



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**EFFECTOS DE LA BIOTINA SOBRE LAS CÉLULAS  
ALFA PANCREÁTICAS EN EL PERIODO  
POSTERIOR AL DESTETE DE RATÓN**

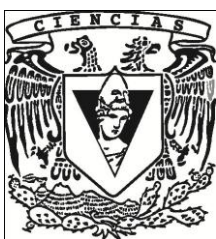
**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**ANA KAREN MÉNDEZ CORONADO**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. MARIA CRISTINA FERNÁNDEZ MEJÍA**

**2015**

**Ciudad Universitaria, D. F.**



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.

## HOJA DE DATOS DEL JURADO

### 1.-Datos del alumno

Apellido paterno: Méndez

Apellido materno: Coronado

Nombre (s): Ana Karen

Teléfono: 55- 32-68-21-98

Universidad Nacional Autónoma de México  
México

Facultad de Ciencias

Carrera: Biología

Número de cuenta: 305324786

### 2.-Datos del tutor

Grado: Dra.

Nombre (s): María Cristina Regina

Apellido paterno; Fernández

Apellido materno: Mejía

### 3.-Datos del sinodal 1

Grado: Dra.

Nombre (s): Lydia Sumiko

Apellido paterno: Morimoto

Apellido materno: Martínez

### 4.-Datos del sinodal 2

Grado: Dr.

Nombre (s): Juan Luis

Apellido paterno: Chávez

Apellido materno: Pacheco

### 5.- Datos del sinodal 3

Grado: M. en C.

Nombre (s): Felipe

Apellido paterno: Alcántara

Apellido materno: Sánchez

### 6.- Datos del sinodal 4

Grado: M. en C.

Nombre (s): Sara Teresa

Apellido paterno: Méndez

Apellido materno: Cruz

### 7.-Datos del trabajo escrito

Título: Efectos de la biotina sobre las células alfa pancreáticas en el periodo posterior al destete de ratón.

Número de páginas: 39

Año: 2015

Esta tesis fue dirigida por:

Dra. María Cristina Fernández Mejía

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:  
**PROYECTO PAPIIT IN210714.**

## ÍNDICE

<b>Resumen</b> .....	6
<b>1 Introducción</b> .....	7
<b>2 Antecedentes</b> .....	8
2.1 Páncreas.....	8
2.1.1 Los islotes pancreáticos.....	9
2.1.2 Composición de los islotes pancreáticos.....	9
2.1.3 Arquitectura de los islotes pancreáticos.....	9
2.1.4 Morfogénesis del islote.....	10
2.1.5 Proliferación en el islote .....	11
2.1.6 Células alfa .....	12
2.2 Diabetes .....	15
2.2.1 Definición.....	15
2.2.2 Epidemiología .....	15
2.3 Programación metabólica .....	16
2.3.1 Definición .....	16
2.3.2 Su relación con la diabetes mellitus .....	16
2.4 Biotina .....	16
2.4.1 Efectos farmacológicos de la biotina .....	18
2.4.2 Biotina en el desarrollo fetal .....	19
2.4.3 Biotina en el metabolismo de carbohidratos .....	19
2.4.4 Efectos de la suplementación con biotina .....	19

<b>3 Planteamiento del problema .....</b>	<b>21</b>
<b>4 Hipótesis .....</b>	<b>22</b>
<b>5 Objetivos .....</b>	<b>22</b>
5.1 Objetivos particulares .....	22
<b>6 Material y métodos .....</b>	<b>22</b>
6.1 Animales en experimentación .....	22
6.2 Determinación de glucosa sanguínea .....	23
6.2.1 Curvas de tolerancia a la glucosa .....	23
6.2.2 Análisis histológicos del páncreas para análisis de proliferación .....	23
6.2.3 Análisis de proliferación .....	24
6.2.4 Análisis de islotes con células alfa al centro .....	24
6.2.5 Análisis estadístico .....	25
<b>7 Resultados .....</b>	<b>25</b>
7.1 Peso corporal .....	25
7.2 Curva de tolerancia a la glucosa .....	26
7.3 Análisis de porcentaje de islotes con células alfa al centro .....	26
7.4 Análisis de células alfa en proliferación .....	28
<b>8 Discusión .....</b>	<b>30</b>
<b>9 Conclusiones .....</b>	<b>32</b>
<b>10 Bibliografía .....</b>	<b>33</b>

## RESUMEN

La biotina es una vitamina hidrosoluble que actúa como grupo prostético de las carboxilasas. A concentraciones farmacológicas interviene en funciones biológicas como el desarrollo embrionario y el metabolismo de carbohidratos. En estudios previos encontramos que la administración de una dieta suplementada con concentraciones farmacológicas de biotina durante ocho semanas aumentan la masa (cantidad) de las células alfa y beta de los islotes del páncreas por medio de un aumento en el tamaño de éstos y modifica la arquitectura de los islotes, observándose un porcentaje más elevado de islotes con células alfa localizadas hacia el centro del islote con respecto a los controles. La pregunta que surge es si este es un proceso gradual que se produce a lo largo de las ocho semanas o si los cambios se realizan en el periodo después del destete, que es un periodo en el que islote es dúctil y susceptible a ser programado metabólicamente. En este trabajo planteamos se analizaron los cambios que produce la administración de biotina durante la primera semana posterior al destete de ratón con la ingesta de una dieta suplementada con biotina sobre la morfología del islote y proliferación de las células alfa y sus efectos sobre la tolerancia a la glucosa. Ratones macho BALB/cAnN Hsd recién destetados se alimentaron por siete días con dieta control o dieta suplementada con biotina (0.8 ó 100 mg de biotina/kg de alimento respectivamente). Los resultados encontraron que los ratones que recibieron la dieta suplementada con biotina presentaron áreas bajo la curva de la prueba de tolerancia a la glucosa mayor que los ratones control suplementados. No se observaron diferencias significativas entre el grupo que recibió la dieta control y el que recibió la suplementada con biotina en la proporción de células alfa al centro del islote, ni en la proliferación celular. Los resultados sugieren que los cambios observados en el islote a las 8 semanas de la ingesta de una dieta suplementada con biotina no se producen en la primera semana de tratamiento sino que se generan gradualmente con el tiempo.

## 1 INTRODUCCIÓN

El cuerpo humano tiene un requerimiento constante de energía, parte de la comida que ingerimos es utilizada para nuestros requerimientos inmediatos y otra gran parte de ella, es almacenada en el organismo principalmente en forma de glucógeno en el hígado, en el músculo y en forma de triglicéridos en el tejido adiposo. Estos nutrientes almacenados son utilizados posteriormente para la obtención de energía en los períodos de ayuno. El almacenamiento y la utilización de estas sustancias se encuentran controlados por mensajes hormonales. (Lazo-de-la-Vega-Monroy, M.L. & Fernandez-Mejia, C, 2010)

En el estado posprandial, la coordinación entre la secreción de insulina por las células beta pancreáticas y la respuesta a la insulina de los principales tejidos que almacenan a la glucosa como el músculo, el hígado y el tejido adiposo, controlan las concentraciones de glucosa en plasma. La insulina promueve la captación de glucosa al interior de las células, la síntesis de glucógeno en el hígado y músculo, la formación de lípidos que se almacenan en el tejido adiposo, y la síntesis de proteínas en la mayoría de las células. El transporte de glucosa hacia el interior de las células del músculo esquelético, representa más del 75% de la captación total de glucosa de todo el organismo. (Klip, A. & Paquet, M.R. 1990).

En el estado de ayuno, la disminución en la concentración plasmática de insulina y el aumento de hormonas que contrarrestan la acción de la insulina, como el glucagon, los glucocorticoides y las catecolaminas, contribuyen a la liberación al torrente sanguíneo de glucosa por medio de la degradación del glucógeno y la gluconeogénesis. Estas hormonas también favorecen la lipólisis, así como la disminución en síntesis de proteínas y el aumento en la degradación de las mismas. (Lazo-de-la-Vega-Monroy, M.L. & Fernandez-Mejia, C, 2010)

Tanto la insulina como el glucagon son sintetizadas y secretadas por los islotes pancreáticos, los cuales constituyen la parte endocrina del páncreas. La secreción de glucagón e insulina por el páncreas insular depende, en gran medida, de la concentración de glucosa del líquido extracelular. La glucosa tiene un efecto directo en la secreción de glucagón y otro indirecto mediado por insulina. Durante el ayuno y el ejercicio se produce una caída de la glucemia que determina un aumento de la secreción de glucagón, asociada a una disminución de la secreción de insulina. Hoy día se sabe que la glucemia tiene un efecto directo no mediado por insulina sobre la secreción de glucagón. (Brandan, N., 2010)



## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 Páncreas

El páncreas es una glándula de secreción mixta que en los mamíferos está localizada en la cavidad abdominal entre el bazo y el duodeno conectándose con este último por la ámpula de Vater, que es la región donde se unen el conducto pancreático principal y el conducto biliar (Bishop, A. et al., 2003)

Anatómicamente el páncreas está dividido en cabeza, cuerpo y cola. La mayor parte del órgano está formada por la parte exócrina que corresponde al tejido acinar el cual produce enzimas digestivas y bicarbonato que son liberados durante la digestión al conducto pancreático y al duodeno. Distribuidos entre el tejido acinar hay grupos de células que forman los denominados islotes de Langerhans, los cuales constituyen la parte endócrina y representan del 1 al 2% del volumen total de la glándula. El tamaño de los islotes varía en diámetro y puede ir de los 50 a 500  $\mu\text{m}$ ; cada uno de ellos está formado por entre 50 y 300 células (Hiriart, M., 2002). (Figura 2)

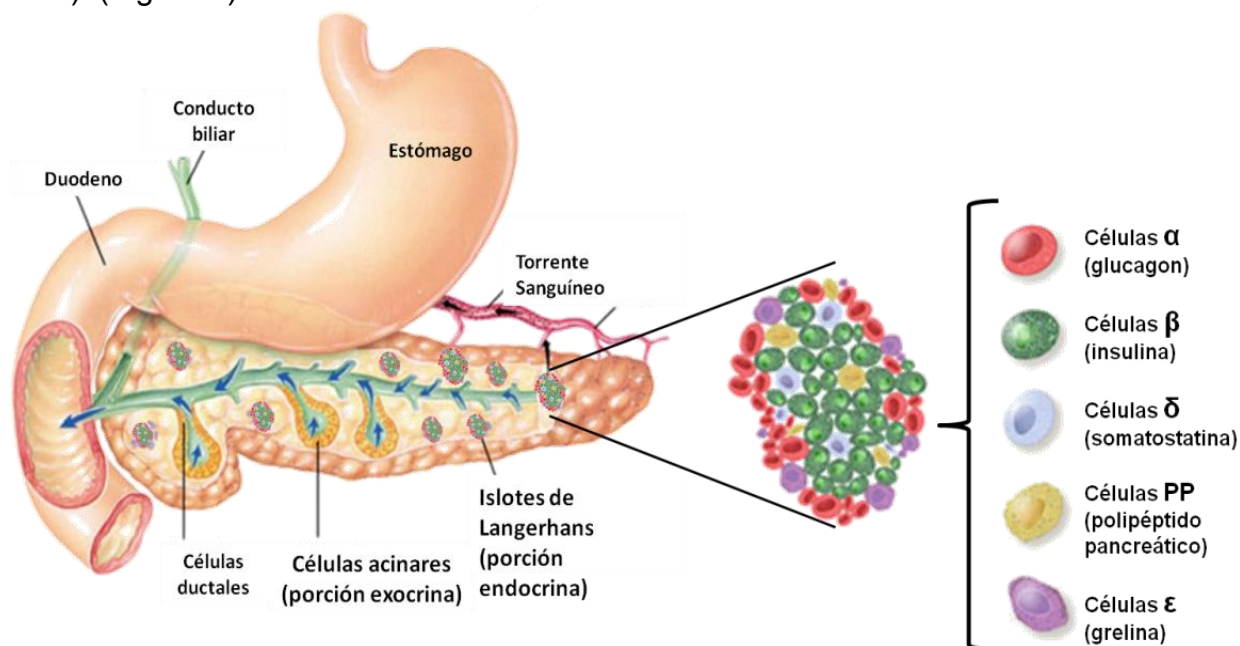


Figura 1 Anatomía del Páncreas Modificada de <http://blogdefarmacia.com> y <http://www.betacell.org> (JP Cartailier).

### **2.1.1 Los islotes pancreáticos**

El páncreas humano contiene entre 500,000 y un millón de islotes pancreáticos. Los islotes son microestructuras o microorganos de entre 50 y 400  $\mu\text{m}$  que se encuentran dispersos a lo largo del tejido acinar en el páncreas, y representan del 1% al 2% de la masa total del páncreas. Los islotes se componen de diversos

tipos celulares, incluyendo células endoteliales, nervios, fibroblastos y, principalmente, células endocrinas. (Kim, S. et al., 2001)

### **2.1.2 Composición de los islotes pancreáticos**

Las distintas células endocrinas que componen al islote producen y secretan diferentes hormonas: las células beta ( $\beta$ ) secretan insulina, las células alfa ( $\alpha$ ) secretan glucagón, las células delta ( $\delta$ ) secretan somatostatina, las células PP secretan polipéptido pancreático, y las células épsilon ( $\epsilon$ ) que secretan grelina. Tanto en los islotes humanos como en los de ratón, las células épsilon son abundantes durante el desarrollo y el nacimiento, mientras que su abundancia es menor en la etapa postnatal (Brissova, M. et al., 2008).

### **2.1.3 Arquitectura de los islotes pancreáticos**

Los islotes pancreáticos no sólo difieren en su composición celular dependiendo de la especie, sino también en su arquitectura. Mientras que en el roedor adulto los islotes presentan las células beta al centro y los otros tipos celulares hacia la periferia del islote, los islotes de humano presentan una arquitectura más heterogénea, con las células beta dispersas entre los demás tipos celulares (Brissova, M. et al., 2005). A pesar de estas diferencias, se conoce poco acerca de las consecuencias que la organización celular y la composición de los islotes pueda tener sobre la función de los mismos.

Se ha propuesto que la correcta estructura de las células endócrinas dentro de los islotes es requerida para su función (Gomez-Dumm, C. et al., 1990; Tokuyama, Y. et al., 1995; Esni, F., 1999) y una apropiada respuesta a cargas de glucosa a través de una secreción de insulina de manera pulsátil y proporcional a la concentración del carbohidrato (Nittala, A. et al., 2007)

La arquitectura normal de un islote de ratón adulto y en general de los roedores consiste en una estructura bien definida generalmente esférica donde las células beta, las cuales representan del 60-80% del total de células en el islote, se encuentran en la parte central; mientras que existe una capa de otras células endócrinas que lo rodean incluyendo células  $\alpha$  (15-20% del total de células en el islote),  $\delta$  (<10% del total) y PP (<1%) (Wieczorek, G. et al., 1998; Brissova, M. et al., 2005;

Cabrera, O. et al 2006; Quesada, I. et al., 2008; Kim, A. et al., 2009). Las células  $\alpha$  aparecen en varias secciones del tejido formando una capa continua de células alrededor de la parte central consistente en células  $\beta$ , sin embargo, análisis tridimensionales recientes sobre la distribución de este tipo celular muestran que las células  $\alpha$  no rodean completamente el islote. (Kharouta, M. et al., 2009)

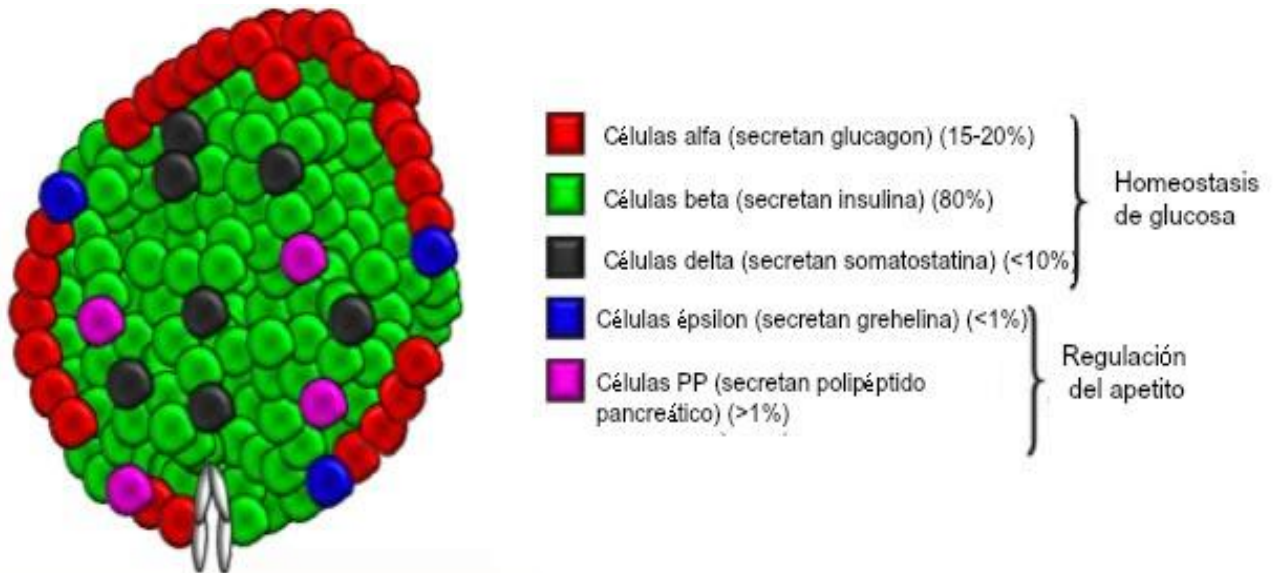
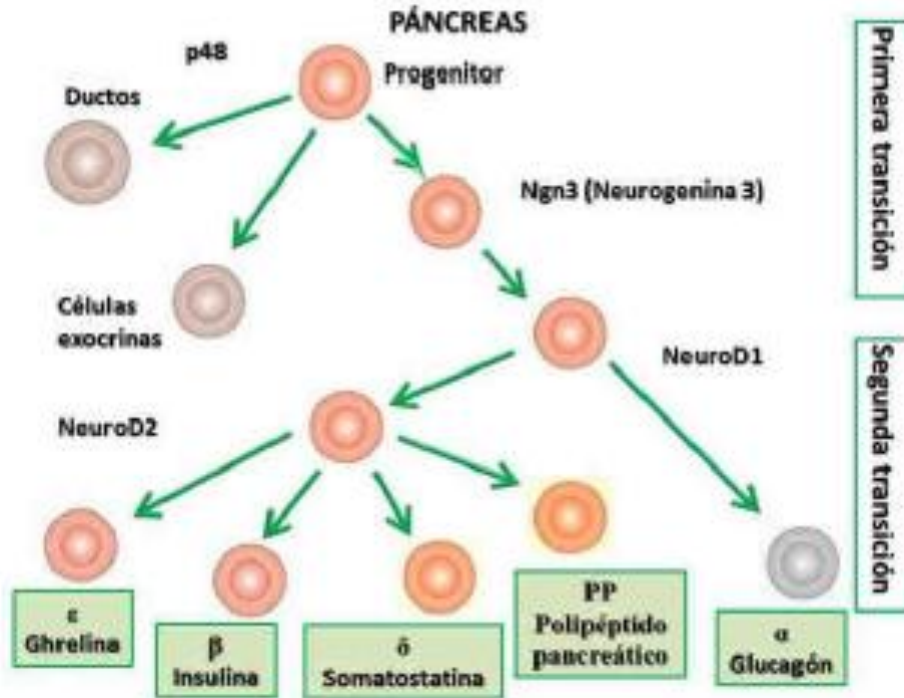


Figura 2 Arquitectura del islote de ratón (Modificado de diabeteseducacion.blogspot.com.mx)

Una desorganización en la arquitectura del islote que ha sido observada en múltiples modelos de ratón a consecuencia de alteraciones en la expresión de genes o por condiciones fisiológicas y/o patológicas. En dichos modelos se presentan alteraciones en la secreción de insulina y/o modificaciones en el metabolismo de la glucosa (Gannon, M et al., 2000; Doyle, M.J et al., 2007).

#### 2.1.4 Morfogénesis del islote

En los ratones la formación de los islotes de Langerhans ocurre alrededor del periodo embrionario E 18-19 y concluye dos o tres semanas después del nacimiento (Habener, J. et al., 2005). El resultado de este proceso es tan complejo que los islotes han sido denominados microorganos (Booner-Weir, S., 1988; Lammert, E., 2003). Para que esto se logre son necesarios una serie de eventos morfogénéticos tales como la especificación celular, migración y reagregación. (Pictet, R., 1972; Slack, J., 1995; Esni F., 1999) (Figura 4)



**Figura 3.** Morfogénesis del islote. **Ngn3 (Neurogenina 3)** Factor de transcripción que se requiere para el desarrollo de los islotes pancreáticos. Tiene un papel crítico en la transcripción de productos hormonales de las células de los islotes, especialmente las células  $\alpha$  y  $\beta$ . (Olvera, C, Leo, E, Hernández, H., 2008) **NeuroD1** (Factor de diferenciación neurogénica 1) Contribuye a la diferenciación de las células del páncreas endócrino. (Brandan, 2010)

### 2.1.5 Proliferación en el islote

La proliferación celular se define como el incremento del número de células por división celular. Este proceso es más activo durante la embriogénesis y el desarrollo de un organismo y es fundamental para la regeneración de tejidos dañados o viejos.

Es característica de cada tipo celular por lo que está controlada de forma muy específica. El genoma codifica un conjunto complejo de proteínas que regulan la división celular y por tanto la proliferación de las células. Asimismo cada tipo celular presenta una serie de receptores de factores de crecimiento característicos que también regulan la proliferación celular al controlar la respuesta a tales factores. (Barberá, A., 2010)

Después del nacimiento la proliferación se convierte en el principal mecanismo en el aumento de la masa de las células del islote, aunque la neogénesis también se está llevando a cabo.

Desde un punto de vista molecular, la expansión y diferenciación de los precursores endodérmicos hacia los distintos linajes pancreáticos son el resultado de una secuencia altamente regulada de señales extracelulares y de cambios en programas de expresión génica. Dichos cambios son dirigidos por una cascada de factores de transcripción cuyas activaciones –inactivaciones coordinadas permiten la progresión del precursor pluripotente a la célula pancreática diferenciada. La identificación de estos factores y de las relaciones epistáticas existentes entre ellos es indispensable para llegar a comprender los procesos que culminan la formación de las células del islote. (Barberá, et al, 2010)

En el incremento y mantenimiento de la masa de las células beta participan diversos procesos, como neogénesis, proliferación, hipertrofia y apoptosis (Meier, et al, 2008). A pesar de que se han identificado progenitores de la célula beta en el páncreas (Montanya, 2000), la participación de la neogénesis durante la etapa postnatal y adulta es causa de controversia (Ackermann, 2007) y se considera que la proliferación (Rhodes, 2005) y la hipertrofia (Ackermann, 2007) son los principales mecanismos responsables de la expansión postnatal de la masa de las células beta (Ackermann, 2007). El organismo es capaz de modificar la masa de las células beta de acuerdo a sus requerimientos de insulina en estados de resistencia a insulina tales como el embarazo y la obesidad, la masa de las células beta se ve incrementada (Parnaud, et al, 2008) principalmente a través de un incremento en la proliferación (Perl, S. et al, 2010)

### **2.1.6 Células alfa**

Son las células encargadas de secretar la hormona glucagon, la cual aumenta las concentraciones de glucosa sanguínea mediante su actividad glucogenolítica y gluconeogénica en el hígado. (Figura 4)

A pesar de que la regulación de la glucemia en unos determinados límites depende tanto de la insulina como del glucagon con base en perfiles de funcionamiento antagónicos, se sabe muy poco de la regulación de la célula alfa.

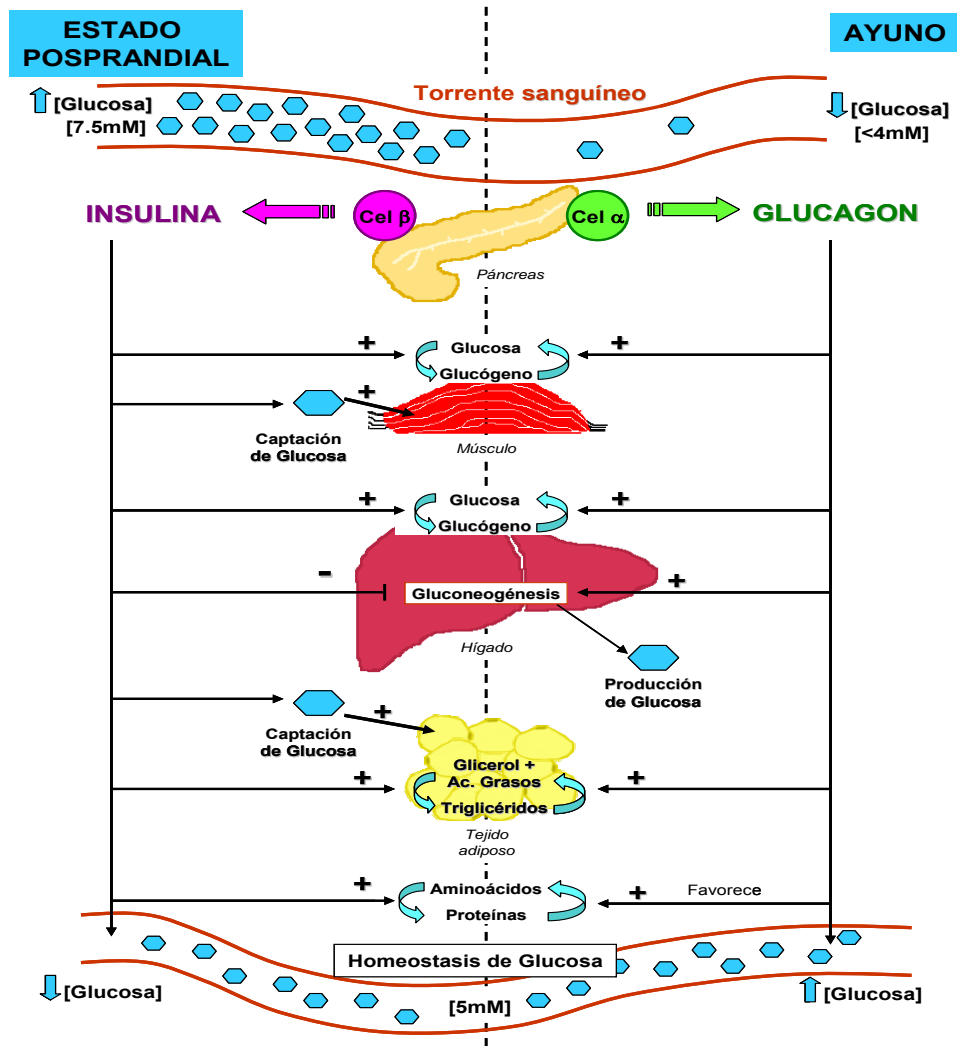


Figura 4 Regulación por metabolismo de mensajes hormonales. (Lazo de la Vega, 2010)

El interés por su estudio ha ido creciendo no sólo por una comprensión de la fisiología integral del islote, sino también por razones clínicas. En el caso de pacientes diabéticos se pueden observar niveles de glucagón elevados que, junto a los niveles bajos de insulina, agravan la hiperglucemia. Se puede observar además en estos casos que la inhibición de la secreción de glucagón al aumentar los niveles de glucosa está alterada, e incluso falla (Quesada, I., 2007).

Con base en otros estudios (Quesada, I., 2007), se sabe que la respuesta ante la glucosa de las células alfa y beta es totalmente opuesta en cuanto a la actividad eléctrica, las señales de Ca<sup>2+</sup> y la liberación hormonal, de manera que las primeras son más activas en bajas concentraciones de glucosa y se inhiben a altas concentraciones, mientras que la población beta responde antagónicamente. (Quesada, I., 2007)

El glucagon tiene un papel importante como proveedor de glucosa al sistema nervioso central (SNC) en los períodos de ayuno. (Brandan, N., 2011). Este efecto se produce mediante la interacción del glucagon con sus receptores membranales, aumentando las concentraciones de AMP cíclico el cual por medio de una cascada de fosforilaciones activa en el hígado la glucogenólisis y a la gluconeogénesis y de esta manera se aumenta la concentración de glucosa en sangre.

EFECTOS DE LA INSULINA Y EL GLUCAGÓN SOBRE EL METABOLISMO		
METABOLITOS	INSULINA	GLUCAGÓN
<b>GLUCOSA</b>		
Transporte de glucosa	Aumenta el transporte de glucosa hacia el músculo esquelético y el tejido adiposo	
Síntesis de glucógeno	Aumenta la síntesis de glucógeno	Promueve la degradación de glucógeno
Gluconeogénesis	Reduce la gluconeogénesis	Aumenta la gluconeogénesis
<b>LÍPIDOS</b>		
Síntesis de TAG	Aumenta la síntesis de TAG	
Transporte de TAG en el tejido adiposo	Aumenta el transporte de AG hacia los adipocitos	Estimula la lipólisis en el tejido adiposo con liberación de AG y glicerol para su utilización en la gluconeogénesis
Activación de la LPL	Inhibe la LPL de los adipocitos, mientras que activa la LPL en las paredes capilares	Activa la LPL de los adipocitos
<b>PROTEÍNAS</b>		
Transporte de aa	Aumenta el transporte activo de aa hacia el interior de las células	Aumenta el transporte de aa hacia el interior de las células hepáticas
Síntesis de proteínas	Aumenta la síntesis de proteínas mediante el incremento de la transcripción de mRNA y la aceleración de la síntesis proteica por el rRNA	Aumenta la degradación de las proteínas con formación de aa para su utilización en la gluconeogénesis
Degradación de proteínas	Reduce la degradación de las proteínas mediante el incremento de la utilización de glucosa y AG como combustibles	Aumenta la conversión de aa en precursores de la glucosa

**Tabla 1** Cuadro comparativo entre los efectos de insulina y glucagon sobre el metabolismo. (TAG: Triglicéridos, AG: Ácidos Grasos, LPL: Lipoproteinlipasa) (Brandan, 2011. Pág. 10)

En la actualidad se sabe que la pérdida de masa y función de la célula beta es un punto determinante en el desarrollo de los diferentes tipos de diabetes. Por lo tanto, cualquier aproximación terapéutica a la cura de esta enfermedad debe afrontar la necesidad de reemplazar o evitar esta disminución de célula beta. Para conseguir este objetivo se pueden utilizar diferentes estrategias: por un lado se puede estimular la renovación de células beta *in situ*, o por otro reponer las células

beta mediante el trasplante de los islotes procedentes de un donante o de células beta generadas *in vitro*. Sea cual sea la estrategia que se escoja, se necesita un amplio conocimiento de los mecanismos que regulan la proliferación, diferenciación y supervivencia de la célula beta *in vivo*. (Barberá, A., 2007). Es por eso que en la actualidad se están haciendo grandes esfuerzos para conocer las bases moleculares que controlan la homeostasis y la diferenciación de la masa de célula beta y no únicamente de este tipo celular, si no de todos aquellos que componen la estructura del islote. En el caso de la célula alfa la historia no debe ser diferente pues una función anormal de este tipo celular puede generar fallas en el control de la glucemia lo que puede ser un importante factor en el desarrollo de la diabetes. (Dunning, BE, et al., 2005) (Figura 4)

## **2.2 Diabetes**

### **2.2.1 Definición**

La diabetes mellitus se define como un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia crónica, resultado de defectos en la secreción de insulina, en la acción de ésta o en ambos (American Diabetes Association, 2010).

### **2.2.2 Epidemiología**

En las últimas cuatro décadas la diabetes se ha convertido en un grave problema de salud en México , siendo ésta la principal causa de muerte en mujeres y la segunda más frecuente en hombres desde el año 2000. Se estima que para 2025 cerca de 11.7 millones de mexicanos serán diagnosticados con la enfermedad (Rull, J.A et al., 2005). Cabe señalar que en el resto del mundo también representa una situación alarmante pues ha alcanzado proporciones epidémicas, siendo los países en vías de desarrollo las naciones más afectadas (Zimmet, P. et al., 2001)

En el desarrollo de la diabetes participan diversos factores, entre ellos el bagaje genético y las cuestiones medioambientales. La razón del explosivo incremento del padecimiento es el estilo de vida que existe en la actualidad, en el cual existe un consumo abundante de calorías y reducida actividad física (Zimmet, P. et al., 2001). Aunado a esto, en los últimos años se ha reconocido que la programación metabólica juega un importante papel y que está relacionada con la etiología de la enfermedad (Simmons, R.A, 2007).



## **2.3 Programación metabólica**

### **2.3.1 Definición**

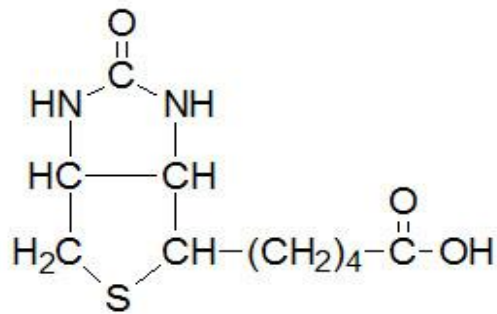
La programación metabólica se define como un fenómeno donde un estrés o estímulo nutricional aplicado durante periodos críticos del desarrollo temprano, altera permanentemente la fisiología y el metabolismo del organismo. Las consecuencias de éste son observadas mucho tiempo después en la vida del individuo a pesar de que el estrés o estímulo con el que se inició ya no esté presente (Lucas A., 1991) (Figura 1)

### **2.3.2 Su relación con la diabetes mellitus**

Estudios epidemiológicos en humanos y animales proveen evidencia de la relación de la programación metabólica con el desarrollo de diabetes tipo 2. Se ha encontrado que un ambiente intrauterino adverso se correlaciona con un incremento en el riesgo de desarrollar la enfermedad (Barker, D., 1995). Así, alteraciones nutricionales durante el periodo crítico de maduración pancreática tales como los cambios en los componentes del alimento (Srinivasan, M., 2003, Aguayo-Mazzucato, et al. 2006), restricción calórica y proteica, dietas ricas en carbohidratos y lípidos (Schwitzgebel, V. et al., 2009), dañan el desarrollo normal del islote a través de una reducción en la proliferación de las células beta y del tamaño de los islotes en la cabeza del páncreas, así como un incremento en la apoptosis, una reducida vascularización y cambios estructurales; los cuales afectan la capacidad del islote de responder a retos metabólicos en periodos posteriores de la vida (Ozanne, S. et al., 2002).

## **2.4 Biotina**

La biotina, también llamada B7 o H, es una vitamina hidrosoluble del complejo B con una estructura química que fue elucidada por primera vez en los años 1940's. Consiste en un compuesto bicíclico con un anillo que contiene un grupo ureido (-N-CO-N-) y otro que contiene un azufre del cual se ramifica una cadena lateral de ácido valérico. En la naturaleza existen ocho posibles estereoisómeros y sólo uno de ellos, la D-biotina, es enzimáticamente activo. Su peso es de 244.3 g/mol; es soluble en agua, etanol y álcalis diluidos (Thorne Research, Inc., 2007). (Figura 5)



**Figura 5** Estructura química de la biotina

Todos los organismos requieren biotina; sin embargo, esta solo puede ser sintetizada por bacterias, levaduras, hongos, algas, y algunas especies de plantas (Mock, D., 1999) La biotina no puede ser sintetizada por los organismos así es que, para otros organismos se hace indispensable el consumo en la dieta con requerimientos de 30 µg diarios. Se encuentra presente en pequeñas cantidades en gran variedad de alimentos tales como nueces, yema de huevo, hígado, levadura, etc. Y generalmente está unida de manera covalente a una lisina, formando así el dímero biocitina (Dakshinamurti, K. et al., 1994). Para su absorción se requiere romper este enlace por acción de la biotinidasa pancreática. (Hymes, J. et al., 1996) para que, de manera libre, sea entonces absorbida por los enterocitos de la porción distal del duodeno y proximal del yeyuno para que posteriormente pase al torrente sanguíneo. La entrada a las células se lleva a cabo por el transportador múltiple de vitaminas dependiente de sodio (SMVT) que reconoce la porción del ácido valérico (Cohen, N. et al., 1982). Este transportador es una proteína de 634 aminoácidos con 12 dominios transmembranales cuyos extremos amino y carboxilo se encuentran hacia el interior de las células. Su papel es el de introducir la biotina junto con el ácido pantoténico y sodio a favor de un gradiente de concentración. (Chatterje, N. et al., 1999).

La función de la biotina en los organismos eucariontes es la de participar como grupo prostético de las enzimas carboxilasas: acetil-CoA carboxilasa (ACC) tanto en su forma citosólica (ACC1) como en la mitocondrial (ACC2), piruvato carboxilasa (PC), propionil-CoA carboxilasa (PCC) y metilcrotonil-CoA carboxilasa (MCC)(Chapman, A. et al., 1999), las cuales intervienen en importantes vías metabólicas como la gluconeogénesis, la síntesis de lípidos y el catabolismo de algunos aminoácidos (Achuta, P. et al., 1972)

Las carboxilasas se sintetizan como apocarboxilasas, es decir, como proteínas sin actividad enzimática. Es hasta que se les une la biotina de manera covalente por acción de la HSC (holocarboxilasa sintetasa), cuando se forma una proteína activa u holoenzima (Chapman, A. et al., 1999) Ésta reacción se lleva a cabo en dos etapas: en la primera la biotina se activa al reaccionar con una molécula de ATP formando el intermediario biotinil-5-adenilato. En la segunda etapa el grupo biotinilo se transfiere a la apoenzima formándose un enlace semipeptídico con un residuo de lisina localizada dentro de una secuencia Met-Lys-Met altamente conservada en todas las apocarboxilasas (Lamhonwah, A. et al. 1987)

La biotina permanece unida a la carboxilasa hasta que es degradada proteolíticamente en el sistema autofágico lisosomal, liberando así residuos de biotina unida a la lisina (biocitina). Este enlace se rompe por acción de la biotinidasa y de esta manera la biotina puede ser reutilizada en nuevas carboxilasas, o bien puede ser degradada a otros catabolitos y ser excretada como bisnorbiotina o biotina sulfóxido. (Wang, K., 1997)

#### **2.4.1 Efectos farmacológicos de la biotina**

Independientemente de su rol como grupo prostético la biotina a concentraciones farmacológicas (entre 30 y 650 veces sus requerimientos diarios de 30 µg) modifica la expresión de genes (Rodríguez Meléndez, R. et al., 2003; Zemleni, J., 2005). Se tienen reportes de que a nivel transcripcional regula diversos genes como la holocarboxilasa sintetasa (HCS) (Rodríguez Meléndez, R. et al., 2001; Solórzano Vargas, S. et al., 2002), ACC, PCC (Solórzano Vargas, S. et al., 2002), glucocinasa (GK) hepática (Chauhan, J. et al., 1991) y pancreática (Borboni, P. et al., 1996; Romero-Navarro, G. et al., 1999), fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK) hepática (Dakshinamurti, K. et al., 1994), insulina (Romero-Navarro, G. et al., 1999), PDX1 (Yoshikawa, H. et al., 2002), interleucina 2 y su receptor (Yoshikawa, H. et al., 2002; Manthey, K. et al., 2002).

Mientras que a nivel postranscripcional se ha encontrado que la biotina modifica la expresión del receptor de asialoglicoproteínas a través de una vía de fosforilaciones que requieren de GMPc y de la proteína cinasa G (PKG) (Stockert, R. et al., 1990; Stockert, R. et al 1997; Collins, J. et al., 1998; De la Vega, L. et al., 2000); así mismo, por un mecanismo transcripcional que requiere de la activación de PKG también regula la expresión del receptor de insulina (De la Vega, L. et al., 2000) y la glucocinasa pancreática (Vilches-Flores, A., 2009).

Su efecto sobre la expresión de genes sustenta su acción sobre un amplio repertorio de efectos a nivel sistémico en procesos como el desarrollo (Watanabe, T. et al., 1990; Watanabe, T., 1996); y el metabolismo, especialmente en el de la glucosa (Fernández-Mejía, C., 2005; Dakshinamurti, K., 2005)

#### **2.4.2 Biotina en el desarrollo fetal**

Cantidades excesivas de biotina afectan el desarrollo y la reproducción. En insectos, específicamente en mosquitos (*Aedes aegypti*) (Pillai, M. et al., 1969), moscas (*Musca domestica*) (Benschoter, C., 1967) y escarabajos (*Dermestes maculates*) (Cohen, E. et al, 1968) la fertilidad se ve reducida debido al exceso de esta vitamina. En ratas la administración aguda durante el embarazo causa reabsorción de los fetos y las placentas (Paul, P. et al., 1975; Paul P. et al., 1976), cabe señalar que estos efectos son a concentraciones muy altas. (100 mg/kg de peso). Sin embargo a estas mismas concentraciones, en ratones no se encontraron efectos adversos ni en las funciones reproductoras ni en el desarrollo embrionario (Watanabe, T., 1996). En un estudio reciente se encontró que concentraciones farmacológicas de biotina afectaron el desarrollo del ojo en ratones (Valenciano, A.I. et al, 2002) este efecto está relacionado con la disminución de la apoptosis pero no de la proliferación de las células. También recientemente (Reyes-Carmona et al. 2011) se reportó que la holocarboxilasa sintetasa, ha sido propuesto participa en la activación de la vía de transducción de señales mediada por GMPc/PKG se encuentra asociada con cambios en la cromatina en diferentes estadios del desarrollo en *Drosophila melanogaster*.

#### **2.4.3 Biotina en el metabolismo de carbohidratos**

Los efectos de la biotina sobre el metabolismo de carbohidratos han sido puestos de manifiesto tanto en *in vivo* como en *in vitro* en condiciones fisiológicas y en el estado diabético. A continuación se describen.

#### **2.4.4 Efectos de la suplementación con biotina.**

Las primeras evidencias que sugirieron que la biotina intervenía en el metabolismo de carbohidratos y que permitieron el descubrimiento de los efectos que tiene sobre la expresión genética fueron reportados por Dakshinamurti y colaboradores (Mistry, S. et al., 1962). Éste grupo encontró que la administración en ratas de dosis farmacológicas de la vitamina (1 mg/kg de peso) incrementa la actividad de la GK (glucocinasa) hepática (Dakshinamurti, K. et al., 1968; Dakshinamurti, K. et al., 1970). Este efecto se observó tanto en condiciones posprandiales, contexto metabólico en el que normalmente la glucosinasa se encuentra aumentada, como en situaciones donde la actividad de la enzima se encuentra disminuida como lo son en el ayuno y los momentos posteriores al consumo de una dieta rica en lípidos. La administración de la biotina a la dosis ya mencionada también produce un incremento prematuro en la síntesis de la GK (glucocinasa) hepática en ratas lactantes, periodo en el que normalmente la enzima no se encuentra presente

(Dakshinamurti, K. et al., 1970). Pasados los años y gracias a los avances en las técnicas de biología molecular se hizo evidente que el efecto que tiene la biotina sobre la GK (glucocinasa) es consecuencia de una modificación en la transcripción del gen (Chauhan, J. et al., 1991).

En ratas preñadas se observó que la administración de altas dosis de la vitamina (10mg/100 g de peso) disminuye la cantidad de glucógeno en útero y placenta, así como la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) en ovario, útero e hígado (Paul, P. et al., 1976).

En cultivos *in vitro* de células también se ha visto que la vitamina tiene efectos sobre la expresión genética. Se ha encontrado que en hepatocitos aislados de ratas la biotina incrementa la actividad de la glucocinasa, evento que es precedido por un aumento en los niveles intracelulares de GMPc (Spence, J. et al., 1984).

También, concentraciones farmacológicas de biotina tiene efectos sobre el islote pancreático. Se ha observado que concentraciones de 10 a 1000 nM aumentan la actividad de la glucocinasa y la abundancia de ARNm en cultivos de islotes pancreáticos aislados de ratas normales en la línea celular pancreática RIN1046-38 (Borboni, P. et al., 1996). Nuestros estudios (Romero-Navarro, G. et al., 1999) y de otros autores (Furukawa, Y. et al., 1995) también encontraron que islotes cultivados en presencia de biotina aumentan la secreción de insulina. También se ha reportado que la biotina incrementa la expresión de PDX-1, el cual es un factor transcripcional determinante para el desarrollo pancreático y para la expresión de genes que participan en funciones fundamentales en el islote de Langerhans (Yoshikawa, H. et al., 2002)

Los estudios hechos en ratones que dan origen a este proyecto (Lazo de la Vega, M. et al., 2013) han demostrado que la administración de una dieta durante 8 semanas conteniendo dosis farmacológicas de la vitamina incrementa la expresión de ARNm de varios factores de transcripción que participan en la expresión de la insulina y la secreción de ésta, tales como FOXa2, Pdx-1 y Hnf4 $\alpha$ , también se observaron incrementos en el ARNm de genes como glucocinasa, Cacna1d, ACC, glucagon y la misma insulina. En el análisis de la secreción de esta hormona hecho en islotes aislados de ratones con dieta rica en biotina se encontró, que comparados con los ratones de la dieta control, la secreción de insulina se ve aumentada significativamente. También se hallaron modificaciones en la arquitectura de los islotes de ratones que recibieron la dieta suplementada con la vitamina, los cuales muestran un alto porcentaje de islotes con células  $\alpha$  al centro (40.6%). Estudios morfológicos revelan que éstos también presentan un mayor tamaño, debido a un número mayor de células que lo componen pero sin modificar la estructura, ni composición celular de los islotes pancreáticos. (Lazo de la Vega, M. et al., 2013).

Un incremento en el tamaño de los islotes puede estar dado por dos factores: un aumento en la proliferación, o una disminución en la apoptosis de las células alfa y/o beta (Ackermann, 2007). Existen algunos reportes que indican que la biotina tiene efectos sobre ambos procesos en diferentes tejidos (Crisp, S.E. et al., 2004, Valenciano, A.I. et al., 2002).

### **3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Estudios efectuados anteriormente los cuales anteceden a este proyecto (Lazo de la Vega, M. et al., 2013), han mostrado que la administración por ocho semanas de una dieta suplementada con biotina (56 veces más la contenida en la dieta control) aumenta en ratones la tolerancia a la glucosa, así como la masa de las células alfa y beta por medio de un aumento en el tamaño de los islotes. En estudios de crecimiento y proliferación se encontró que en células MIN6, la biotina podría incrementar la proliferación de las células, sin embargo estos cambios no resultaron estadísticamente significativos. De forma inesperada, la arquitectura de los islotes se encontró modificada en los ratones suplementados con biotina, observándose un porcentaje más elevado de islotes con células alfa localizadas hacia el centro del islote con respecto a los controles. La pregunta que surge es si este es un proceso gradual que se produce a lo largo de las ocho semanas o si los cambios se realizan en el periodo después del destete, que, como se señaló en la introducción, es un periodo en el islote es susceptible a ser programado metabólicamente.

En este trabajo planteamos analizar los cambios que produce la administración de biotina a la primera semana de la ingesta de la dieta suplementada con biotina sobre la morfología y proliferación de las células alfa. Igualmente analizaremos los efectos sobre la tolerancia a la glucosa.

## **4 HIPÓTESIS**

En ratón dosis farmacológicas de biotina administradas en el periodo posterior al destete de producen cambios en la localización y en la proliferación de las células alfa a la semana de tratamiento.

## **5 OBJETIVOS**

Analizar los efectos que produce la administración biotina durante la primera semana posterior al destete sobre la localización y la proliferación de las células alfa del islote pancreático de ratón.

### **5.1 Objetivos particulares**

- Comparar los cambios producidos entre los animales que recibieron la dieta control y la dieta suplementada con biotina durante una semana sobre:
  1. El peso corporal y el consumo de alimento.
  2. La tolerancia a la glucosa
  3. La distribución de las células alfa en el islote
  4. La proliferación de las células alfa.

## **6 MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.1 Animales en experimentación**

Se usaron ratones machos de la cepa Balb/cAnN Hsd comprados en la compañía Harlan, México. En la tercera semana de edad habiendo sido recién destetados se dividieron en dos grupos experimentales, control y suplementado respectivamente (n=6) que fueron alimentados durante un periodo de ocho días con dos dietas distintas: uno de ellos se alimentó con dieta denominada control (2018S Teklad Global 18% Protein Rodent Maintenance Diet, Harlan Teklad) que contiene 0.8 mg de biotina / kg de alimento, en tanto que el segundo grupo se alimentó con la misma dieta pero suplementada con 100 mg de biotina/ kg de alimento (dosis farmacológica). ¿Qué tan altas son estas concentraciones? ¿Por qué eligieron 100 mg? ¿Hicieron curva dosis-respuesta o en la de quién está basada la elección? ME HACEN ESTA PREGUNTA PERO NO SÉ BIEN COMO ESTRUCTURAR LA RESPUESTA Se determinó el peso corporal y el consumo diario de alimento, así como niveles de glucosa al inicio y al final del experimento. También se realizaron curvas de tolerancia a la glucosa los 7 días de tratamiento. También finalizar el periodo de estudio los

ratones se anestesiaron con Sevorane (Pentobarbital) (Laboratorios Abbott, México) y se extrajeron los páncreas.

Los ratones durante todas las etapas fueron manejados de acuerdo con los procedimientos estándar establecidos por el Comité de Ética para la Experimentación del Instituto de Investigaciones Biomédicas y se mantuvieron en condiciones controladas habituales en los bioterios. El peso corporal y el consumo de alimento fueron monitoreados diariamente con la ayuda de una balanza (Ohaus, Alemania). Al finalizar el tratamiento los animales se dejaron en ayuno toda la noche para después ser sometidos a anestesia inhalada con Sevorane (Pentobarbital). Se obtuvieron muestras de tejido pancreático completo.

## **6.2 Determinación de glucosa sanguínea**

La concentración de glucosa se obtiene por una punción de la vena de la cola. Se midió usando un glucómetro (Medisense Optium Xceed, Laboratorios Abbot, México).

### **6.2.1 Curvas de tolerancia a la glucosa**

Las curvas de tolerancia a la glucosa se efectuaron alrededor de las 10:30 AM en ratones ayunados toda la noche. Se obtuvo una muestra de sangre al tiempo 0 para determinar la glucosa inicial, posteriormente se realizó una inyección intraperitoneal de una solución de glucosa al 10% a una dosis de 2g/kg de peso.

Las determinaciones de glucosa en sangre proveniente de la vena de la cola fueron hechas a 15, 30, 60 y 120 minutos después de la inyección usando un glucómetro (Medisense Optium Xceed, Laboratorios Abbot, México) y tiras reactivas para este aparato (Medisense Optium Xceed, Laboratorios Abbot, México).

### **6.2.2 Análisis histológicos del páncreas para análisis de proliferación**

Una vez extraído el páncreas, se fijó durante 24 h en paraformaldehído al 4% en PBS 1x, se deshidrató en una serie de concentraciones crecientes de etanol y xilol (Etanol al 50°, 70°, 90°, 96° y 100°, etanol 100°/Xilol y Xilol puro, 1h en cada uno), y se embebió en parafina (Paraplast, Sherwood Medical Co.) a 58-60° C durante 1 h. Los páncreas se montaron en cassetes para histología y se hicieron cortes consecutivos de 5 µm de grosor usando un microtomo. Los cortes se montaron en laminillas tratadas con polilisina-L (Sigma-Aldrich).

Las laminillas se desparafinaron y rehidrataron con una serie de xilol y etanol en el orden inverso al utilizado en la deshidratación durante 4 min en cada disolución y se lavaron con PBS 1x por 5 min. Se realizó la recuperación de antígeno hirviendo las laminillas en buffer de citratos (pH6) durante 10 min a 90°C. Posteriormente se permeabilizaron con suero normal de cabra al 3% y Tritón X-100 al 0.3% durante 30 min, y se incubaron durante toda la noche con los anticuerpos: ratón anti-



glucagon (1:6000, Sigma), diluidos en PBS 1x con suero normal de cabra al 1%. Para el análisis de proliferación, se utilizó el anticuerpo conejo anti-PHH3 (Fosfohistona H3) dilución 1:250, (Millipore).

Posteriormente se procedió a hacer las incubaciones con el respectivo anticuerpo secundario: anti- IgG ratón conjugado con FITC (Jackson) a una dilución 1:800 para la detección de glucagon y anti-IgG de conejo conjugado con CYE3 para la detección de PHH3 (Fosfohistona-H3) (Jackson). Para la detección de los núcleos después de las incubaciones los cortes fueron lavados por 5 min tres veces con PBS y posteriormente incubados con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) diluido al momento en suero normal de cabra al 1%) Posteriormente los cortes fueron cubiertos con medio de montaje (Dako) y un cubreobjetos previamente lavado en alcohol absoluto. Las imágenes de los islotes pancreáticos fueron obtenidas usando usando un microscopio Olympus LX100 (Tokio, Japón) y analizadas con el software Image J 1.4 (USA).

El análisis morfométrico se realizó en 2 laminillas de cada ratón, en un total de 4 ratones por grupo

### **6.2.3 Análisis de la proliferación.**

Para analizar la proliferación celular se utilizó PHH3 (Fosfohistona-H3), una proteína que forma parte de la cromatina. Esta proteína se fosforila en la serina-10 y serina-28 cuando la célula se encuentra en mitosis.

El PHH3 es probablemente el marcador más específico de mitosis. Su fosforilación es máxima durante la mitosis, mínima durante la interfase celular e inexistente durante la apoptosis. Esto lo convierte en un marcador muy sensible de mitosis, aunque no es específico de ningún tipo celular. A veces, para evitar confusión es necesario realizar un doble inmunomarcaje con un marcador específico de la estirpe celular estudiada. (Fuentes, L. et al., 2013)

Para este caso el marcaje se realiza para células alfa (glucagon), PHH3 y núcleos (DAPI).

### **6.2.4 Análisis de islotes con células alfa al centro**

La distribución de las células en el islote (arquitectura) se evaluó mediante la cuantificación del porcentaje de los islotes con una o más células alfa localizadas a más de tres capas celulares lejos de la periferia del islote. La cuantificación se llevó a cabo manualmente sobre la fotografía de cada islote utilizando el programa Image J.

## 6.2.5 Análisis estadístico

En el análisis estadístico se usó el programa Statview V.4.5 (Abacus Concepts). Todos los datos presentados corresponden al promedio  $\pm$  error estándar. La significancia estadística fue evaluada por una prueba de ANOVA de dos vías. Los valores de  $P$  menores a 0.05 son considerados como estadísticamente significativos.

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Peso corporal

El peso de los animales fue registrado todos los días a lo largo del experimento. No hubo diferencia en la ganancia de peso durante el tratamiento. Se observaron aumentos graduales de peso con respecto al tiempo. Si bien se nota un aumento pronunciado en el peso a los 5 días en los ratones control, este no es significativo estadísticamente y es el resultado de los errores estándar obtenidos en las mediciones. La curva de crecimiento indica el peso promedio en gramos de ratones de la cepa BALB/cAnN Hsd, controles y suplementados con biotina durante los 7 días de tratamiento. No hubo diferencia en la ganancia de peso durante el tratamiento. (Figura 6)

#### Curva de crecimiento

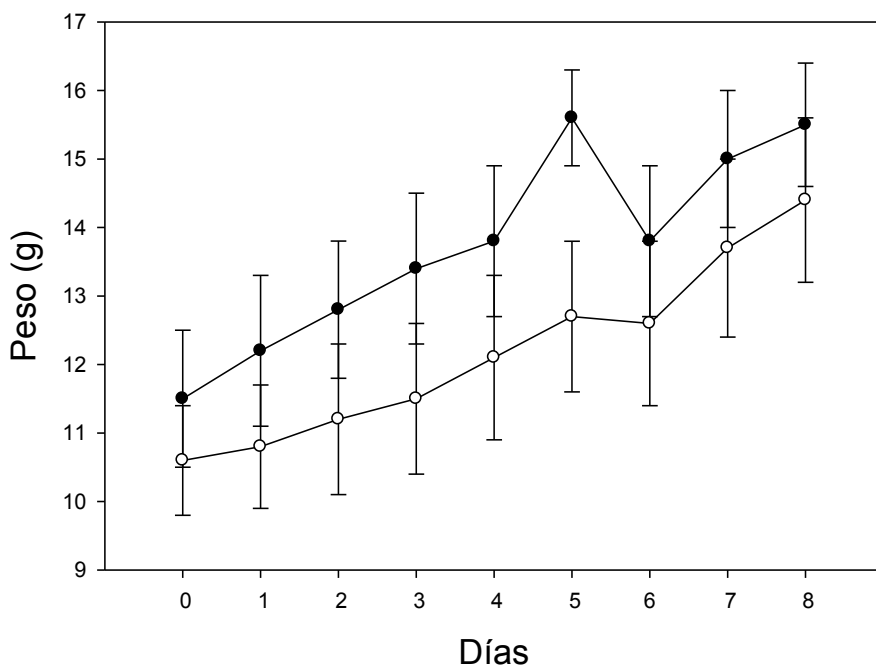
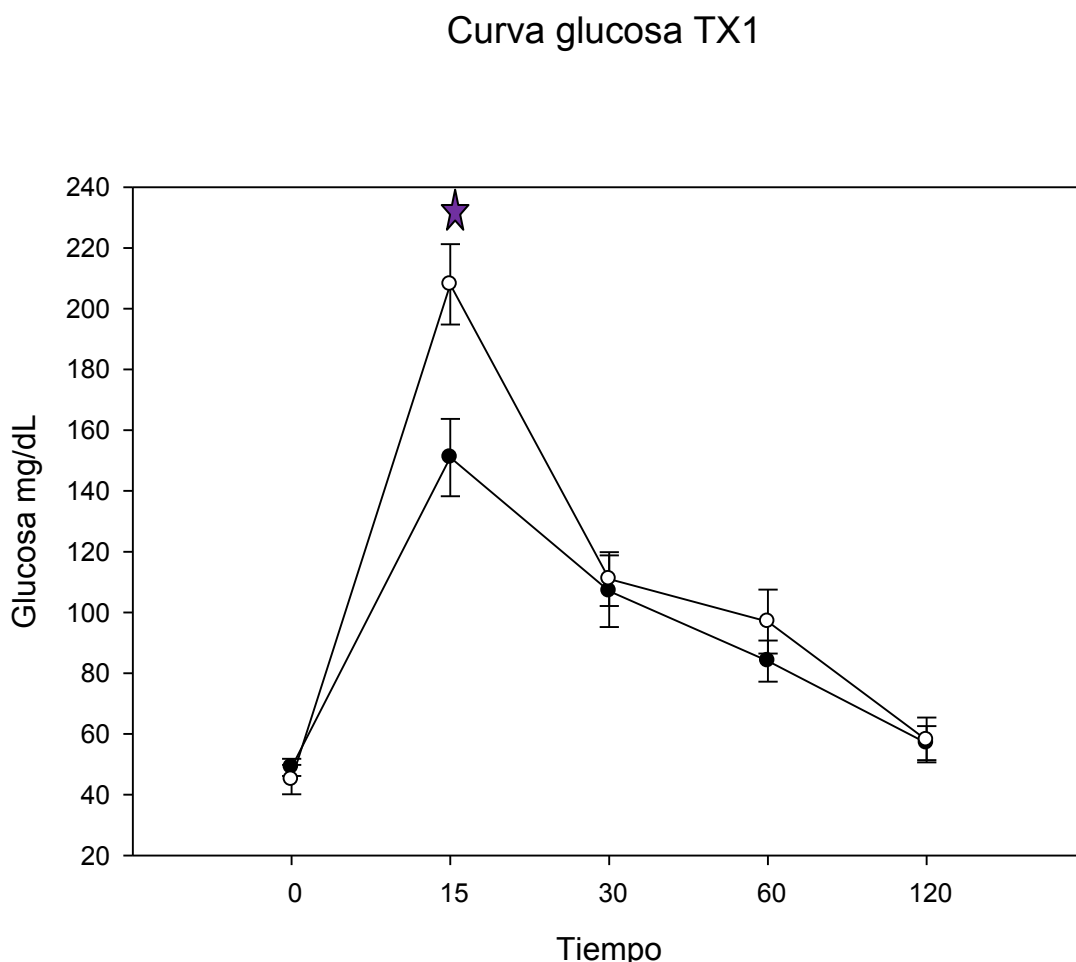


Figura 6 Peso corporal en gramos presentados diariamente durante la experimentación de ratones control (n=6, círculos negro) y suplementados con biotina (n=6, círculos blancos).

## 7.2 Curva de tolerancia a la glucosa

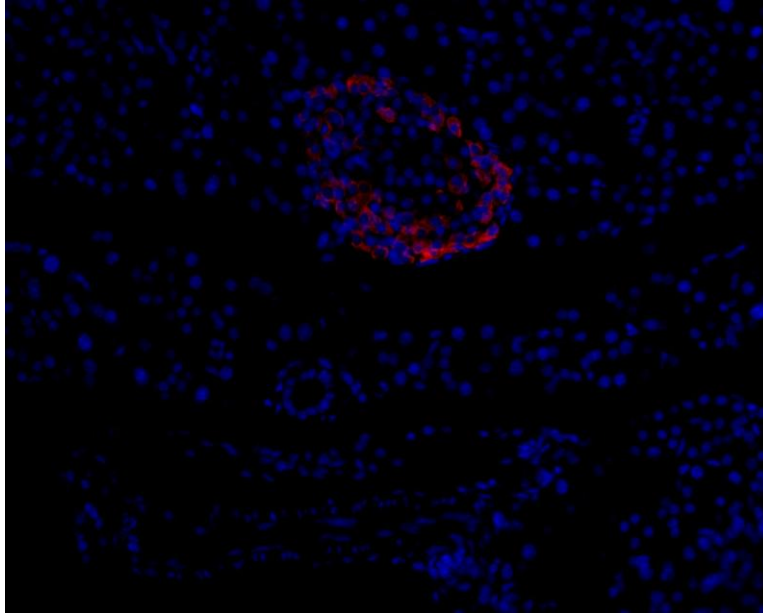
Se realizó la curva de tolerancia al día 7 de tratamiento, observándose que a los 15 minutos de la administración de glucosa los valores fueron mayores en el grupo suplementado. En tanto que los niveles de glucosa fueron semejantes para los dos grupos a los tiempos subsecuentes. (Figura 7)



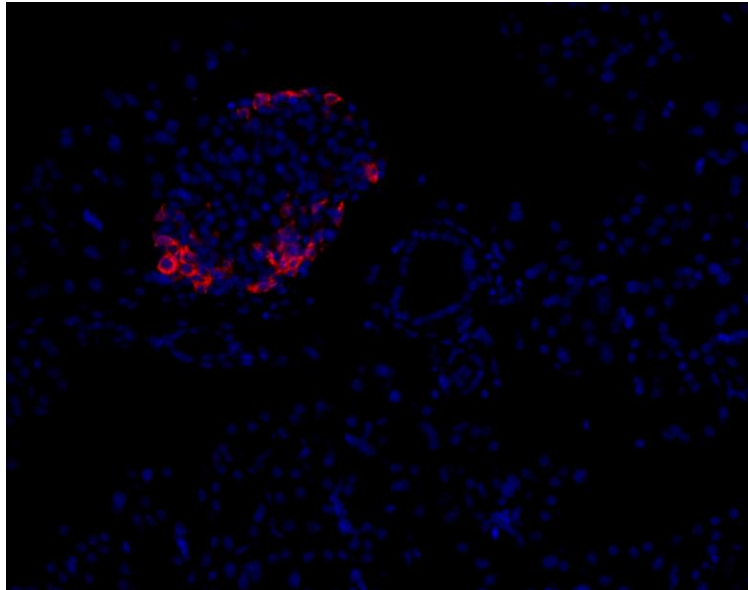
**Figura 7** Curva intraperitoneal de tolerancia a la glucosa en ratones control (círculos negros, n=6) y ratones suplementados con biotina (círculos blancos n=6). \*P<0.05 Comparado con el control.

## 7.3 Análisis del porcentaje de islotes con células alfa al centro

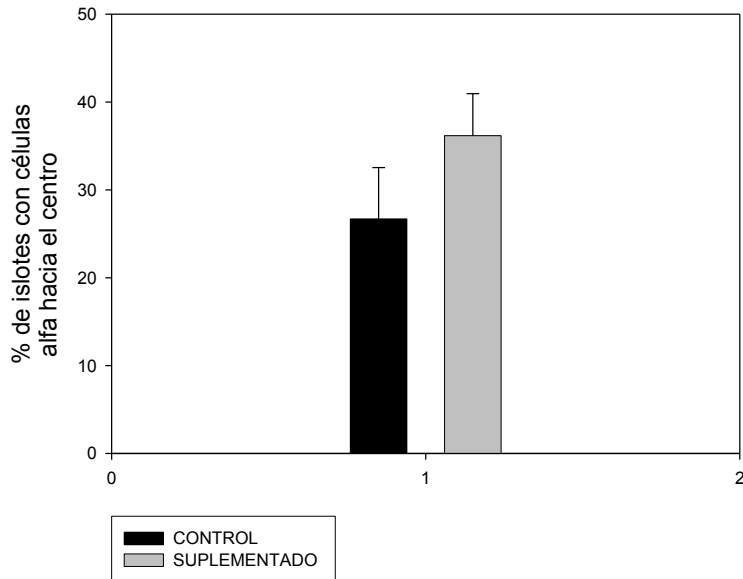
Como se señaló anteriormente, la administración de 8 semana de una dieta suplementada con biotina aumentó la proporción de células alfa al centro. En este estudio analizamos el efecto de la dieta suplementada a la semana de ingesta. Lo que se observa es que la biotina no modifica significativamente la frecuencia de células alfa localizadas en el centro del islote ya que se obtuvo un  $26.7 \pm 5.8$  en el control y un  $36.1 \pm 4.7$  en el suplementado. (Figura 8 y 9)



**Figura 8 A)** Islote representativo del grupo control con células alfa al centro (Escala 10X)



**B )**Islote representativo del grupo suplementado con células alfa al centro (Escala 10X)

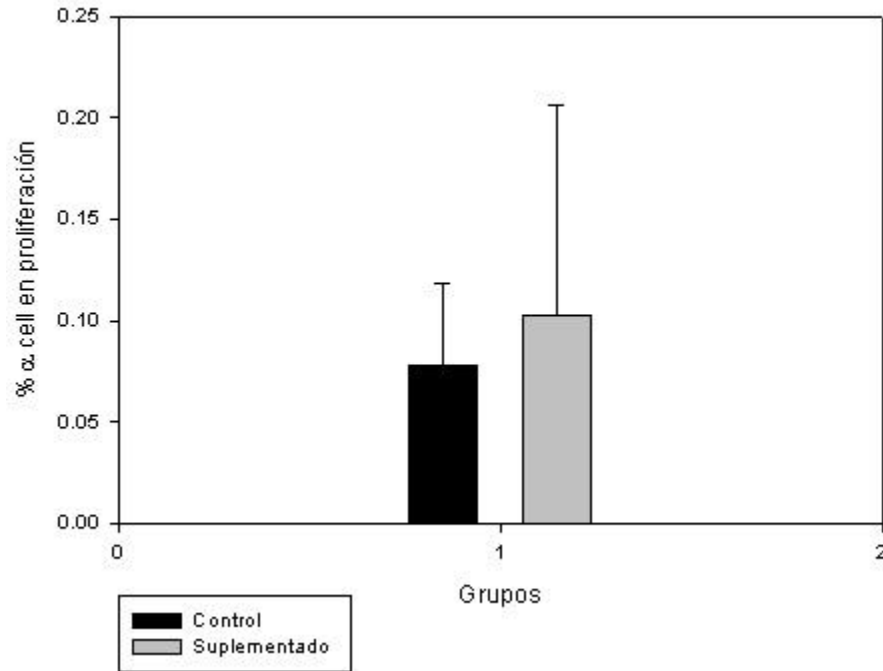


**Figura 9** Porcentaje (media  $\pm$  ES) de islotes (n=4) con más de una célula positiva a glucagon hacia el centro (cuarta capa de células alejada de la periferia o más) del islote. \*P<0.05 comparada con el control.

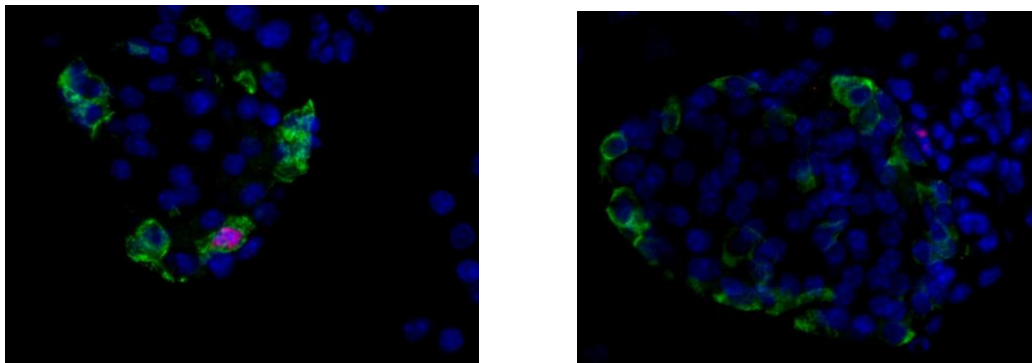
#### 7.4 Análisis de células alfa en proliferación

Existen algunos reportes que indican que la biotina tiene efectos sobre la proliferación (Crisp, S.E. et al., 2004). Para determinar si un incremento en la proliferación estaba participando en el aumento del tamaño de los islotes, analizamos el porcentaje de células en proliferación mediante el marcador fosfohistona H-3 (PHH3), una proteína que permite determinar la proliferación y no detecta la apoptosis, (Fuertes, L. et al., 2013) además de marcar glucagon y 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (marcador de núcleo celular) en cortes histológicos de páncreas aislados de ratones control y suplementados con biotina. (Figura 6 y 7). Los resultados muestran muy bajo porcentaje de células en proliferación y no se observaron diferencias significativas entre los grupos. Se buscó también hacer estudios utilizando el marcador de citoqueratina 20 (Ck20) que es otro marcador de proliferación celular en el cual no fue posible observar la inmunofluorescencia de esta proteína. (Figura 10 y 11)

## Proliferación



**Figura 10** Porcentaje (media ± ES) de islotes (n=4) con células alfa en proliferación. \*P<0.05 comparada con el control



**Figura 11** A) Islote control representativo en proliferación B) Islote suplementado representativo en proliferación

(Escala 10X, DAPI=azul, PHH3=rojo, Glucagon=verde) (Escala 10X, DAPI=azul, PHH3=rojo, Glucagon=verde)

## 8 DISCUSION

Estudios efectuados previamente en el laboratorio en donde se realizó esta tesis (Lazo de la Vega, M. et al., 2013), han mostrado que la administración por ocho semanas de una dieta suplementada con biotina aumenta la masa de las células alfa y beta por medio de un aumento en el tamaño de los islotes. De forma inesperada, la arquitectura de los islotes se encontró modificada en los ratones suplementados con biotina, observándose un porcentaje más elevado de islotes con células alfa localizadas hacia el centro del islote con respecto a los controles. Es interesante conocer si este es un proceso gradual que se produce a lo largo de las ocho semanas o si los cambios se realizan en el periodo después del destete, que, como se sabe, es un periodo en el islote es susceptible a ser programado metabólicamente. (Lazo de la Vega, M. et al., 2013)

En este trabajo propusimos el estudio de los cambios que produce la administración de una dieta suplementada con biotina durante una semana sobre la tolerancia a la glucosa, la presencia de células alfa al centro del islote y sobre mecanismos que podrían participar en el aumento del tamaño de los islotes.

Primeramente comparamos los cambios en el peso corporal de los ratones bajo la dieta control y la dieta suplementada con biotina, este estudio también permite detectar anomalías (enfermedad, bajo aumento de peso) en los sujetos de estudio. Los resultados indican que la ganancia de peso fue similar en los dos grupos. Estos datos apoyan observaciones previas del laboratorio que indican que la suplementación de biotina en la dieta no modifica la ganancia de peso de los ratones. (Lazo de la Vega 2013)

También analizamos el efecto de la dieta en este periodo sobre la tolerancia a la glucosa. Si bien las concentraciones de glucosa no difieren entre los dos grupos a los 30, 60 y 120 minutos de la curva de tolerancia, a los 15 minutos el grupo suplementado presenta concentraciones de glucosa mayores que el grupo control. Esta diferencia podría estar dada por una alteración en la primera fase de la secreción de insulina, la cual se produce en los primeros minutos del estímulo de glucosa, como resultado de un proceso complejo de múltiples pasos que requiere de: el transporte y la oxidación de la glucosa, cambios electrofisiológicos y la fusión de gránulos secretores que contienen insulina con la membrana plasmática de la célula beta). Estos resultados difieren de los hallazgos a las 8 semanas de tratamiento, en donde se observa que el grupo suplementado presenta áreas bajo la curva menores del que presenta el grupo control (Lazo de la Vega, M. et al., 2013). Estudios abordando los mecanismos involucrados en la primera fase de la secreción de insulina serán de gran utilidad para determinar las bases moleculares de estos efectos.

Tomando en cuenta las observaciones del efecto de la vitamina sobre el aumento en la proporción de células alfa al centro del islote a las 8 semanas de ingesta de la dieta suplementada, cuantificamos la presencia de células alfa en el centro del

islote a la primera semana posterior al destete. No se observaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre el grupo que recibió la dieta control y el que recibió la suplementada con biotina, aunque el número de células alfa fue un poco mayor en el suplementado. Los resultados sugieren que los cambios en la proporción de las células alfa en el centro del islote observada a las 8 semanas (Lazo de la Vega, M. et al., 2013) podría generarse gradualmente con el tiempo. Se requieren, por lo tanto experimentos que analicen el curso temporal de los efectos de la suplementación de biotina sobre el islote.

En estudios anteriores se encontró que la administración de 8 semanas de una dieta suplementada con biotina aumentó el tamaño de los islotes y un aumento en la masa de las células alfa. (Lazo de la Vega, M. et al., 2013). Un incremento en el tamaño de los islotes puede estar dado por dos factores: un aumento en la proliferación, un aumento en la neogénesis, o una disminución en la apoptosis de las células alfa y/o beta (Ackermann, A.M. et al., 2007). El que se haya encontrado un aumento en su tamaño en respuesta a 8 semanas de la dieta suplementada con biotina podría deberse a un incremento en la proliferación ya que existen reportes de que la biotina *in vitro* aumenta tasas de esta (Crisp, S.E. et al., 2004). En este trabajo se investigo la proliferación celular mediante técnicas de inmunohistoquímica analizando la presencia de PHH3 en el núcleo. Aunque hubiéramos esperado que durante este periodo hubiese cambios en la proliferación, los resultados nos muestran que la tasa de proliferación encontrada es muy baja, lo que nos sugiere que otros procesos como la neogénesis pudieran estar participando.



## 9 CONCLUSIONES

No hubo diferencias en la ganancia de peso entre los animales que consumieron la dieta control y los que consumieron la dieta suplementada con la vitamina.

El área bajo la curva de la prueba de tolerancia a la glucosa fue mayor en los ratones suplementados.

No se observaron diferencias significativas en la proporción de células alfa al centro del islote entre el grupo que recibió la dieta control y el que recibió la suplementada con biotina.

La tasa de proliferación celular fue muy baja, sin encontrarse diferencias significativas entre los dos grupos, aunque si hay una tendencia de aumento en los suplementados.

Los resultados sugieren que los cambios observados en el islote a las 8 semanas de la ingesta de una dieta suplementada con biotina no se generan en la primera semana de tratamiento sino que podrían generarse gradualmente con el tiempo.

Estos resultados nos abren camino a buscar otros mecanismos por medio del cual se esté dando este efecto de aumento de tamaño en los islotes. Estudios a futuro analizarán otras posibilidades como la expresión de INGAP, una proteína participante de la neogénesis, maduración y regeneración pancreática.(Chang, T.J. et al., 2004) Además de un estudio de curso temporal para observar los cambios que se van generando con el tiempo.

## 10 BIBLIOGRAFIA

Achuta, P.N. & Mistry, S.P. Synthesis of biotin-dependent carboxylases from their apoproteins and biotin. *Biochem Rev* 43, 1-12 (1972).

Ackermann, A.M. & Gannon, M. Molecular regulation of pancreatic beta-cell mass development, maintenance, and expansion. *J Mol Endocrinol* 38, 193-206 (2007).  
Aguayo-Mazzucato, C., Sanchez-Soto, C., Godinez-Puig, V., Gutierrez-Ospina, G. & Hiriart, M. Restructuring of pancreatic islets and insulin secretion in a postnatal critical window. *PLoS ONE* 1, e35 (2006).

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 28, 1:S5-S10 (2010).

Barberá, A., Gasa, R. Desarrollo embrionario del páncreas y regeneración en el páncreas adulto. *El Islote Pancreático en el Desarrollo y Tratamiento de la Diabetes*. Cap. 8. (2007).

Barker, D.J. Fetal origins of coronary heart disease. *British Med. J.* 311, 171-174. (1995).

Benschoter, C.A. Effect of dietary biotin on reproduction of the house fly. *J Econ Entomol* 60, 1326-8 (1967).

Bishop, A. & Polak, J. The anatomy, organization and ultrastructure of the islets of Langerhans in text book of diabetes 1. Blackwell Publishing. Tercera edición. USA. (2003).

Bonner-Weir, S. Morphological evidence for pancreatic polarity of  $\beta$  cell within islets of Langerhans. *Diabetes*. 37, 616-21 (1988).

Borboni, P. et al. Effect of biotin on glucokinase activity, mRNA expression and insulin release in cultured beta-cells. *Acta Diabetol* 33, 154-8 (1996).

Brandan, N.C. Hormonas pancreáticas. Cátedra de Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Noreste. (2011).

Brissova, M. & Powers, A.C. Architecture of Pancreatic Islets. in *Pancreatic Beta Cell in Health and Disease* (eds. Seino, S. & Graeme, I.B.) (Springer, Japan, 2008).

Brissova, M. et al. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem* 53, 1087-97 (2005).

Cabrera, O. et al. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2334-9 (2006).

Chapman, A. & Cronan, J. Molecular biology of attachment to proteins. *J Nutr* 129, 447S-84S (1999).

Chapman, A. & Cronan, J. The enzymatic biotinylation of proteins: a post-translational modification of exceptional specificity. *Trends Biochem Sci* 24, 359-63. (1999).

Chatterjee N., Kumar, C., Ortiz, A., Rubin, S. & Said, H. Molecular mechanism of the intestinal biotin transport process. *Am J Physiol* 277: C605-13 (1999).

Chauhan, J. & Dakshinamurti, K. Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats. *J Biol Chem* 266,10035-8 (1991).

Collins, J., Paietta, E., Green, R., Morell, A. & Stockert, R. Biotin dependent expression of the asialoglycoprotein receptor in HepG2 cells. *J Biol Chem* 263, 11 (1998).

Cohen, E. & Levinson, H.Z. Disrupted fertility of the hidebeetle *Dermestes maculatus* (Deg.) due to dietary overdosage of biotin. *Experientia* 24, 367-8 (1968).

Cohen, N. & Thomas, M. Biotin transport into fully differentiated 3T3-L1 cell. *Biochim Biophys Re Comm* 10: 1508-16 (1982).

Crisp, SE., et al. 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.* 43: 23-31. (2004).

Dakshinamurti, K. Biotin--a regulator of gene expression. *J Nutr Biochem* 16, 419-23 (2005).

Dakshinamurti, K. & Cheah-Tan C. Liver glucokinase of the biotin deficient rat. *Can J Biochem* 46, 75-80 (1968).

Dakshinamurti, K. & Ho Chong Hong. Regulation of key hepatic glycolytic enzymes. *Enzymol Biol Clin* 11, 423-8 (1970).

Dakshinamurti, K. & Li, W. Transcriptional regulation of the liver phosphoenolpyruvate carboxykinase by biotin in diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 132, 127-32 (1994).

De la Vega, L. & Stockert, R. Regulation of the insulin and asialoglycoprotein receptors via cGMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol* 279, C2037-42 (2000).

Doyle, M.J. & Sussel, L. Nkx2.2 regulates beta-cell function in the mature islet. *Diabetes* 56, 1999-2007 (2007)

- Dunning BE, Foley JE & Ahrens J. Alpha cell function in health and disease: influence of glucagon like peptide-1. *Diabetologia* 48 1700–1713. (2005)
- Esni, F. et al. Neural cell adhesion molecule (N-CAM) is required for cell type segregation and normal ultrastructure in pancreatic islets. *J Cell Biol* 144, 325-37 (1999)
- Fernández-Mejía, C. Pharmacological effects of biotin. *J Nutr Biochem* 16, 424-7 (2005).
- Fuertes, L., et al. Inmunohistoquímica en dermatopatología: revisión de los anticuerpos utilizados con mayor frecuencia (parte II). *Act Derm Sifil* 104: 181-203 (2013).
- Furukawa, Y., Ohinata, K., Ikai, M., Maebashi, M., Zhang, H. & Kimura, S. Biotin-stimulated insulin secretion in biotin-deficient rats. *J Clin Biochem Nutr*; 18, 35-42 (1995).
- Gannon, M. et al. Persistent expression of HNF6 in islet endocrine cells causes disrupted islet architecture and loss of beta cell function. *Development* 127, 2883-95 (2000)
- Gomez Dumm, C.L., Semino, M.C. & Gagliardino, J.J. Sequential morphological changes in pancreatic islets of spontaneously diabetic rats. *Pancreas* 5, 533-9 (1990)
- Habener, J.F., Kemp, D.M. & Thomas, M.K. Minireview: Transcriptional regulation in pancreatic development. *Endocrinology*. 146, 1025-34 (2005)
- Hiriart, M. Vidaltamayo, R. Cuestión de hormonas: el papel de las hormonas del páncreas en la salud y en la diabetes. *Ciencia*. 53, 38-45 (2002)
- Hymes, J. & Wolf, J. Human biotinidase isn't just for recycling biotin. *J Nutr* 129, 485S-9S (1996).
- Kharouta, M., Miller, K., Kim, A., Wojcik, P., Kilimnik, G., Dey, A., et al. No mantle formation in rodent islet-The prototype of islet revisited. *Diabetes Research and Clinical Practice* 85, 252-7 (2009)
- Kim, A., Miller, K., Jo, J., Kilimnik, G., Wojcik, P. & Hara, M. Islet architecture: a comparative study. *Islets* 1, 129-36 (2009).
- Kim, S.K. & Hebrok, M. Intercellular signals regulating pancreas development and function. *Genes Dev*. 15: 111-127 (2001).

Klip, A. & Paquet, M.R. Glucose transport and glucose transporters in muscle and their metabolic regulation. *Diabetes Care* 13, 228-43 (1990).

Lamhonwah, A., Quan, F. & Gravel, R. Sequence homology around the biotin-binding site of human propionyl-CoA carboxylase. *Arch Biochem Biophys* 254, 631-6 (1987).

Lammert, E. Cleaver, O., Melton, D. Role of endothelial cells in early pancreas and liver development. *Mech of develop.* 120, 59-64 (2003)

Lazo-de-la-Vega-Monroy, M.L. & Fernandez-Mejia, C. Bases moleculares de la diabetes tipo 2. in *Diabetes* (eds. Morales-González, J.A. et al.) (Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca, Hidalgo, México., 2010).

Lazo-de-la-Vega-Monroy, M.L., Larrieta, E., German, M.S., Baez-Saldana, A. & Fernández Mejía, C. Effects of biotin supplementation in the diet on insulin secretion, islet gene expression, glucose homeostasis and beta-cell proportion. *J Nutr Biochem.* Jan;24(1):169-77 (2013)

Lucas, A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp.* 1991;156:38-50; discussion 50-5. Review. (1991).

Manthey, K., Griffin, J. & Zempleni, J. Biotin supply affects expression of biotin transporters, biotinylation of carboxylases and metabolism of interleukine-2 in Jurkat cells. *J Nutr* 132, 887-92 (2002).

Meier, J. et al. Beta-cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of beta-cell mass in humans. *Diabetes* 57, 1584-1594 (2008)

Mistry, S., Dakshinamurti, K. & Modi, V. Impairment of glucose utilization in biotin deficiency. *Arch Biochem Biophys* 96, 674-5 (1962).

Mock DM. Biotin. In: Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC, eds. *Modern Nutrition in Health and Disease*. 9th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 459-466 (1999)

Montanya, E., Nacher, V., Biarnes, M. & Soler, J. Linear correlation between beta-cell mass and body weight throughout the lifespan in Lewis rats: role of beta-cell hyperplasia and hypertrophy. *Diabetes* 49, 1341-6 (2000).

Nittala, A. Gosh, S. & Wang, X. Investigating the role of islet citoarcitecture in its oscillation using a new  $\beta$  cell cluster model. *PLoS ONE* 2(10): e983 (2007)

Ozzane S.E., Hales C.N. Pre-and early postnatal nongenetic determinants of type 2 diabetes. *Expert Reviews in Molecular Medicine* vol.4. Cambridge University press. (2002)

Parnaud, G. et al. Proliferation of sorted human and rat beta cells. *Diabetologia* 51, 91-100 (2008).

Paul, P.K. & Duttagupta, P.N. The effect of an acute dose of biotin at the pre-implantation stage and its relation with female sex steroids in the rat. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 21, 89-101 (1975).

Perl, S. et al. Significant human beta-cell turnover is limited to the first three decades of life as determined by in vivo thymidine analog incorporation and radiocarbon dating. *J Clin Endocrinol Metab* 95, E234-9 (2010).

Pictet, R.L., Clark, R.W., Williams, R.H., & Rutter, W.J. An ultrastructural analysis of the developing embryonic pancreas. *Dev Biol* 29, 436-67 (1972)

Pillai, M.K. & Medhukar, B.V. Effect of biotin on the fertility of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* (L.). *Naturwissenschaften* 56, 218-9 (1969).

Quesada, I. Regulación por la glucose de la función de las células alfa, beta y delta del islote de Langerhans. *El Islote Pancreático en el Desarrollo y Tratamiento de la Diabetes. Sociedad Española de Diabetes.* (2007).

Quesada, I., Tuduri, E., Ripoll, C., Nadal, A. Physiology of the pancreatic  $\alpha$  cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *J of Endocr.* 199,5-19. (2008)

Reyes-Carmona S, Valadéz-Graham V, Aguilar-Fuentes J, Zurita M., León-Del-Río A. Trafficking and chromatin dynamics of holocarboxylase synthetase during development of *Drosophila melanogaster*. *Molecular Genetics and Metabolism* 103 (2011) 240–248

Rhodes, C.J. Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? *Science* 307, 380-4 (2005).

Romero-Navarro, G. et al. Biotin regulation of pancreatic glucokinase and insulin in primary cultured rat islets and in biotin-deficient rats. *Endocrinology* 140, 4595-600 (1999).

Romero-Navarro, G., Labrador-Lladres, M., Ferrnán, M., Matchinsky, J., Wang, J. & Fernández-Mejía, C. Biotin regulation of pancreatic glucokinase and insulin in primary cultured rat islets and in biotin deficient rats. *Endocrinol* 140, 4595-600 (1999).

Rodríguez-Melendez, R., Cano, S., Mendez, S.T. & Velazquez, A. Biotin regulates the genetic expression of holocarboxylase synthetase and mitochondrial carboxylases in rats. *J Nutr* 131, 1909-13 (2001).

Rodriguez-Melendez, R., Griffin, J.B., Sarath, G. & Zemleni, J. High-throughput immunoblotting identifies biotin-dependent signaling proteins in HepG2 hepatocarcinoma cells. *J Nutr* 135, 1659-66 (2005).

Rodriguez-Melendez, R. & Zemleni, J. Regulation of gene expression by biotin (review). *J Nutr Biochem* 14, 680-90 (2003).

Domero-Navarro, J., Labrador-Lladres, J., Ferrn, M., Matchinsky, J., Wang, J. & Fernndez-Mejía, C. Biotin regulation of pancreatic glucokinase and insulin in primary cultured rat islets and in biotin deficient rats. *Endocrinol* 140, 4595-600 (1999).

Rull JA, Aguilar-Salinas C.A., Rojas R., Rios Torres J.M, et al. Epidemiology of type 2 diabetes in Mexico. *Archives of medical research.* 36, 188-196 (2005).

Schwitzgebel V.M., Somme E., Klee P. Modeling intrauterine growth retardation in rodents: impact on pancreas development and glucose homeostasis. *Mol Cell Endocrinol.* 304, 78-83 (2009).

Slack, J.M. Developmental biology of the pancreas. *Development* 121, 1569-80 (1995)

Simmons, D. Developmental origins of  $\beta$ -cell failure in type 2 diabetes: The role of epigenetic mechanisms. *Pediatric Research.* 61 64R-67R (2007)

Solorzano-Vargas, R.S., Pacheco-Alvarez, D. & Leon-Del-Rio, A. 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* 99, 5325-30 (2002).

Spence, J. & Koudelka, A. Effects of biotin upon the intracellular level of cGMP and the activity of glucokinase in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem* 259, 6393-6 (1984).

Srinivasan, M. Neonatal nutrition: Metabolic programming of pancreatic islets and obesity. *Exp Biol Med.* 228, 15-23 (2003)

Stockert, R. & Morell, A. Second messenger modulation of the asialoglycoprotein receptor. *J Biol Chem* 265, 1841-6 (1990).

Stockert, R. & Ren, Q. Cytoplasmic protein mRNA interaction mediates cGMP-modulated translational control of the asialoglycoprotein receptor. *J Biol Chem* 267, 56-9 (1997).

Thorne Research, Inc. Biotin. *Alternative Medicine Review.* 12, 1-5 (2007)

Tokuyama, Y. et al. Evolution of beta-cell dysfunction in the male Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes* 44, 1447-57 (1995)

Valenciano, A.I., Mayordomo, R., de la Rosa, E.J. & Hallbook, F. Biotin decreases retinas apoptosis and induces eye malformations in the early chick embryo. *Neuroreport* 13, 297-9 (2002).

Vilches-Flores, A., Tovar, A.R., Marín-Hernández, A., Rojas-Ochoa. & Fernandez-Mejía, C. 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* Jul;21(7):606-12. (2009).

Wang, K., Mock, N. & Mock, D. Biotin biotransformation to bosnorbiotin is accelerated by several peroxisome proliferators and steroid hormones in rats. *J Nutr* 127, 2212-6 (1997).

Watanabe, T. & Endo, A. Teratogenic effects of maternal biotin deficiency on mouse embryos examined at midgestation. *Teratology* 42, 295-300 (1990).

Watanabe, T. Morphological and biochemical effects of excessive amounts of biotin on embryonic development in mice. *Experientia* 52, 149-54 (1996).

Wieczorek, G., Pospischil, A. & Perentes, E. A comparative immunohistochemical study of pancreatic islets in laboratory animals (rats, dogs, minipigs, nonhuman primates). *Exp Toxicol Pathol* 50:151-72 (1998)

Yoshikawa, H. et al. Effects of biotin on glucotoxicity or lipotoxicity in rat pancreatic islets. *Metabolism* 51, 163-8 (2002).

Zempleni, J. Uptake localization, and non carboxylase roles of biotin. *Annu Rev Nutr* 25, 175-96 (2005).

Zimmet, P., Alberti KG., Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*. 414, 782-7 (2001).