamíferos se han identificado 5 grandes clases de histonas: H1, H2A, H2B, H3 y H4, que consisten de un dominio globular y una sección terminal amino, de los cuales poco más del 20% consisten de residuos de arginina y lisina, confiriéndoles de un carácter de carga positiva a pH fisiológico permitiendo la unión del DNA a histonas de manera electrostática [104].

El extremo amino terminal de las histonas puede ser modificada covalentemente, afectando la estructura de la cromatina, dando pie a la regulación génica. Este extremo terminal es susceptible a la biotinilación en los grupos amino épsilon (con residuos de lisina), los grupos guanidino (arginina), carboxilo (glutamato) e hidroxilo (serina). Se ha observado *in vitro* que la biotina se une de forma covalente a las histonas debido a la acción de la biotinidasa mediante la escisión de la biocitina (biotina- ϵ -lisina) formando un intermediario biotinil-tioester (cisteína unida a biotina) transfiriendo después el grupo biotinil del tioester al grupo ϵ -amino de las lisinas en la histona [105], [106].

También se ha descubierto que la holocarboxilasa sintetasa puede catalizar la biotilación de histonas [107]. *In vivo*, han sido detectadas histonas biotiniladas en diversos tipos de células, como las células PBMC [108], células de cáncer pulmonar [109], células de coriocarcinoma [110] y células humanas de linfoblastoma [111]. Sin embargo, existen estudios que ponen en duda la capacidad de la vitamina de biotilar histonas [112], [113].

ANTECEDENTES DIRECTOS

En estudios previos, realizados por nuestro grupo de trabajo [114], se encontró que la administración durante 8 semanas de una dieta suplementada con concentraciones de biotina 56 veces la contenida en la dieta control, incrementó: la expresión de genes que favorecen la síntesis y secreción de insulina, la masa de las células beta y modificó la estructura del islote pancreático.

Los resultados de estos estudios revelaron que la suplementación con biotina provocó un aumento en la expresión de factores transcripcionales participantes en la regulación de genes relacionados con la expresión y secreción de insulina, como lo es Foxa2, un factor transcripcional que pertenece a la familia de proteínas winged hélix/Forkhead (FOX), importante en la cascada de transcripción que determina la expresión y regulación de genes participantes en la síntesis y secreción de insulina. Foxa2 regula a su vez la expresión del factor transcripcional, Pdx-1 proteína relevante para la expresión de la insulina y de otras proteínas que participan en el proceso de secreción de esta hormona. Pdx-1 es también determinante en el mantenimiento y proliferación de las células β [115], [116].

En concordancia con el aumento de Foxa2 y de Pdx-1, también se encontró que la suplementación con biotina por ocho semanas en la dieta ocasionó un incremento en la expresión del gen de la insulina (Ins2) y de la glucocinasa (Gck), enzima que tiene un papel regulador en el proceso de secreción de insulina en respuesta a la glucosa. Asimismo, se encontraron aumentados los niveles de RNAm de otro gen participante en la secreción de la insulina: el gen del canal de calcio Cacna1d, un gen que codifica para la subunidad α 1d del canal de calcio tipo L dependiente de voltaje, cuyos factores que regulan su transcripción se desconocen.

Sorprendentemente, el análisis histológico reveló que los islotes de los ratones suplementados con biotina poseen una arquitectura modificada comparada con la de los islotes control. Por lo que se analizaron estudios sobre la expresión de moléculas de adhesión como (Cdh1), y (Ncam1) [117]–[119], encontrándose que la suplementación con biotina disminuyó de manera significativa la expresión de la molécula de adhesión celular (Ncam1), mientras que no se encontró diferencia en la abundancia del RNAm de cadherina (Cdh1).

En un estudio posterior se investigó si las modificaciones derivadas de la suplementación con biotina a las ocho semanas se efectuaban gradualmente a todo lo largo de este periodo, o si, debido a la ductilidad del islote en la etapa post-natal [25], los cambios se producían durante la ventana crítica existente después de la ablactación. Sorprendentemente los resultados obtenidos revelaron que desde la primera semana de la administración de la vitamina se produjeron cambios en los islotes, sin embargo sorprendentemente se encontraron efectos diferentes a los observados a las 8 semanas de suplementación con biotina. En lugar de un aumento la expresión de *Foxa2*, *Pdx-1*, *insulina* y *cacna1* el ARNm de estos genes disminuyó, en tanto que, en contraste a la falta de modificación en la expresión de *cadherina* en la octava semana de la administración de la dieta, a la primera semana de ingesta la expresión del mensajero se encontró aumentada. No se encontraron cambios en la expresión de la glucocinasa [120]. No obstante la disminución de la expresión de la *insulina* y factores transcripcionales críticos en su síntesis y secreción, no se observaron anomalías en la secreción de la *insulina* ni en la curva de tolerancia a la *glucosa* [120].

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La administración de una dieta suplementada con biotina durante una semana después del destete produce disminuciones en la expresión de genes críticos en la síntesis y secreción de la *insulina*. Sin embargo, a pesar de estas disminuciones no se observan anomalías ni en la secreción de la *insulina*, ni en la homeostasis de la *glucosa*. Una explicación de las discrepancias entre la disminución en expresión de genes y la funcionalidad normal del islote observadas a la primera semana de tratamiento podría deberse a un abrupto aumento en la expresión de los mensajeros y sus correspondientes proteínas en tiempos anteriores, dando como consecuencia una respuesta de retroalimentación negativa sobre la transcripción. En soporte a esta hipótesis, en estudios analizando el efecto de concentraciones farmacológicas de biotina sobre los citocromos P450 CYP-1A1, CYP1A2, CYP1B1 hepático [121], se observó un aumento pronunciado en el RNAm de estos genes en el primer día de tratamiento, proseguido por disminuciones en el contenido del RNAm en los días posteriores. Por lo que en este trabajo se propone analizar esta hipótesis.

HIPÓTESIS

La suplementación con biotina en la dieta a un día después del destete produce aumentos en la expresión del RNAm del islote pancreático.

OBJETIVO

Investigar los efectos de la suplementación de biotina sobre la expresión del RNAm del islote pancreático, en ratones machos de la cepa BALBc/AnN Hsd un día después del destete.

OBJETIVO PARTICULAR

Investigar el efecto de la suplementación con biotina, a un día de la ablactación, sobre la expresión relativa de genes y factores transcripcionales (Foxa2, Pdx-1), así como en la expresión de los genes que participan en la secreción de insulina (Ins2, Gck y Cacna1d) y en la estructura del islote pancreático (Cdh1, Actb y Ncam1).

MÉTODOS

MODELO EXPERIMENTAL

Ratones machos de la cepa BALBc/AnN de tres semanas de edad recién destetados se mantuvieron en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM bajo ciclos de luz-obscuridad de 12 h; y con libre acceso a agua y alimento durante todo el periodo experimental. Los ratones fueron alimentados durante las 24 horas posteriores al destete con dos diferentes dietas: una dieta con concentraciones fisiológicas de biotina (0.8 mg/kg) y una dieta suplementada con concentraciones supra-farmacológicas (100 mg/kg).

La dieta control proporciona suficiente cantidad de biotina para cubrir las necesidades metabólicas de los ratones [18], mientras que la dieta suplementada contiene cantidades de biotina de aproximadamente 56 veces la concentración del control, proporción comparable a la de los suplementos vitamínicos de biotina recomendados para la diabetes [19][20].

Los ratones utilizados en este estudio fueron producto de cruza selectivas entre hembras y machos fértiles de 8 semanas. Las hembras fueron separadas al observarse el embarazo. Tras el parto, se contabilizó un periodo de 21 días (d21) en el cual las crías fueron destetadas a las 22:00 p.m., y fueron separadas por sexos distribuyéndose equitativamente y al azar en dos grupos: control y suplementado. Las crías del grupo control fueron alimentadas con dieta control (Harlan 2018S Teklad Global 18% Protein) o con la dieta suplementada (Harlan 2018S Teklad Global 18% Protein adicionada con 107.98 mg/Kg de biotina) durante 24 hrs. La dieta fue retirada las 22:00 p.m. del d22 post-natal y, ambos grupos se sometieron a un ayuno de 12 hrs.

Las crías correspondientes a cada grupo fueron sacrificadas a las 10:00 a.m. del día posterior al destete, se anestesiaron con Sevorane (Sevoflurano, Abbott) y se sacrificaron por dislocación cervical. En los animales anestesiados el páncreas se escindió y se limpió de grasa y sangre. Los páncreas de 3 a 5 ratones se colocaron en un vaso de precipitados con 10 mL de solución de Hank's con BSA y antibiótico (Gibco) y se fragmentaron con tijeras. Posteriormente, se digirieron con 0.3 mg de colagenasa IV (Sigma) por cada páncreas en un baño de agua durante aprox. 10 min a 37°C con agitación constante. Los islotes pancreáticos se separaron del tejido acinar utilizando un gradiente de Ficoll. La fracción de islotes se lavó con solución de Hank's, y los islotes se recolectaron del medio bajo un microscopio estereoscópico.

Al finalizar el tratamiento, se extrajo el RNA total utilizando el reactivo de Trizol (Invitrogen) de grupos de 200-300 islotes aislados como se indica previamente. La cantidad y pureza del RNA fueron determinadas por espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 280 y a 260 nm. Se evaluó la expresión relativa de mRNA para los genes de interés por medio de RT-PCR en tiempo real, con los materiales y métodos proporcionados por Applied Biosystems. Las muestras se analizaron por triplicado. La expresión relativa de los genes de interés se analizó con el método $\Delta\Delta C_t$, usando la subunidad 18S del RNA ribosomal como control interno, y se normalizaron los resultados con respecto a la expresión en el grupo control.

Se calculó la expresión relativa de cada gen con el método de la doble diferencia del parámetro C_T (*cycle threshold*). Este método calcula la expresión de un gen de interés en relación a otro gen que funge como control interno. El C_T se define como el ciclo de PCR en el cual la señal del fluoróforo alcanza un umbral determinado arbitrariamente [122], [123]. La expresión relativa (ER) se calcula de acuerdo a la ecuación 1.

$$ER = 2^{-\Delta\Delta C_t} \quad (1)$$

Esta ecuación permite comparar la expresión genética de dos muestras (A y B). La muestra A corresponde al grupo suplementado de ratones, la muestra B corresponde al grupo control de ratones. De tal manera que la doble diferencia del C_T puede escribirse de la siguiente forma.

$$\Delta\Delta C_T = (C_T \text{ del gen de interés} - C_T \text{ control interno})_A - (C_T \text{ gen de interés} - C_T \text{ control interno})_B$$

Se seleccionó el gen correspondiente al RNAr18s como control interno, ya que su expresión no se ve afectada por la biotina.

Como ejemplo, si se tienen los siguientes valores de C_T para dos muestras de islotes pancreáticos:

Muestra	C_T (18s)	C_T (Pdx-1)
A (suplementado)	12.14	19.79
B (control)	11.93	18.65

De esta manera es posible calcular cambios en la expresión relativa del gen de cada gen problema, la doble diferencia del C_T se calcula como sigue:

$$\Delta\Delta C_T = (C_T \text{ gen de interés} - C_T \text{ control interno})_A - (C_T \text{ gen de interés} - \text{control interno})_B$$

$$\Delta\Delta C_T = (C_T \text{ Pdx-1} - C_T \text{ 18s})_A - (C_T \text{ Pdx-1} - C_T \text{ 18s})_B$$

$$\Delta\Delta C_T = (19.79 - 12.14) - (18.65 - 11.93)$$

$$\Delta\Delta C_T = 0.93$$

Y la expresión relativa se calcula de acuerdo a la ecuación (1) :

$$ER = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

$$ER = 2^{-0.93}$$

$$ER = 0.52$$

La expresión relativa del gen problema de la muestra del grupo experimental es de 0.52 con respecto al grupo control, que por definición es 1.00. En otras palabras, la expresión relativa del grupo suplementado disminuye a la mitad con respecto al grupo control.

Análisis estadístico

Los datos se presentan como media \pm error estándar, donde n indica el número de grupos evaluados. Las diferencias significativas se evaluaron por la prueba de t de Student, usando el programa PASW Statistics 18. El nivel de significancia fue de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Efectos de la suplementación con biotina por 24 hrs. sobre la expresión del RNAm de factores transcripcionales.

La suplementación en la dieta provocó un descenso en la expresión relativa del RNAm de *Foxa2*, la cual después de 24 horas de suplementación se vio reducida en aproximadamente un 50% en comparación con el grupo control. También observamos que la expresión del factor transcripcional *Pdx-1* disminuyó significativamente en comparación con su control.

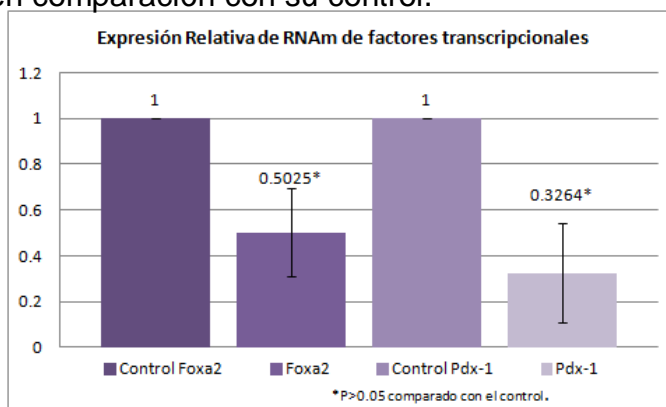


Fig.6: Expresión del RNAm de factores transcripcionales involucrados con la función secretora de insulina del islote a las 24 hrs. de suplementación con biotina. . Los datos representan la media \pm ES. n= 4 grupos de 300 islotes por condición experimental. * Denota significancia ($p \leq 0.05$) respecto a la expresión relativa del RNAm correspondiente del grupo control.

Efectos de la suplementación con biotina por 24 hrs. sobre la expresión del RNAm de proteínas relacionadas con secreción de insulina.

El ensayo de RT-PCR reveló un decremento significativo en la expresión relativa del mensajero del gen de la insulina *Ins2* y en los niveles de RNAm del canal de calcio alfa 1d (*Cacna1d*). En tanto que la expresión del mensajero de la glucocinasa (*Gck*) se vio notablemente favorecida, observándose un incremento del 89% con respecto al control.

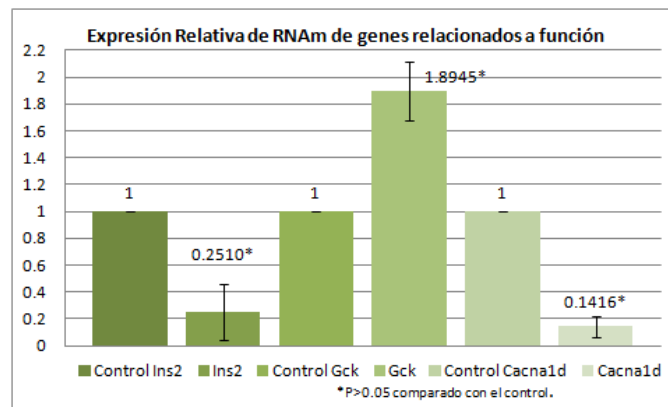


Fig.5: Expresión del RNAm de proteínas relacionadas con la secreción de insulina a las 24 hrs. de suplementación con biotina. Los datos representan la media \pm ES. n= 4 grupos de 300 islotes por condición experimental. * Denota significancia ($p \leq 0.05$) respecto a la expresión relativa del RNAm correspondiente del grupo control.

Efectos de la suplementación con biotina por 24 hrs. sobre la expresión del RNAm de genes relacionados con la morfología del islote pancreático.

También analizamos la expresión de genes de proteínas estructurales del islote. La expresión relativa del mensajero de beta-actina (*Actb*) y de cadherina (*Cdh1*), disminuyó tras la suplementación con biotina. En tanto que la expresión del mensajero de la molécula de adhesión celular (*Ncam-1*) mostró un aumento del 81% sobre la expresión basal.

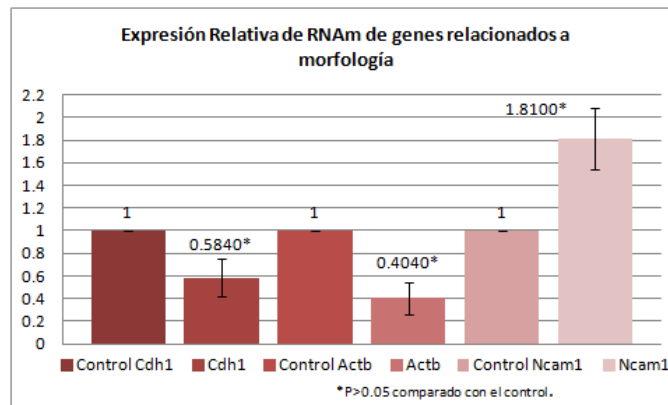


Fig.6: Expresión del RNAm de genes relacionados con la morfología del islote a las 24 hrs. de suplementación con biotina. Los datos representan la media ± ES. n= 4 grupos de 300 islotes por condición experimental. * Denota significancia ($p \leq 0.05$) respecto a la expresión relativa del RNAm correspondiente del grupo control.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este trabajo propusimos explicar las discrepancias observadas entre los efectos de la suplementación con biotina, entre la expresión de genes y la funcionalidad del islote. Esta pregunta surge a partir de un trabajo previo en donde se encontró que la administración de una dieta suplementada con biotina durante una semana disminuyó la expresión de genes críticos en la síntesis y secreción de la insulina, sin embargo no se observaron anomalías ni en la secreción de la insulina ni en la homeostasis de la glucosa. Propusimos que podría deberse a un abrupto aumento en la expresión del mensajero y de la proteína de estos genes en tiempos anteriores a la semana de tratamiento, como consecuencia a una respuesta de retroalimentación negativa por parte del aumento del mensajero; ya que, en otros estudios [121], se observa un aumento pronunciado en el RNAm de Cyp-1a hepático en el primer día de tratamiento, proseguido por disminuciones en el contenido del RNAm en los tres días posteriores.

Los resultados de este trabajo encontraron que la expresión de varios genes críticos para el mantenimiento del fenotipo, estructura y funcionamiento de las células beta disminuyeron al primer día de tratamiento. Los datos presentan semejanzas con los datos obtenidos a la semana de ingesta de la dieta suplementada con biotina, encontrándose decrementos en la expresión del factor transcripcional Foxa2 y de dos genes pertenecientes a la red de transcripción regulados por éste: Pdx-1 e insulina. Sin embargo, otro mensajero regulado por ésta red, la glucocinasa, mostró una regulación disimilar, encontrándose aumento en la expresión de su ARNm. Estos resultados no apoyan nuestra hipótesis inicial, la cual propuso que la disminución de la expresión de genes, observada a los siete días de tratamiento, podría deberse a una respuesta de retroalimentación negativa por un aumento abrupto en la expresión de estos genes en etapas tempranas anteriores a los 7 días de tratamiento. Sin embargo, datos recientemente obtenidos en nuestro laboratorio otorgan claves para la interpretación de estos resultados:

Estudios que forman parte de la tesis de doctorado de Maura Flores [124] encontraron que antes de la ablactación los niveles de insulina son casi 4 veces mayores de los reportados en la etapa adulta el día del destete; estos niveles de insulina disminuyen gradualmente para alcanzar los niveles del adulto, aproximadamente a las dos semanas de la ingesta de la dieta sólida. Estos datos concuerdan con observaciones obtenidas en ratas por Aguayo-Mazzucatto [25]. De igual manera, la secreción de insulina del islote en condiciones basales (5,5mM de glucosa) disminuye aproximadamente diez veces la secreción encontrada en islotes al momento del destete. Los datos de Maura Flores encontraron que la administración de la dieta suplementada con biotina acelera esta disminución, tanto en los niveles de insulina en sangre como en la secreción basal. Este efecto de la biotina se encuentra acorde con la menor expresión

encontrada en factores transcripcionales críticos en la producción de la insulina, y de la misma insulina, obtenidos durante los primeros días posteriores a la ablactación.

Dado que Foxa2 se encuentra también río arriba de la expresión de la glucocinasa podría esperarse que la expresión de ésta estuviese disminuida de manera similar a la que observamos en la expresión del gen de la insulina, sin embargo, el mensajero de la glucocinasa en el grupo suplementado con biotina fue mayor que el expresado en el grupo control. Este incremento puede explicarse debido a que durante el proceso de maduración del islote que se produce en las primeras etapas del destete se adquiere la capacidad de secreción de insulina en respuesta a la glucosa [25], proceso en que la glucocinasa posee un papel determinante [125]. El aumento observado en nuestros resultados sobre la expresión de glucocinasa es entonces compatible con los resultados de los experimentos de la Tesis doctoral de Maura Flores quien encontró que la administración de la dieta suplementada con biotina incrementa la secreción de insulina en respuesta a la glucosa. Por otro lado, los datos sobre la expresión de los genes descritos en las líneas anteriores, tomados en conjunto, sugieren que otros factores transcripcionales además de Pdx-1 y Foxa-2 participan en la expresión de la glucocinasa.

Cacna1d es una molécula importante en la entrada de calcio a la célula beta durante la secreción de insulina y está relacionada con el desarrollo post-natal del páncreas [126]. La disminución de su expresión observada en estos estudios resulta difícil de explicar, tanto por su participación en la secreción de insulina en respuesta a la glucosa como por el aumento en la proliferación de las células beta observada en otros estudios del laboratorio [124].

El islote pancreático presenta una estructura muy especializada compuesta por una variedad de células diferentes que llevan a cabo tareas específicas. De tal manera que la ultra-estructura del islote se halla íntimamente ligada con la función del mismo. Tomando en cuenta este punto, se decidió evaluar la expresión del RNAm de moléculas de adhesión participantes en la estructuración del islote pancreático durante el periodo posterior al destete, estudiando la expresión de Ncam1, cadherina y actina

N-cam1 es una molécula de adhesión que participa en la distribución celular dentro del islote [117], [119]. En ratones knock-out homo y heterocigotos para N-cam1 la cito-arquitectura del islote se ve modificada, observándose, un desplazamiento hacia el centro del islote de las células alfa y una marcada polarización en la conformación celular. Así mismo, se ha sugerido que cumple un rol importante en la distribución de cadherinas y de actina. El aumento en la expresión del mensajero de Ncam-1 es congruente con los cambios que produce la biotina durante la primera semana después del destete [124], en donde se

observa un aumento en el número de células alfa en la periferia y una disminución de los islotes polarizados. Sin embargo, la disminución en la expresión de cadherina, una proteína que participa promoviendo la agregación de las células del islote y la formación de éste [118], no se encuentra de acuerdo con los cambios estructurales que se efectúan durante este periodo. Este efecto, y la menor expresión del mensajero de actina, es un punto de interés en el que debe ahondarse.

Los resultados obtenidos a tiempos cortos de la administración de la dieta suplementada con biotina (uno y siete días) difieren de los resultados obtenidos a las 8 semanas de administración de la dieta, en donde se encontraron aumentos en la expresión de Foxa2, Pdx-1, insulina, glucocinasa y cacna1d. Estos resultados sugieren que los efectos de la suplementación con biotina sobre la expresión de genes, no se encuentran limitados al periodo temprano de post ablactación.

CONCLUSIONES

La suplementación con dosis supra-farmacológicas de biotina durante las 24 horas subsecuentes al periodo de post-ablactación induce cambios en la expresión de genes y factores transcripcionales que participan en la función y morfología del islote pancreático.

La expresión del mensajero de Foxa2, Pdx-1 e insulina, elementos de la cascada transcripcional de Foxa2 se halla disminuida.

La suplementación con biotina aumenta la expresión del mensajero de glucocinasa .

La suplementación con biotina disminuyó la expresión del canal de calcio Cacna1d, una proteína importante en la entrada de calcio a la célula beta durante la secreción de insulina y que también está relacionada con el desarrollo.

La suplementación con biotina modificó expresión del mensajero de Ncam1, una molécula de adhesión en la caracterización de la arquitectura del islote pancreático, y por consecuencia, la función del mismo.

BIBLIOGRAFIA

- [1] E. J. Barrett, "The Endocrine Pancreas.," in *Medical Physiology. A cellular and molecular approach.*, W. F. Boron and E. L. Boulpaep, Eds. Philadelphia: Elsevier, 2009.
- [2] F. S. Marino, C.R. & Gorelick, "Pancreatic and Salivary Glands.," in *Medical Physiology. A cellular and molecular approach.*, W. F. Boron and E. L. Boulpaep, Eds. Philadelphia: Elsevier, 2005.
- [3] J. M. Slack, "Developmental biology of the pancreas.," *Development*, vol. 121, no. 6, pp. 1569–80, Jun. 1995.
- [4] A. Grapin-Botton and D. Constam, "Evolution of the mechanisms and molecular control of endoderm formation.," *Mech. Dev.*, vol. 124, no. 4, pp. 253–78, Apr. 2007.
- [5] A. M. Zorn and J. M. Wells, "Molecular basis of vertebrate endoderm development.," *Int. Rev. Cytol.*, vol. 259, pp. 49–111, Jan. 2007.
- [6] F. C. Pan and C. Wright, "Pancreas organogenesis: from bud to plexus to gland.," *Dev. Dyn.*, vol. 240, no. 3, pp. 530–65, Mar. 2011.
- [7] Q. Zhou, A. C. Law, J. Rajagopal, W. J. Anderson, P. A. Gray, and D. A. Melton, "A multipotent progenitor domain guides pancreatic organogenesis.," *Dev. Cell*, vol. 13, no. 1, pp. 103–14, Jul. 2007.
- [8] M. C. Jørgensen, J. Ahnfelt-Rønne, J. Hald, O. D. Madsen, P. Serup, and J. Hecksher-Sørensen, "An illustrated review of early pancreas development in the mouse.," *Endocr. Rev.*, vol. 28, no. 6, pp. 685–705, Oct. 2007.
- [9] S. L. Ang, A. Wierda, D. Wong, K. A. Stevens, S. Cascio, J. Rossant, and K. S. Zaret, "The formation and maintenance of the definitive endoderm lineage in the mouse: involvement of HNF3/forkhead proteins.," *Development*, vol. 119, no. 4, pp. 1301–15, Dec. 1993.
- [10] S. L. Ang and J. Rossant, "HNF-3 beta is essential for node and notochord formation in mouse development.," *Cell*, vol. 78, no. 4, pp. 561–74, Aug. 1994.
- [11] D. C. Weinstein, A. Ruiz i Altaba, W. S. Chen, P. Hoodless, V. R. Prezioso, T. M. Jessell, and J. E. Darnell, "The winged-helix transcription factor HNF-3 beta is required for notochord development in the mouse embryo.," *Cell*, vol. 78, no. 4, pp. 575–88, Aug. 1994.
- [12] K. L. Wu, M. Gannon, M. Peshavaria, M. F. Offield, E. Henderson, M. Ray, A. Marks, L. W. Gamer, C. V Wright, and R. Stein, "Hepatocyte nuclear factor 3beta is involved in pancreatic beta-cell-specific transcription of the pdx-1 gene.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 17, no. 10, pp. 6002–13, Oct. 1997.

- [13] S. Marshak, E. Benshushan, M. Shoshkes, L. Havin, E. Cerasi, and D. Melloul, "Functional conservation of regulatory elements in the pdx-1 gene: PDX-1 and hepatocyte nuclear factor 3beta transcription factors mediate beta-cell-specific expression.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 20, no. 20, pp. 7583–90, Oct. 2000.
- [14] H. Ohlsson, K. Karlsson, and T. Edlund, "IPF1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene.," *EMBO J.*, vol. 12, no. 11, pp. 4251–9, Nov. 1993.
- [15] J. Jonsson, L. Carlsson, T. Edlund, and H. Edlund, "Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice.," *Nature*, vol. 371, no. 6498, pp. 606–9, Oct. 1994.
- [16] U. Ahlgren, J. Jonsson, and H. Edlund, "The morphogenesis of the pancreatic mesenchyme is uncoupled from that of the pancreatic epithelium in IPF1/PDX1-deficient mice.," *Development*, vol. 122, no. 5, pp. 1409–16, May 1996.
- [17] C. P. Miller, R. E. McGehee, and J. F. Habener, "IDX-1: a new homeodomain transcription factor expressed in rat pancreatic islets and duodenum that transactivates the somatostatin gene.," *EMBO J.*, vol. 13, no. 5, pp. 1145–56, Mar. 1994.
- [18] P. A. Seymour and M. Sander, "Historical perspective: beginnings of the beta-cell: current perspectives in beta-cell development.," *Diabetes*, vol. 60, no. 2, pp. 364–76, Feb. 2011.
- [19] T. Kim, M. C. Gondré-Lewis, I. Arnaoutova, and Y. P. Loh, "Dense-core secretory granule biogenesis.," *Physiology (Bethesda)*, vol. 21, pp. 124–33, Apr. 2006.
- [20] J. E. Bruin, M. A. Petre, S. Raha, K. M. Morrison, H. C. Gerstein, and A. C. Holloway, "Fetal and neonatal nicotine exposure in Wistar rats causes progressive pancreatic mitochondrial damage and beta cell dysfunction.," *PLoS One*, vol. 3, no. 10, p. e3371, Jan. 2008.
- [21] M. Teta, S. Y. Long, L. M. Wartschow, M. M. Rankin, and J. A. Kushner, "Very slow turnover of beta-cells in aged adult mice.," *Diabetes*, vol. 54, no. 9, pp. 2557–67, Sep. 2005.
- [22] J. J. Meier, A. E. Butler, Y. Saisho, T. Monchamp, R. Galasso, A. Bhushan, R. A. Rizza, and P. C. Butler, "Beta-cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of beta-cell mass in humans.," *Diabetes*, vol. 57, no. 6, pp. 1584–94, Jun. 2008.
- [23] J. F. Habener, D. M. Kemp, and M. K. Thomas, "Minireview: transcriptional regulation in pancreatic development.," *Endocrinology*, vol. 146, no. 3, pp. 1025–34, Mar. 2005.

- [24] A. Lucas, "Programming by early nutrition: an experimental approach.," *J. Nutr.*, vol. 128, no. 2 Suppl, p. 401S–406S, Feb. 1998.
- [25] C. Aguayo-Mazzucato, C. Sanchez-Soto, V. Godinez-Puig, G. Gutiérrez-Ospina, and M. Hiriart, "Restructuring of pancreatic islets and insulin secretion in a postnatal critical window.," *PLoS One*, vol. 1, p. e35, Jan. 2006.
- [26] S. J. Hughes, "The role of reduced glucose transporter content and glucose metabolism in the immature secretory responses of fetal rat pancreatic islets.," *Diabetologia*, vol. 37, no. 2, pp. 134–40, Mar. 1994.
- [27] E. Heinze and J. Steinke, "Glucose metabolism of isolated pancreatic islets: difference between fetal, newborn and adult rats.," *Endocrinology*, vol. 88, no. 5, pp. 1259–63, May 1971.
- [28] J. Petrik, M. Srinivasan, R. Aalinkeel, S. Coukell, E. Arany, M. S. Patel, and D. J. Hill, "A long-term high-carbohydrate diet causes an altered ontogeny of pancreatic islets of Langerhans in the neonatal rat.," *Pediatr. Res.*, vol. 49, no. 1, pp. 84–92, Jan. 2001.
- [29] R. Aalinkeel, M. Srinivasan, F. Song, and M. S. Patel, "Programming into adulthood of islet adaptations induced by early nutritional intervention in the rat.," *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 281, no. 3, pp. E640–8, Sep. 2001.
- [30] M. Srinivasan, F. Song, R. Aalinkeel, and M. S. Patel, "Molecular adaptations in islets from neonatal rats reared artificially on a high carbohydrate milk formula.," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 12, no. 10, pp. 575–584, Oct. 2001.
- [31] R. Aalinkeel, M. Srinivasan, S. C. Kalhan, S. G. Laychock, and M. S. Patel, "A dietary intervention (high carbohydrate) during the neonatal period causes islet dysfunction in rats.," *Am. J. Physiol.*, vol. 277, no. 6 Pt 1, pp. E1061–9, Dec. 1999.
- [32] M. E. Cerf, K. Williams, X. I. Nkomo, C. J. Muller, D. F. Du Toit, J. Louw, and S. A. Wolfe-Coote, "Islet cell response in the neonatal rat after exposure to a high-fat diet during pregnancy.," *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, vol. 288, no. 5, pp. R1122–8, May 2005.
- [33] M. Srinivasan, S. G. Laychock, D. J. Hill, and M. S. Patel, "Neonatal nutrition: metabolic programming of pancreatic islets and obesity.," *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, vol. 228, no. 1, pp. 15–23, Jan. 2003.
- [34] M. Korc, "Normal Function of the Endocrine Pancreas.," in *The Pancreas Biology, Pathology, and Disease.*, G. Go, V.L., Lebenthal, E., DiMagno, E., Reber, H., Gardner, J., & Scheele, Ed. Raven Press, 1993.

- [35] M. Brissova and A. C. Powers, "Architecture of Pancreatic Islets.," in *Pancreatic Beta Cell in Health and Disease*, S. Seino and I. B. Graeme, Eds. Springer, 2008.
- [36] M. Brissova, M. J. Fowler, W. E. Nicholson, A. Chu, B. Hirshberg, D. M. Harlan, and A. C. Powers, "Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy.," *J. Histochem. Cytochem.*, vol. 53, no. 9, pp. 1087–97, Sep. 2005.
- [37] O. Cabrera, D. M. Berman, N. S. Kenyon, C. Ricordi, P.-O. Berggren, and A. Caicedo, "The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 7, pp. 2334–9, Feb. 2006.
- [38] C. Hellerström, "The life story of the pancreatic B cell.," *Diabetologia*, vol. 26, no. 6, pp. 393–400, Jun. 1984.
- [39] G. C. Weir, A. Sharma, D. H. Zangen, and S. Bonner-Weir, "Transcription factor abnormalities as a cause of beta cell dysfunction in diabetes: a hypothesis.," *Acta Diabetol.*, vol. 34, no. 3, pp. 177–84, Oct. 1997.
- [40] G. Wilcox, "Insulin and insulin resistance," *Clin. Biochem. Rev.*, vol. 26, no. 2, pp. 19–39, May 2005.
- [41] P. Oyer, S. Cho, J. Peterson, and D. Steiner, "Studies on human proinsulin," *J. Biol. Chem.*, no. 5, 1971.
- [42] D. F. Steiner, "The Biosynthesis of Insulin," in *Pancreatic Beta Cell in Health and Disease*, S. Seino and G. I. Bell, Eds. Springer Japan, 2008, p. pp 31–49.
- [43] G. Dodson and D. Steiner, "The role of assembly in insulin's biosynthesis.," *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 8, no. 2, pp. 189–94, Apr. 1998.
- [44] M. F. Dunn, "Zinc-ligand interactions modulate assembly and stability of the insulin hexamer -- a review.," *Biometals*, vol. 18, no. 4, pp. 295–303, Aug. 2005.
- [45] L. Eliasson, F. Abdulkader, M. Braun, J. Galvanovskis, M. B. Hoppa, and P. Rorsman, "Novel aspects of the molecular mechanisms controlling insulin secretion.," *J. Physiol.*, vol. 586, no. 14, pp. 3313–24, Jul. 2008.
- [46] I. Artner and R. Stein, "Transcriptional Regulation of Insulin Gene Expression," in *Pancreatic Beta Cell in Health and Disease*, S. Seino and G. I. Bell, Eds. Springer Japan, 2008, p. pp 13–30.
- [47] S. S. Andrali, M. L. Sampley, N. L. Vanderford, and S. Ozcan, "Glucose regulation of insulin gene expression in pancreatic beta-cells.," *The Biochemical journal*, vol. 415, no. 1. pp. 1–10, 01-Oct-2008.

- [48] T. Iype, J. Francis, J. C. Garmey, J. C. Schisler, R. Nesher, G. C. Weir, T. C. Becker, C. B. Newgard, S. C. Griffen, and R. G. Mirmira, "Mechanism of insulin gene regulation by the pancreatic transcription factor Pdx-1: application of pre-mRNA analysis and chromatin immunoprecipitation to assess formation of functional transcriptional complexes.," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 17, pp. 16798–807, Apr. 2005.
- [49] J. I. Stagner, E. Samols, and G. C. Weir, "Sustained oscillations of insulin, glucagon, and somatostatin from the isolated canine pancreas during exposure to a constant glucose concentration.," *J. Clin. Invest.*, vol. 65, no. 4, pp. 939–42, Apr. 1980.
- [50] P. Bergsten, E. Grapengiesser, E. Gylfe, a Tengholm, and B. Hellman, "Synchronous oscillations of cytoplasmic Ca²⁺ and insulin release in glucose-stimulated pancreatic islets.," *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 12, pp. 8749–53, Mar. 1994.
- [51] S. Kar and D. Shankar Ray, "Sustained simultaneous glycolytic and insulin oscillations in beta-cells.," *J. Theor. Biol.*, vol. 237, no. 1, pp. 58–66, Nov. 2005.
- [52] L. Aguilar-Bryan, J. P. Clement, G. Gonzalez, K. Kunjilwar, a Babenko, and J. Bryan, "Toward understanding the assembly and structure of KATP channels.," *Physiol. Rev.*, vol. 78, no. 1, pp. 227–45, Jan. 1998.
- [53] M. Hiriart and L. Aguilar-Bryan, "Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic beta-cell.," *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 295, no. 6, pp. E1298–306, Dec. 2008.
- [54] S. G. Straub and G. W. G. Sharp, "Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion.," *Diabetes. Metab. Res. Rev.*, vol. 18, no. 6, pp. 451–63, Jan. .
- [55] P. Rorsman and E. Renström, "Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells.," *Diabetologia*, vol. 46, no. 8, pp. 1029–45, Aug. 2003.
- [56] B. Soria, I. Quesada, A. Roperio, and J. Pertusa, "Novel Players in Pancreatic Islet Signaling From Membrane Receptors to Nuclear Channels," *Diabetes*, vol. 53, no. February, 2004.
- [57] D. L. Curry, L. L. Bennett, and G. M. Grodsky, "Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas.," *Endocrinology*, vol. 83, no. 3, pp. 572–84, Sep. 1968.
- [58] T. Aizawa, M. Komatsu, N. Asanuma, Y. Sato, and G. W. Sharp, "Glucose action 'beyond ionic events' in the pancreatic beta cell.," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 19, no. 12, pp. 496–9, Dec. 1998.

- [59] M. Gembal, P. Gilon, and J. Henquin, "Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K⁺ channels in mouse B cells.," *J. Clin. Invest.*, vol. 89, no. April, pp. 1288–1295, 1992.
- [60] J. C. Henquin, "Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose.," *Diabetes*, vol. 49, no. 11, pp. 1751–60, Nov. 2000.
- [61] T. Aizawa, Y. Sato, and M. Komatsu, "Importance of nonionic signals for glucose-induced biphasic insulin secretion," *Diabetes*, vol. 51, no. February, pp. 2–4, 2002.
- [62] G. Sharp, "The adenylate cyclase-cyclic AMP system in islets of Langerhans and its role in the control of insulin release," *Diabetologia*, vol. 296, pp. 287–296, 1979.
- [63] P. Jones and S. Persaud, "Protein kinases, protein phosphorylation, and the regulation of insulin secretion from pancreatic β -cells," *Endocr. Rev.*, vol. 19, no. 4, pp. 429–461, 1998.
- [64] M. Doyle and J. Egan, "Pharmacological agents that directly modulate insulin secretion," *Pharmacol. Rev.*, vol. 55, no. 1, pp. 105–131, 2003.
- [65] S. G. Laychock, M. E. Modica, and C. T. Cavanaugh, "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*, vol. 129, no. 6, pp. 3043–52, Dec. 1991.
- [66] a Salehi, E. Flodgren, N. E. Nilsson, J. Jimenez-Feltstrom, J. Miyazaki, C. Owman, and B. Olde, "Free fatty acid receptor 1 (FFA(1)R/GPR40) and its involvement in fatty-acid-stimulated insulin secretion.," *Cell Tissue Res.*, vol. 322, no. 2, pp. 207–15, Nov. 2005.
- [67] S. Schnell, M. Schaefer, and C. Schöfl, "Free fatty acids increase cytosolic free calcium and stimulate insulin secretion from beta-cells through activation of GPR40.," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 263, no. 1–2, pp. 173–80, Jan. 2007.
- [68] C. J. Nolan, M. S. R. Madiraju, V. Delghingaro-Augusto, M.-L. Peyot, and M. Prentki, "Fatty Acid Signaling in the β -Cell and Insulin Secretion," *Diabetes*, vol. 55, no. Supplement_2, pp. S16–S23, Dec. 2006.
- [69] P. Newsholme, C. Gaudel, and N. H. McClenaghan, "Nutrient regulation of insulin secretion and beta-cell functional integrity.," *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 654, pp. 91–114, Jan. 2010.
- [70] P. Newsholme and M. Krause, "Nutritional regulation of insulin secretion: implications for diabetes.," *Clin. Biochem. Rev.*, vol. 33, no. 2, pp. 35–47, May 2012.

- [71] B. S. Chertow, W. S. Blaner, N. G. Baranetsky, W. Sivitz, M. B. Cordle, D. Thompson, and P. Meda, "Effects of Vitamin A Deficiency and Repletion In Vivo and In Vitro from Isolated Islets," vol. 79, no. January, pp. 163–169, 1987.
- [72] G. Cabrera-Valladares, M. S. German, F. M. Matschinsky, J. Wang, and C. Fernandez-Mejia, "Effect of retinoic acid on glucokinase activity and gene expression and on insulin secretion in primary cultures of pancreatic islets.," *Endocrinology*, vol. 140, no. 7, pp. 3091–6, Jul. 1999.
- [73] J. Blumentrath, H. Neye, and E. J. Verspohl, "Effects of retinoids and thiazolidinediones on proliferation, insulin release, insulin mRNA, GLUT 2 transporter protein and mRNA of INS-1 cells.," *Cell Biochem. Funct.*, vol. 19, no. 3, pp. 159–69, Sep. 2001.
- [74] P. M. Bourlon, B. Billaudel, and a Faure-Dussert, "Influence of vitamin D3 deficiency and 1,25 dihydroxyvitamin D3 on de novo insulin biosynthesis in the islets of the rat endocrine pancreas.," *J. Endocrinol.*, vol. 160, no. 1, pp. 87–95, Jan. 1999.
- [75] A. W. Norman, "Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor.," *Endocrinology*, vol. 147, no. 12, pp. 5542–8, Dec. 2006.
- [76] M. Kajikawa, H. Ishida, S. Fujimoto, E. Mukai, M. Nishimura, J. Fujita, Y. Tsuura, Y. Okamoto, a W. Norman, and Y. Seino, "An insulinotropic effect of vitamin D analog with increasing intracellular Ca²⁺ concentration in pancreatic beta-cells through nongenomic signal transduction.," *Endocrinology*, vol. 140, no. 10, pp. 4706–12, Oct. 1999.
- [77] V. Melo and O. Cuamatzi, *Bioquímica de los procesos metabólicos*. México: Reverté-UAM, 2004, p. 390.
- [78] R. J. McMahon, "Biotin in metabolism and molecular biology.," *Annu. Rev. Nutr.*, vol. 22, pp. 221–39, Jan. 2002.
- [79] K. Dakshinamurti and J. Chauhan, "Biotin.," *Vitam. Horm.*, vol. 45, pp. 337–84, Jan. 1989.
- [80] J. Hymes and B. Wolf, "Biotinidase and its roles in biotin metabolism.," *Clin. Chim. Acta.*, vol. 255, no. 1, pp. 1–11, Nov. 1996.
- [81] H. M. Said, "Biotin: biochemical, physiological and clinical aspects.," in *Water Soluble Vitamins*, vol. 56, O. Stanger, Ed. Springer Netherlands, 2012, pp. 1–19.
- [82] J. Zempleni and D. M. Mock, "Biotin biochemistry and human requirements.," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 10, no. 3, pp. 128–38, Mar. 1999.

- [83] D. M. Mock and M. I. Malik, "Distribution of biotin in human plasma: most of the biotin is not bound to protein.," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 56, no. 2, pp. 427–32, Aug. 1992.
- [84] a León-Del-Río, D. Leclerc, B. Akerman, N. Wakamatsu, and R. a Gravel, "Isolation of a cDNA encoding human holocarboxylase synthetase by functional complementation of a biotin auxotroph of *Escherichia coli*," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, no. 10, pp. 4626–30, May 1995.
- [85] R. Rodríguez Meléndez, "[Importance of biotin metabolism].," *Rev. Invest. Clin.*, vol. 52, no. 2, pp. 194–9.
- [86] J. Moss and M. D. Lane, "The biotin-dependent enzymes.," *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, vol. 35, pp. 321–442, Jan. 1971.
- [87] K. Dakshinamurti and C. Cheah-Tan, "Biotin-mediated synthesis of hepatic glucokinase in the rat," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 127, no. 1, pp. 17–21, Jan. 1968.
- [88] K. Dakshinamurti and Ho Chong Hong, "Regulation of key hepatic glycolytic enzymes.," *Enzymol. Biol. Clin. (Basel)*, vol. 11, no. 5, pp. 423–8, Jan. 1970.
- [89] R. Rodríguez-Meléndez and S. Cano, "Biotin regulates the genetic expression of holocarboxylase synthetase and mitochondrial carboxylases in rats," *J. Nutr.*, vol. 7, no. 131 (7), pp. 1909–1913, 2001.
- [90] R. S. Solórzano-Vargas, D. Pacheco-Alvarez, and A. León-Del-Río, "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. U. S. A.*, vol. 99, no. 8, pp. 5325–30, Apr. 2002.
- [91] J. Chauhan and K. Dakshinamurti, "Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats.," *J. Biol. Chem.*, vol. 266, no. 16, pp. 10035–8, Jun. 1991.
- [92] K. Dakshinamurti, "Biotin--a regulator of gene expression.," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 16, no. 7, pp. 419–23, Jul. 2005.
- [93] K. Dakshinamurti and W. Li, "Transcriptional regulation of liver phosphoenolpyruvate carboxykinase by biotin in diabetic rats.," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 132, no. 2, pp. 127–32, Mar. 1994.
- [94] G. Romero-Navarro, G. Cabrera-Valladares, M. S. German, F. M. Matschinsky, a Velazquez, J. Wang, and C. Fernandez-Mejia, "Biotin regulation of pancreatic glucokinase and insulin in primary cultured rat islets and in biotin-deficient rats.," *Endocrinology*, vol. 140, no. 10, pp. 4595–600, Oct. 1999.

- [95] S. Wiedmann, R. Rodriguez-Melendez, D. Ortega-Cuellar, and J. Zempleni, "Clusters of biotin-responsive genes in human peripheral blood mononuclear cells.," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 15, no. 7, pp. 433–9, Jul. 2004.
- [96] J. Zempleni, "Uptake, localization, and noncarboxylase roles of biotin.," *Annu. Rev. Nutr.*, vol. 25, pp. 175–96, Jan. 2005.
- [97] R. Rodriguez-Melendez, J. B. Griffin, and J. Zempleni, "The expression of genes encoding ribosomal subunits and eukaryotic translation initiation factor 5A depends on biotin and bisnorbiotin in HepG2 cells.," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 17, no. 1, pp. 23–30, Jan. 2006.
- [98] A. Vilches-Flores and C. Fernández-Mejía, "[Effect of biotin upon gene expression and metabolism].," *Rev. Invest. Clin.*, vol. 57, no. 5, pp. 716–24.
- [99] Y. Hassan and J. Zempleni, "Epigenetic regulation of chromatin structure and gene function by biotin," *J. Nutr.*, no. March, pp. 1763–1765, 2006.
- [100] D. L. Vesely, "Biotin enhances guanylate cyclase activity.," *Science*, vol. 216, no. 4552, pp. 1329–30, Jun. 1982.
- [101] D. L. Vesely, H. C. Wormser, and H. N. Abramson, "Biotin analogs activate guanylate cyclase.," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 60, no. 2, pp. 109–14, Jan. 1984.
- [102] J. T. Spence, M. J. Merrill, and H. C. Pitot, "Role of insulin, glucose, and cyclic GMP in the regulation of glucokinase in cultured hepatocytes.," *J. Biol. Chem.*, vol. 256, no. 4, pp. 1598–603, Feb. 1981.
- [103] R. Rodriguez-Melendez and J. Zempleni, "Regulation of gene expression by biotin☆ (review).," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 14, no. 12, pp. 680–690, Dec. 2003.
- [104] "Chromosomes and Chromatin." Sinauer Associates, 2000.
- [105] J. Hymes, K. Fleischhauer, and B. Wolf, "Biotinylation of histones by human serum biotinidase: assessment of biotinyl-transferase activity in sera from normal individuals and children with biotinidase deficiency.," *Biochemical and molecular medicine*, vol. 56, no. 1, pp. 76–83, Oct-1995.
- [106] J. Hymes and B. Wolf, "Human biotinidase isn't just for recycling biotin," *J. Nutr.*, pp. 485–489, 1999.
- [107] M. a Narang, R. Dumas, L. M. Ayer, and R. a Gravel, "Reduced histone biotinylation in multiple carboxylase deficiency patients: a nuclear role for holocarboxylase synthetase.," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 13, no. 1, pp. 15–23, Jan. 2004.

- [108] J. S. Stanley, J. B. Griffin, and J. Zempleni, "Biotinylation of histones in human cells. Effects of cell proliferation.," *Eur. J. Biochem.*, vol. 268, no. 20, pp. 5424–9, Oct. 2001.
- [109] S. B. Scheerger and J. Zempleni, "Expression of oncogenes depends on biotin in human small cell lung cancer cells NCI-H69.," *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, vol. 73, no. 6, pp. 461–7, Nov. 2003.
- [110] S. E. R. H. Crisp, J. B. Griffin, B. R. White, C. F. Toombs, G. Camporeale, H. M. Said, and J. Zempleni, "Biotin supply affects rates of cell proliferation, biotinylation of carboxylases and histones, and expression of the gene encoding the sodium-dependent multivitamin transporter in JAr choriocarcinoma cells.," *Eur. J. Nutr.*, vol. 43, no. 1, pp. 23–31, Feb. 2004.
- [111] J. Zempleni and M. Gralla, "Sodium-dependent multivitamin transporter gene is regulated at the chromatin level by histone biotinylation in human Jurkat lymphoblastoma cells," *J. Nutr.*, pp. 163–166, 2009.
- [112] L. M. Bailey, R. A. Ivanov, J. C. Wallace, and S. W. Polyak, "Artifactual detection of biotin on histones by streptavidin.," *Anal. Biochem.*, vol. 373, no. 1, pp. 71–7, Feb. 2008.
- [113] S. Healy, B. Perez-Cadahia, D. Jia, M. K. McDonald, J. R. Davie, and R. A. Gravel, "Biotin is not a natural histone modification.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1789, no. 11–12, pp. 719–33, Jan. .
- [114] M. L. Lazo de la Vega-Monroy, E. Larrieta, M. S. German, A. Baez-Saldana, and C. Fernandez-Mejia, "Effects of biotin supplementation in the diet on insulin secretion, islet gene expression, glucose homeostasis and beta-cell proportion.," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 24, no. 1, pp. 169–77, Jul. 2012.
- [115] A. M. Holland, L. J. Góñez, G. Naselli, R. J. Macdonald, and L. C. Harrison, "Conditional expression demonstrates the role of the homeodomain transcription factor Pdx1 in maintenance and regeneration of beta-cells in the adult pancreas.," *Diabetes*, vol. 54, no. 9, pp. 2586–95, Sep. 2005.
- [116] J. A. Kushner, J. Ye, M. Schubert, D. J. Burks, M. A. Dow, C. L. Flint, S. Dutta, C. V. E. Wright, M. R. Montminy, and M. F. White, "Pdx1 restores beta cell function in Irs2 knockout mice.," *J. Clin. Invest.*, vol. 109, no. 9, pp. 1193–201, May 2002.
- [117] F. Esni, I. B. Täljedal, A. K. Perl, H. Cremer, G. Christofori, and H. Semb, "Neural cell adhesion molecule (N-CAM) is required for cell type segregation and normal ultrastructure in pancreatic islets.," *J. Cell Biol.*, vol. 144, no. 2, pp. 325–37, Jan. 1999.
- [118] U. Dahl, A. Sjødin, and H. Semb, "Cadherins regulate aggregation of pancreatic beta-cells in vivo.," *Development*, vol. 122, no. 9, pp. 2895–902, Sep. 1996.

- [119] V. Cirulli, D. Baetens, U. Rutishauser, P. A. Halban, L. Orci, and D. G. Rouiller, "Expression of neural cell adhesion molecule (N-CAM) in rat islets and its role in islet cell type segregation.," *J. Cell Sci.*, vol. 107 (Pt 6, pp. 1429–36, Jun. 1994.
- [120] W. Tixi, "Tesis de Maestría: El efecto de la biotina sobre la expresión de genes en el islote pancreático a la primera semana post-ablactación.," Universidad Nacional Autónoma de México, 2012.
- [121] D. Ronquillo, "Tesis Doctoral: Modulación de la expresión de genes CY450 por biotina," 2012.
- [122] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.," *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–8, Dec. 2001.
- [123] T. D. Schmittgen and K. J. Livak, "Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method.," *Nat. Protoc.*, vol. 3, no. 6, pp. 1101–8, Jan. 2008.
- [124] M. Flores, "Tesis Doctoral: Efecto de la biotina en la maduración del islote pancreático en el periodo posterior al destete," 2012.
- [125] G. I. Bell, S. J. Pilkis, I. T. Weber, and K. S. Polonsky, "Glucokinase mutations, insulin secretion, and diabetes mellitus.," *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 58, pp. 171–86, Jan. 1996.
- [126] Y. Namkung, N. Skrypnik, M. J. Jeong, T. Lee, M. S. Lee, H. L. Kim, H. Chin, P. G. Suh, S. S. Kim, and H. S. Shin, "Requirement for the L-type Ca(2+) channel alpha(1D) subunit in postnatal pancreatic beta cell generation.," *J. Clin. Invest.*, vol. 108, no. 7, pp. 1015–22, Oct. 2001.