



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFECTO DE LA BIOTINA EN LOS ISLOTES DE
LANGERHANS DE RATÓN ANTE EL DAÑO
PRODUCIDO POR UNA PANCREATECTOMÍA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

(B I Ó L O G O)

P R E S E N T A:

IXEL LUNA CAÑEDO



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. MARÍA CRISTINA REGINA FERNÁNDEZ
MEJÍA
México, D.F., 2015**



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

Ixel
Luna
Cañedo
5558621363
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
307056980

2. Datos del Asesor

Dra.
María Cristina Regina
Fernández
Mejía

3. Datos del sinodal 1

Dr.
René de Jesús
Cárdenas
Vázquez

4. Datos sinodal 2

Dra.
María Eugenia
Gonsebatt
Bonaparte

5. Sinodal 3

Dra.
María Cristina Regina
Fernández
Mejía

6. Datos del sinodal 4

Dr.
Juan Luis
Chávez
Pacheco

7. Datos sinodal 5

M. en C.
Miguel Ángel
Palomino
Garibay

8. Datos del trabajo escrito

Efecto de la biotina en los islotes de Langerhans de ratón ante el daño producido por una pancreatectomía

48p

2015

Este trabajo de tesis fue realizado en la Unidad de Genética de la Nutrición del
Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de
México/ Instituto Nacional de Pediatría

El trabajo de esta tesis fue posible gracias al apoyo de :
Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM
Proyecto PAPIIT IN210714

Agradecimientos y Dedicatorias Personales

Este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo de mis padres, ya que ellos siempre me han impulsado a salir adelante. A mi madre Irma Cañedo Solares por ser mostrarme lo que es ser una mujer trabajadora así como lo que implica ser un investigador y el gran sacrificio que conlleva esta profesión . A mi padre Héctor Luna Pastén por ser un ejemplo de que no existe edad para lograr lo que te propongas; por ser una persona llena de alegría y optimismo. Ambos mi más grande ejemplo a seguir, LOS AMO. A mi hermana Ale que además de ser una hermana es mi mejor amiga , de alguna manera ella también formo parte de este proceso y me dio apoyo moral en todo momento. A todos ellos les dedico con mucho amor este trabajo ya que es una de las primeras metas de todas las que aun me faltan por lograr.

De igual manera quiero agradecer de manera especial a la Dra. Cristina Fernández Mejía por dedicarme tiempo y por guiarme durante el lapso de realización de esta Tesis. También quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio , a Willma Tixi por su ayuda en la parte de la obtención de fotos para este proyecto.

ÍNDICE

A.RESUMEN	1
B. INTRODUCCIÓN.....	2
B.1. EL PÁNCREAS.....	3
B.2 LOS ISLOTES DE LANGERHANS.....	4
B.2.1 Los islotes de Langerhans y su composición	4
B.2.2 Diferencias en la Citoarquitectura del islote Pancreático en Ratones y Humanos	5
B.3 LA INSULINA.....	6
B.3.1. Estructura y su síntesis de la Insulina.....	6
B.3.2. La secreción de la insulina.....	7
B.3.3 Primera y Segunda fase de secreción de insulina	8
B.4 DESARROLLO DEL PÁNCREAS.....	9
B.4.1 Morfogénesis del páncreas	9
B.4.2 Células madre embrionarias como precursoras del páncreas e islotes pancreáticos.....	10
B.4.3 Señalización y desarrollo pancreático	11
B.4.4 Diferenciación endócrina pancreática.....	12
B.5. FACTORES QUE DETERMINAN LA MASA DE CELULAS BETA.....	13,14
B.6 REGENERACIÓN DEL PÁNCREAS ADULTO Y PANCREATECTOMÍA COMO MODELO EXPERIMENTAL DE REGENERACIÓN.....	15
B.7. DIABETES.....	16
B.7.1 Epidemiología.....	16
B.7.2 Diabetes tipo I.....	16
B.7.3 Diabetes tipo-II.....	17
B.8. VENTANA CRÍTICA.....	17
B.9. LA BIOTINA	18
B.9.1 La función de la biotina a concentraciones farmacológicas	19
B.9.2 Efectos de la biotina sobre el metabolismo de la glucosa	19
B.9.3 Efectos de la biotina en los islotes pancreáticos	20
B.9.4Efectos de la suplementación con Biotina en Diabetes.....	20

C. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	21
D. HIPOTESIS.....	21
E. OBJETIVOS.....	21
E.1. Objetivo general	21
E.2. Objetivos particulares	21
F. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	22
G. MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
G.1. Animales de experimentación.....	23
G.2. Procedimiento quirúrgico.....	23
G.3. Determinación de glucosa en sangre	24
G.4. Curva de crecimiento	24
G.5. Curvas de tolerancia a la glucosa.....	24
G.6. Analisis histológicos de páncreas.....	24
G.7. Análisis estadístico.....	25
H. RESULTADOS.....	25
H.1. Peso del páncreas extraído.	25
H.2. Peso corporal.....	26
H.3. Concentraciones de glucosa.....	27,28
H.4. Curva de tolerancia a la glucosa	29
H.5. Peso del páncreas.....	30
H.6. Determinación de la regeneración del páncreas al día 7 post cirugía.....	31,32
H.7. Morfología pancreática.....	33
H.8. Número de Islotes.....	34
H.9. Tamaño del islote.....	34,35
H.10. Porcentaje de células beta	36,37
H.11. Porcentaje de células alfa	36,37
I. DISCUSIÓN.....	38
I.1 Efecto de la biotina en el peso corporal.....	38
I.2. Efectos de la biotina en el metabolismo de la glucosa	38
I.3. Efecto de la biotina en el peso del páncreas y la regeneración.....	39
I.4. Efecto de la biotina en el número de islotes.....	40
I.5. Efecto de la biotina en el tamaño de los islotes	40
I.6. Efecto de la biotina en la proporción de células beta y células alfa.....	40
J. CONCLUSIONES.....	41

K. PERSPECTIVAS.....	41
L.REFERENCIAS.....	42,43,44,45,46,47,48

A. RESUMEN

La biotina es una vitamina hidrosoluble del complejo B que a concentraciones farmacológicas tienen efectos sobre la proliferación, el desarrollo, la reproducción y el metabolismo. La biotina favorece el metabolismo de la glucosa. En estudios previos se vio que la administración de una dieta suplementada con biotina durante ocho semanas incrementa la expresión de genes que favorecen la síntesis de insulina, aumenta su secreción y produce cambios estructurales en el islote pancreático, que es el encargado de mantener la homeostasis de la glucosa, su estructura y su funcionalidad está determinada en etapas tempranas del desarrollo. El periodo posterior al destete es una ventana crítica en la cual la exposición a factores ambientales puede programar la función de varios órganos en etapas posteriores a la vida. Sin embargo se desconoce si la suplementación con biotina durante la ventana crítica es suficiente para proteger ante un daño pancreático en la etapa adulta.

En este trabajo se analizan los efectos de la suplementación con biotina en el periodo de ventana crítica posterior al destete, ante un daño causado por pancreatectomía en la etapa adulta. Ratones BalB/c AnN Hsd hembra recibieron una dieta suplementada con biotina (108 mg de biotina/kg dieta) o una dieta control (0.9 mg biotina/kg dieta) durante las 3 semanas posteriores al destete. Al término de las 3 semanas, el grupo suplementado comenzó a recibir dieta control hasta el día del sacrificio. A las 5 semanas posteriores al destete una parte de los ratones se sometieron a una pancreatectomía parcial, Se formaron 4 grupos: control SHAM, suplementado SHAM, control pancreatectomía (PTT), suplementado pancreatectomía (PTT). Posterior a la cirugía se evaluó diariamente durante una semana la homeostasis de la glucosa, peso corporal. Al término de la semana se realizó el sacrificio y se extrajo el páncreas para el análisis morfométrico de los islotes mediante inmunohistoquímica.

Se encontraron efectos benéficos con la suplementación con biotina que se vieron reflejados en el peso corporal, concentraciones de glucosa en sangre y la tolerancia a ésta. Además encontramos un aumento en la regeneración del páncreas en los ratones pancreatectomizados que recibieron la dieta suplementada.

B. INTRODUCCIÓN

Para la mayoría de los seres vivos, los alimentos representan la fuente que cubre sus necesidades energéticas, a su vez éstos se transforman en una reserva de nutrientes y energía que las células de los diferentes tejidos pueden utilizar en periodos de ayuno o restricción de aporte exógeno de nutrientes. El almacenamiento y la utilización de estas sustancias están controlados por mensajes hormonales que dirigen la integración metabólica del organismo completo (Virginia Melo Ruiz et al. 2007)

En el estado postprandial (después de comer), hay una inter-relación entre la insulina secretada por las células beta y los órganos que almacenan la glucosa, cómo el músculo y el hígado que en conjunto controlan las concentraciones de glucosa en sangre.

La insulina promueve la captación de glucosa, la síntesis de glucógeno en hígado y músculo, así como la captación y síntesis de lípidos que se almacenan en el tejido adiposo. Mientras que en el estado postprandial (después de ingerir alimentos) inhibe la formación de glucosa y la lipólisis (Fig.1)

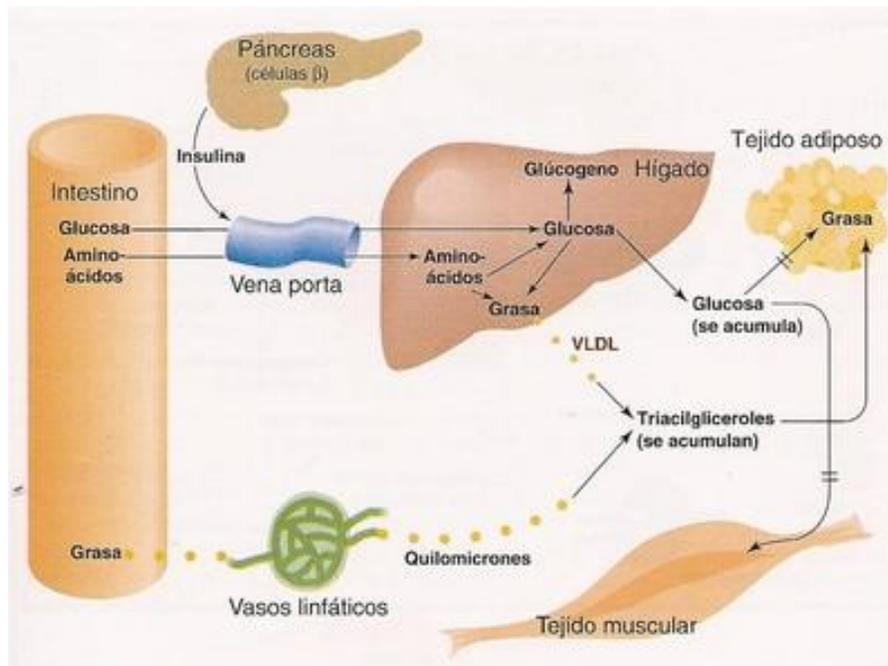


Figura 1. Muestra la actividad de la insulina secretada por las células beta en estado postprandial.

Durante el ayuno, hay una disminución en las concentraciones de insulina en plasma y un aumento en hormonas que contrarrestan la acción de la insulina, como lo es el glucagón, los glucocorticoides y las catecolaminas, que contribuyen a la liberación de glucosa en sangre por medio de la degradación de glucógeno y la gluconeogénesis. Estas hormonas también favorecen la lipólisis. El glucagón y la insulina son sintetizadas por los islotes pancreáticos que se encuentran en el páncreas (Fig.2)

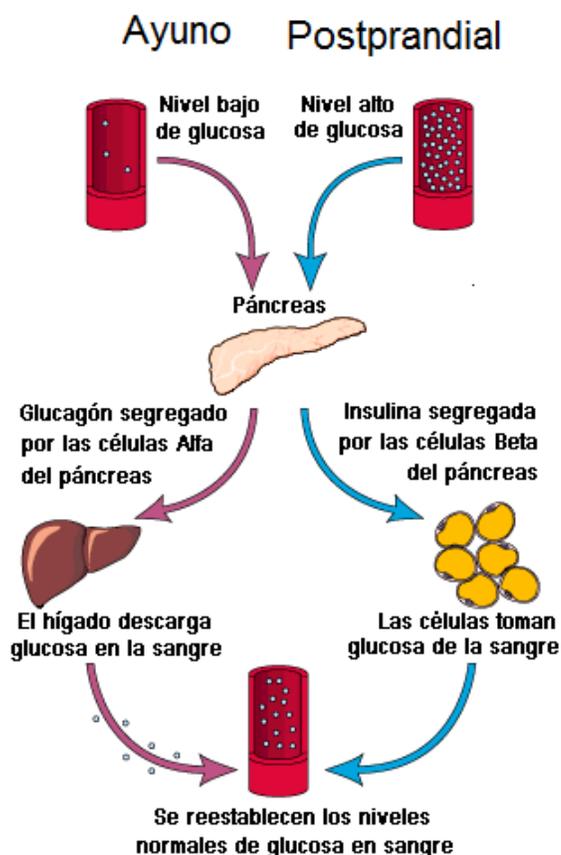


Figura 2. Se observa que tanto la insulina y el glucagón son sintetizadas por el islote pancreático para mantener la homeostasis de la glucosa en plasma. imagen tomada de <http://163.178.103.176/CasosBerne/7gRenal/Caso38-1/HTML/CasosB2/Poli/Poli1.htm>

B.1. ELPÁNCREAS

Es una glándula que se encuentra en el abdomen, en el humano mide de 14-18 cm de largo y se extiende entre el duodeno y el bazo. Anatómicamente el páncreas está dividido en cabeza cuerpo y cola y se encuentra constituido por tejido exócrino y endocrino. La parte exócrina ocupa la mayor parte del páncreas y está compuesta por acinos que son encargados de sintetizar y secretar enzimas

como la amilasa, la lipasa, fosfolipasa, ribonucleasa, desoxirribonucleasa; todas estas enzimas pancreáticas tienen funciones digestivas y su pH óptimo es alcalino. La parte endocrina del páncreas está conformada por los islotes de Langerhans (Ulrich Weish et al. 2008)

B.2 LOS ISLOTES DE LANGERHANS

B.2.1 Los islotes de Langerhans y su composición

El páncreas posee aproximadamente 1 millón de islotes que constituyen 1-1.5 % del total de masa pancreática en humanos. Los islotes se encuentran constituidos por células beta, células alfa, células delta, las células gama también llamadas células PP y las células épsilon. Cada islote secreta hormonas; la insulina que es secretada por las células beta, el glucagón secretado por las células alfa, la somatostatina secretada por las células delta, las células gama secretan polipéptido pancreático y las células épsilon que secretan grelina (Stephen Nussey and Saffron Whitehead et al. 2001). El fuerte acoplamiento entre la secreción de insulina y glucagón en relación a los nutrientes que se encuentran en la sangre es posible debido a la disposición anatómica de los islotes y la dirección del flujo de sangre en cada islote.

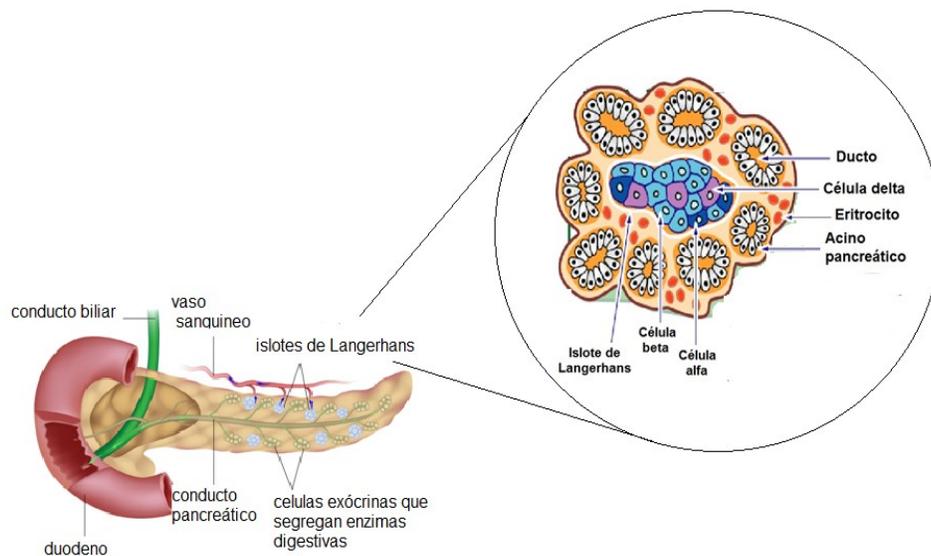


Fig 3. El páncreas y su composición

En humanos alrededor de un 50% de las células del islote corresponde a las células beta, un 35% a células alfa y un 11% a células delta. En ratón las proporciones cambian, un 77% corresponde a células beta, un 19% a células alfa,

y un 6% a células delta, las épsilon son importantes en el nacimiento y en el desarrollo pero disminuyen en la etapa posnatal (Brisova M & Powers et al. 2008).

B.2.2 Diferencias en la Citoarquitectura del islote Pancreático en Ratones y Humanos

En roedores como ratones y ratas, la arquitectura del islote se caracteriza por tener las células beta en el centro, una capa de células que rodea a las células beta, esta capa de células incluye a las células alfa, células delta y épsilon (Donald J. Steiner, Abraham Kim et al. 2010) (Fig. 4). Dependiendo de la región del páncreas, la proporción de células endocrinas cambia, pues en los islotes de la región del cuerpo y la cola hay un mayor porcentaje de células alfa comparado con los que se encuentran en la cabeza. (Aguayo Mazzucato et al. 2006). Hay otros estudios que sugieren que hay un gran número de islotes en la cola del páncreas comparada con la cabeza (Donald J. Steiner, Abraham Kim et al. 2010) (Elayat AA et al. 1995)

En islotes humanos no hay una distribución específica como en ratones, las células alfa, beta, delta y épsilon están distribuidas aleatoriamente en todo el islote (Donald J. Steiner, Abraham Kim et al. 2010) Cabrera reporta diferencias en la proporción de células endócrinas en diferentes regiones del páncreas, aunque Brissova y Stefan describen gran número de células PP en la cabeza y gran número de células alfa y beta en el cuello, cuerpo y cola. (Cabrera O, Berman 2005) (Brissova, 2005) (Stefan 1982) (Fig. 4).

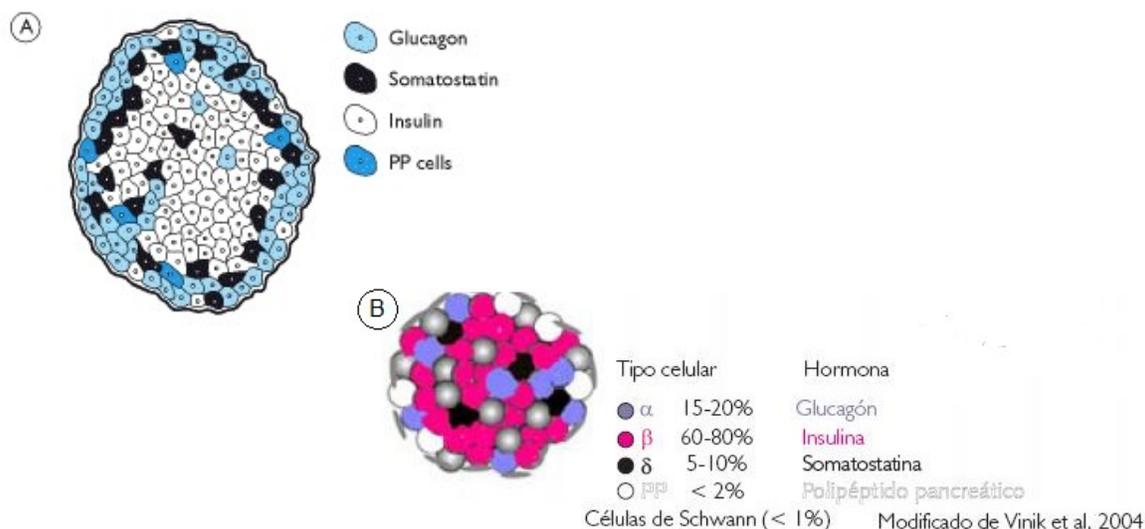


Figura 4. Diferencias entre el islote de un ratón y el humano. Se muestran las diferencias entre un islote de ratón, en el que las células β de insulina se encuentran al centro rodeadas por células β, δ, ε (a) y un islote de Humano que mantiene una distribución aleatoria de todas las células (b). Imagen modificada de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books> & <http://www.scielo.org.mx/>

B.3 LA INSULINA

B.3.1. Estructura y su síntesis de la Insulina

La insulina es una hormona peptídica de 5.8 KDa, consiste de dos cadenas unidas por dos enlaces disulfuro: la cadena A contiene 21 aminoácidos y la B 30 aminoácidos. Las cadenas están unidas por puentes disulfuro. El gen de la insulina codifica para la síntesis de una sola cadena, precursor de la insulina, la preproinsulina consiste en una péptidosecuencia de 24 aminoácidos en el extremo aminoterminal, seguido de la secuencia B de la insulina, unida a la secuencia que forma el péptido de conexión o péptido C de unos 30 aminoácidos y como terminal la secuencia A de la insulina en el extremo carboxilo terminal (Raimundo Goberna Ortiz et al.1995).

La preproinsulina pierde un péptido terminal y se transforma en proinsulina en el retículo endoplasmático. La proinsulina tiene la estructura tridimensional de la insulina con el péptido de conexión o péptido C. Las moléculas de proinsulina y de insulina se agregan en forma de hexámeros con Zn^{+2} (Raimundo Goberna Ortiz et al.1995) el hexámero es la forma en la que se almacena la insulina en las células beta, sin embargo la forma activa es en forma de monómero.

La proinsulina es más soluble que la insulina ya que contiene residuos cargados en el péptido C, pasa del retículo endoplasmático al aparato de Golgi mediante vesículas transportadoras que requieren GTP y calcio. En Golgi se forma la vesícula con clatrina y aparece el granulo beta inmaduro, formándose un núcleo denso de cristales de insulina y proinsulina con el zinc en forma de hexámeros. (Raimundo Goberna Ortiz 1995)(Fig. 7).

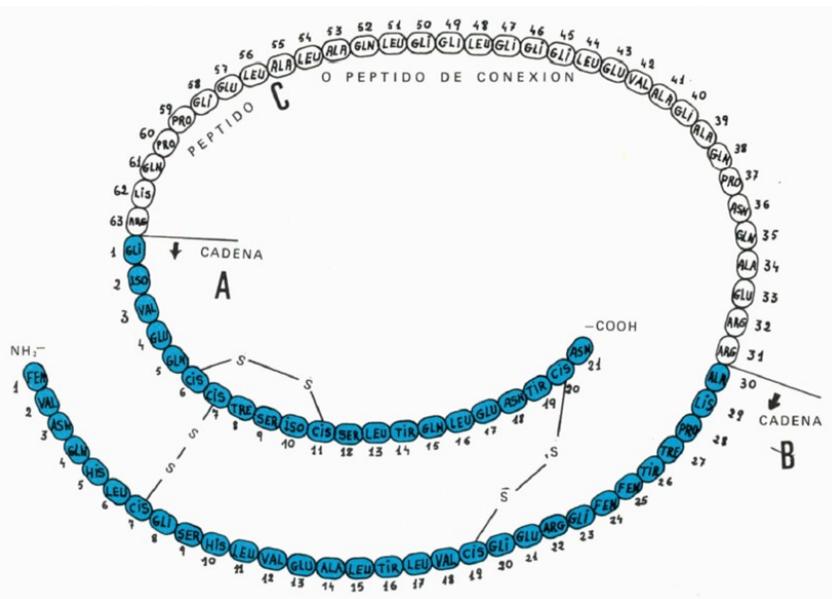


Figura 5. Estructura de la insulina

B.3.2. La secreción de la insulina

La insulina es secretada por las células β en los islotes pancreáticos en respuesta a niveles elevados de glucosa en sangre (mayores a 7mM). Hace más de 30 años Grodsky, demostró que la secreción de insulina en respuesta a glucosa exhibe un patrón característico bifásico (Curry DL et al.1968). Después del estímulo de glucosa hay un primer pico de insulina seguida de una disminución en la secreción y consiste en una rápida y pasajera primera fase seguida de una segunda fase prolongada en la cual se continua la secreción de insulina a una baja tasa pero en mayor cantidad con respecto al basal pre-estimuladorio (Fig.6).

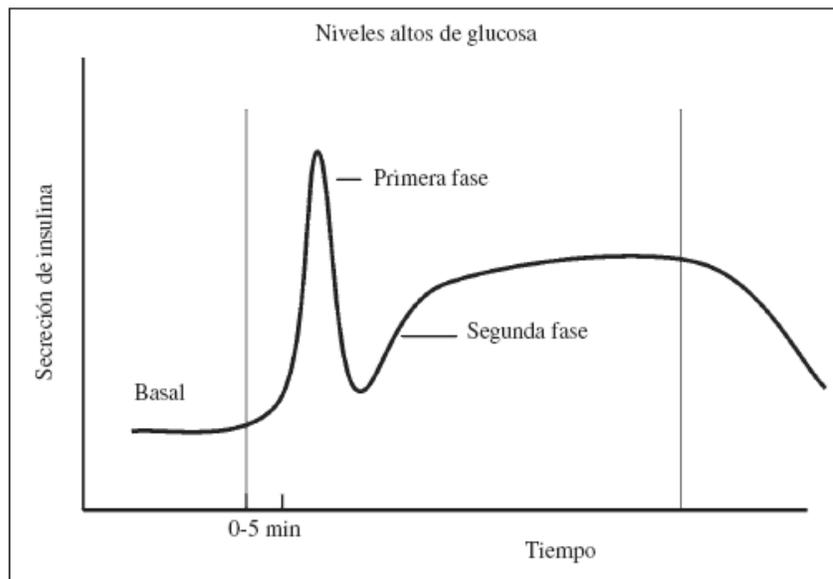


Figura 6. La secreción bifásica de insulina. La secreción endógena de la insulina consta de una primera fase con un pico de insulina aproximadamente de los 4 a 5 minutos del estímulo secretor, y de una segunda fase que alcanza niveles plásmaticos inferiores pero mantenidos en el tiempo. http://scielo.isciii.es/img/revistas/nh/v23n2/9_f1.gif

La ruta más importante de liberación de insulina al intersticio de los islotes es la exocitosis de gránulos secretorios regulada o mediada por Ca^{2+} (Orei. L et al. Agosto 1973, Wholheim et al. 1981, Orei. L et, al Enero 1973). Estudios han demostrado que una célula beta contiene más de 10,000 gránulos secretorios (Dean et al. 1973, Olofsson et al. 2002). La secreción de insulina en respuesta a glucosa va acompañada de una actividad eléctrica, esta actividad consiste en oscilaciones en el potencial de membrana (Gilon P.Shephend et al 1993).

B.3.3 Primera y Segunda fase de secreción de insulina

La glucosa entra a la célula por difusión facilitada mediada por proteínas transportadoras de glucosa caracterizadas por tener dominios hidrofóbicos tipo hélice. En la célula beta, la glucosa se transporta por medio de la isoforma 2 del transportador de glucosa GLUT2 en los roedores y por la isoforma 1 en humanos (Joost et al. 2002). Al entrar la glucosa en la célula es fosforilada para formar la glucosa 6-fosfato, reacción catalizada por la glucocinasa. Este paso de transformación por esta enzima es muy importante y se considera el marcapaso en la secreción de la insulina. La glucosa 6-fosfato alimenta las vías metabólicas entrando a la glucólisis para la obtención de piruvato el cual posteriormente entra al ciclo de Krebs y a la fosforilación oxidativa para obtener energía en forma de ATP (Matschinsky et al. 1996). La generación de ATP provoca el cierre de los canales de potasio dependientes de ATP (K_{ATP}). El cierre de estos canales impide que el K^+ salga del interior de la célula y se acumule en el interior provocando una despolarización de membrana permitiendo que se abran los canales de calcio (Ca^{2+}) dependientes de voltaje y los canales de Na^+ . La entrada de sodio y calcio despolarizan aún más la membrana, ocasionando que se abran los canales de Ca^{2+} tipo L y otros canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje incrementando los niveles de calcio intracelular (Hiriart et al. 2008). El calcio lleva a la fusión de los gránulos de insulina a la membrana para la liberación de la insulina al torrente sanguíneo (Rosman & Rentrom et al. 2003). El paso limitante para la primera fase se encuentra en la cascada de transducción de señales que es la detección de los niveles de Ca^{2+} y la exocitosis de los gránulos de liberación inmediata (Starub & Sharp et al. 2002)(Fig. 7).

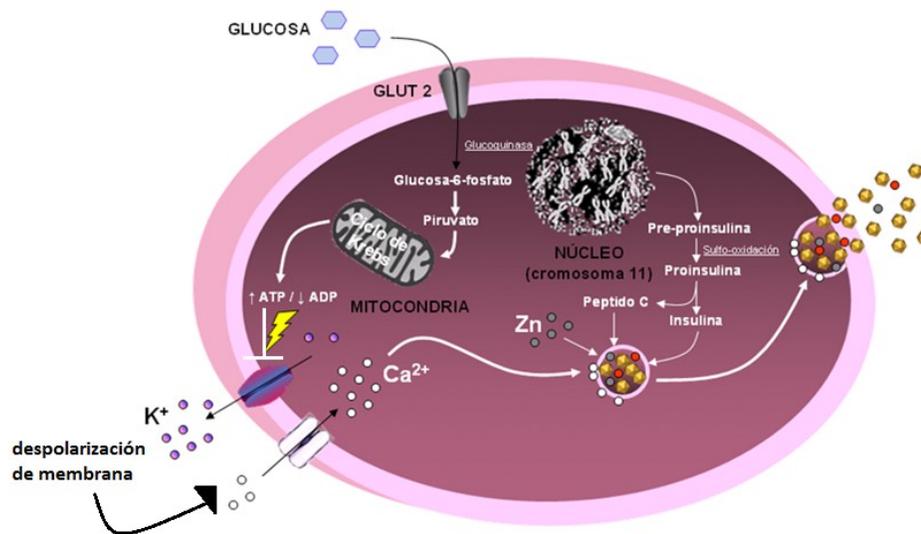


Figura 7. Mecanismos moleculares que intervienen en la secreción de insulina en la célula β . Imagen tomada y modificada de The Physiology of Glucagón-like Peptide 1. *PhysiolRev* 2007, 87: 1049-1439.

La segunda fase de la secreción de insulina fue reportada por (Curry et al. 1968) en la cual observaron que al perfundir el páncreas con glucosa, la secreción de insulina se incrementaba rápidamente a partir de los 2 minutos posteriores a la infusión de glucosa y alcanzaba su pico máximo a los 4 minutos y que una segunda fase más lenta seguía a este incremento y se sostenía durante todo el periodo de infusión de glucosa. (Curry et al.1968)(Fig. 6). Cuando el páncreas se perfundía con tolbutamida, una sustancia que bloquea los canales de potasio; solo se observaba el primer pico de liberación rápida de insulina, sugiriendo que la secreción bifásica de insulina sólo se genera en respuesta a glucosa (Curry & Grodosky et al. 1968). Fue hasta después que se encontraron los mecanismos independientes de la acción iónica (activación de los K_{ATP})(Aizawa, Henquin et al. 1992; Gembal&Henquin et al. 1992). A partir de entonces, 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 de liberación sostenida que depende de una vía de amplificación (o un mecanismo dependiente de K_{ATP}) (Henquin et al. 200; Aizawa et al. 2002).

Esta naturaleza bifásica es debido a la existencia de dos pozas de gránulos de insulina, una primera poza que se encuentra en citoplasma que corresponde al 94% de los gránulos secretorios, y una segunda poza de gránulos anclados a la membrana y se dividen en 2: gránulos listos para ser liberados (LL), y los gránulos de liberación inmediata (LI), los LL son los primeros en secretar a insulina en respuesta a un incremento de Ca^{2+} durante la primera fase, los gránulos LI pertenecen a los gránulos de reserva que se encargan de restablecer los gránulos LL, una vez que estos se han agotado , pero este mecanismo requiere de ATP y de un mayor metabolismo de glucosa (Rosman, P. y Rentrom 2003).

Además de la glucosa existen vías de señalización que al ser activadas contribuyen al mantenimiento o el aumento de la secreción de insulina en respuesta a glucosa, como las vías de CaMKII (Jruher et al. 1995; Easom et al. 1999), PKA (Saharp et al.1979; Jones et al. 1998), PKC (Jones et al. 1998; Doyle et al. 2003) y PKG(Laychock et al. 1991; Russell et al. 2010).

B.4 DESARROLLO DEL PÁNCREAS

B.4.1 Morfogénesis del páncreas

La formación del páncreas se inicia de manera temprana durante el desarrollo embrionario. En el ratón la primera indicación visual de morfogénesis pancreática se da alrededor del día embrionario 9 (e9), cuando dos rudimentos, uno dorsal primero y otro ventral después, se hacen visibles en la zona del endodermo del intestino primitivo que dará lugar al duodeno. Entre e 9.5 y el e 12.5, la mayoría de

las células formadas son positivas para glucagon. A partir del e 12.5 se produce la diferenciación exponencial de células endócrinas, en su mayoría células beta, a partir de neogénesis; Pero no es hasta poco antes de nacer (e18-e19) que los islotes están plenamente formados (Meyers et al. 2002). La maduración final del islote se produce durante las primeras semanas después del nacimiento.

El páncreas exócrino empieza a diferenciarse hacia el día e14.5 y para el día e15.5 los acinos ya son claramente distinguibles de los ductos (Meyers et al. 2002). Hacia el día 10.5 se inicia el crecimiento y ramificación del epitelio de dos primordios pancreáticos, los cuales entre el día embrionario 13.5 sufren una reorientación y se fusionan para producir un solo órgano dividido en 3 secciones: cabeza parte más próxima al duodeno y originada del primordio ventral; cuerpo parte media cercana al estómago y la cola porción cercana al bazo, ambas secciones derivadas del primordio dorsal (Meyers et al. 2002). En humanos, los primordios pancreáticos son evidentes en la semana 4 de gestación y su fusión se produce la final de la semana 6. Las células endócrinas están presentes ya en la semana 10. Cabe destacar que existen pocos estudios moleculares sobre la organogénesis del páncreas en humanos y los modelos vigentes se basan mayoritariamente en información obtenida de ratón y pollo (Meyers et al. 2002).

B.4.2 Células madre embrionarias como precursoras del páncreas e islotes pancreáticos

El origen de las células productoras de insulina es a partir de células madre embrionarias (ES) o células madre, las cuales a su vez son derivadas de la masa celular interna del blastocisto, tales ES son un grupo de células indiferenciadas localizadas en el epiblasto. El epiblasto da origen a las tres capas embrionarias a través de un proceso llamado gastrulación cuyo destino final es la diferenciación en tejidos (Thomson et al. 1998)(Wells & Melton et.al 1999). La iniciación de la gastrulación es reconocida por la formación de la línea primitiva en la parte posterior del epiblasto. Después dentro de la línea primitiva, las células del mesendodermo regulan la expresión de muchos genes para la diferenciación del endodermo definitivo y progenitores del mesodermo. El endodermo tiene dos principales poblaciones una denominada endodermo visceral y otra denominada endodermo definitivo. El endodermo visceral es derivado de las células del revestimiento de la línea primitiva la cual es desplazada para integrar el saco extraembrionario vitelino relacionado a tejido (Thomson et al. 1998; Yasunaga et al. 2005). El saco vitelino puede expresar tempranamente α -fetoproteína (AFP), albúmina, insulina-II, y una baja tasa de insulina-I, pero le falta la expresión de Neurogenina-3 (Ngn3), Islet-1 (Isl-1), Neuro D β /2 y glucagon (Giddings. S.J et al. 1994; Ku, H. ; Zhang, et. al 2004). Insulina-I, Neurogenina-3 (Ngn3), Islet-1 (Isl-1) y Neuro D β /2 son expresadas en células endócrinas y neuronas, pero Neurogenina

3 y glucagón son exclusivas del desarrollo endócrino del páncreas (Edlund et al. 2001). Las células del endodermo originan el tracto gastrointestinal, incluyendo el páncreas y el hígado (Yasunaga et al. 2005). Una vez que las células del endodermo están comprometidas se alinean a lo largo del eje vertical del tubo intestinal, el cual es también dividido en intestino proximal, intestino medio e intestino caudal o distal. El páncreas primitivo dorsal es derivado del endodermo dorsal del intestino proximal e intestino medio, junto con la parte dorsal del esófago, estómago y duodeno (Thomson et al. 1998; Yasunaga et al. 2005) (Fig. 8).

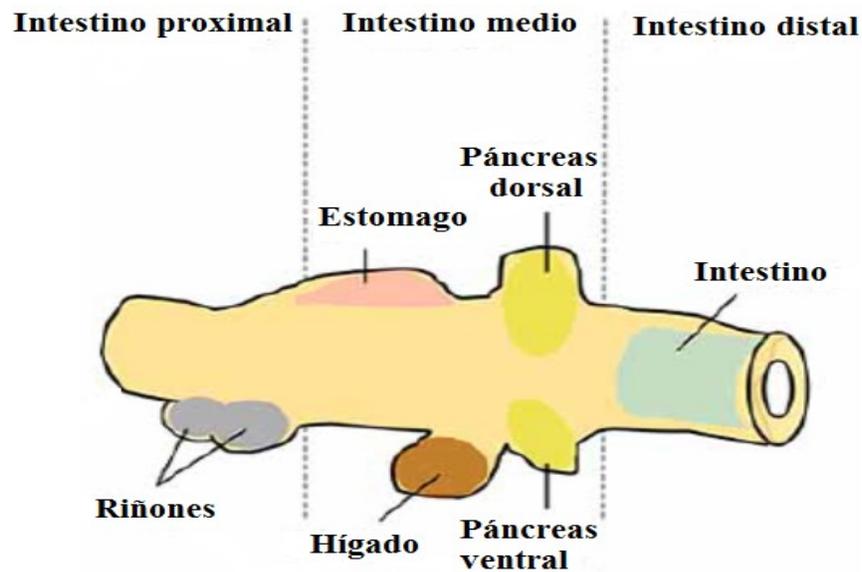


Figura 8. Representación esquemática de cómo el endodermo da origen a los diferentes órganos.

B.4.3 Señalización y desarrollo pancreático

La notocorda envía señales que reprimen la expresión de Sonic Hedgehog (shh) en el endodermo pancreático dorsal, lo que constituye un primer prerrequisito para la expresión de Pdx-1 en esta región y para el consiguiente desarrollo del páncreas. La activina- b, perteneciente a la familia de TGFB y el FGF2 son dos de las moléculas secretadas por la notocorda y mediadoras de dicho efecto. La especificación del páncreas ventral ocurre de manera independiente (Albert Barberá). Pdx-1 se expresa en el endodermo ventral y las señales procedentes del mesodermo cardíaco y del séptum transversum no son necesarias para inducir la expresión de este factor en la región pre-pancreática.

B.4.4 Diferenciación endócrina pancreática

El fenotipo pancreático común (Pdx-1+, hlxb9+, y shh-) será igualmente adoptado después tanto en la parte dorsal como en la ventral (Wells ,Mellton et al. 1998) (Edluns et al. 2001). La regulación del proceso de diferenciación celular involucra la expresión de muchos factores transcripcionales y señales conocidas como sistema de señalización Delta-Notch. (Edluns et al. 2001; Edluns et al. 1998; Jensen et al. 2004). Las partes exocrina y endocrina mantienen transcientemente el fenotipo pancreático común, pero después comienza la diferenciación, el progenitor exocrino expresa Ptf1a-p48 y Hes1. Hes 1 es un represor que permite que las células exocrinas progenitoras proliferen parcialmente indiferenciadas, mientras que su progenie solo expresará Ptf1a-p48 (Edluns et la. 2001; Ap Elvis et al. 1999; Jensen et al. 2004). En contraste el progenitor endocrino expresará inicialmente neurogenina 3 (Ngn-3) y posteriormente co-expresará Beta2/Neuro D Pax 4, comprometerán a la línea celular endocrina. Múltiples factores de transcripción van a definir el destino de las células endócrinas presentes en los islotes. Básicamente las células α se caracterizan por Pax 6, Nkx2.2, Irx 1 y 2 , Brn4 y Arx, las β por Pax 4, Pax 6 Nkx 2.2 , NKx 6.1, Mnx1, MafA y Pdx1, las δ por Pax y las PP por NKx 2.2 (Vanhoof, D. et al. 2009) (Fig. 9).

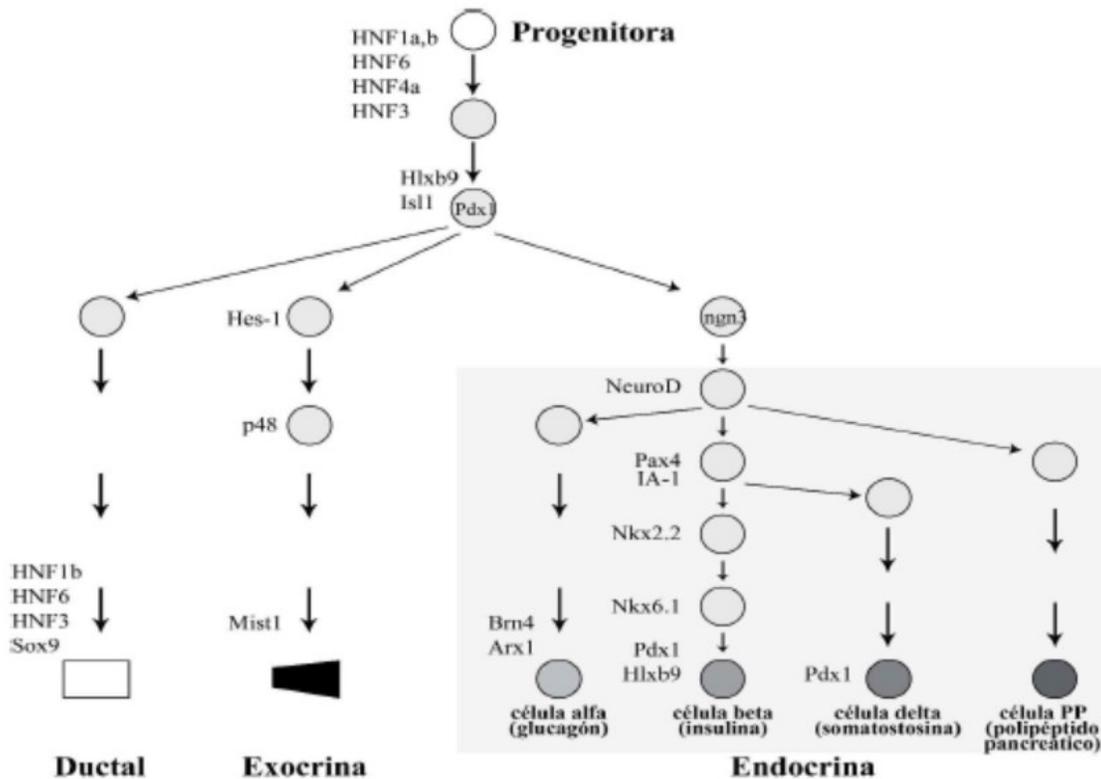


Figura 9. Factores de transcripción que participan en la diferenciación de los diferentes linajes celulares pancreáticos.

B.5. FACTORES QUE DETERMINAN LA MASA DE CELULAS BETA

La masa de células β es determinada por el número (hiperplasia) y el tamaño (hipertrofia) de las células beta pancreáticas (Akerman&Gannon et al. 2007). El número de células beta puede aumentar mediante dos mecanismos: la proliferación y neogénesis la cual se refiere a la formación de nuevas células beta a partir de células no troncales. (Meyers et al. 2002). Por otro lado, entre los mecanismos de disminución en la masa de células beta se encuentran la apoptosis y la atrofia (Van Hoof et al. 2009)(Fig.10).

La proliferación ocurre a un tasa rápida (del 10% por día) durante la etapa tardía de la embriogénesis (Bernard-Kargar&Ktorza et al. 2001), disminuyendo postnatalmente (Scaglia et.al 1997). Durante la etapa adulta la proliferación de células β es significativamente menor que la post-natal y la de la infancia y declina gradualmente con la edad (Akerman&Gannon et al. 2007). En la obesidad hay un incremento en la masa de células beta asociada a un incremento en la proliferación (Akerman&Gannon et al. 2007). El tamaño de células β es estable durante la etapa postnatal (Scaglia et al. 1997), pero esta incrementa con la edad durante la etapa adulta (Montanya et al. 2000)(Fig. 10).

Por otro lado, la apoptosis ocurre a muy bajas tasas durante la embriogénesis (Akerman&Gannon et al. 2007), la cual puede estar relacionada con la remodelación del islote y cambios en la maduración de células beta (Scaglia et.al 1997). Durante la etapa adulta también ocurre pero a una menor tasa.

Existe evidencia de replicación y neogénesis, la segunda de células ductales que rodean los islotes neonatales y exhiben una mayor actividad replicativa que las células de islotes diferenciados (Bowens et al. 1994). Estas células precursoras de islotes desaparecen después de la primera semana de vida; posterior a esta semana no existe evidencia morfológica de neogénesis a partir de estos precursores; pero si hay evidencia de que la auto replicación es el mecanismo mediante el cual hay un aumento en la masa de células beta durante este periodo (Georgia &Bushan et al. 2004).

No hay evidencia de neogénesis en páncreas adultos normales, sin embargo la neogénesis de células beta has sido reportada en modelos de daño pancreático (Akerman&Gannon et al. 2007)(Fig. 10).

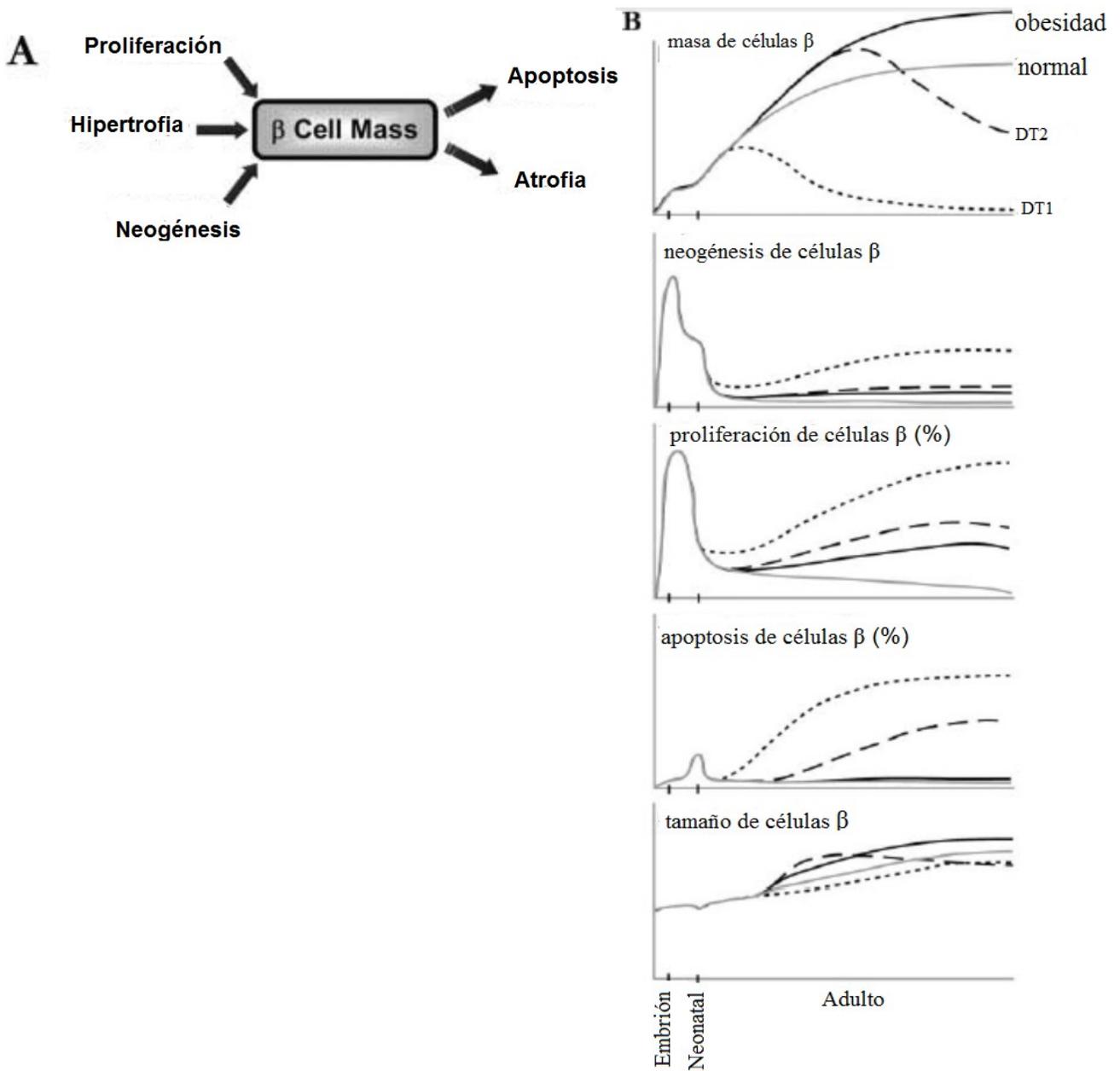


Figura 10. Dinámica de la masa de células β . (A) Proliferación, neogénesis, e hipertrofia aumentan la masa de células β , mientras que la apoptosis y la atrofia reducen la masa de células β . (B) La gráfica representa los cambios aproximados en estos procesos durante el curso de vida de un individuo normal (línea gris), en un obeso no diabético (línea negra), en diabetes tipo II (línea discontinua con puntos), y en individuos con diabetes tipo II (línea discontinua con guiones), basada en estudios en roedores y en humanos. Periodo embrionario representa el periodo antes del nacimiento, Neonatal se refiere al periodo entre el nacimiento y el destete (aproximadamente 3 semanas en roedores). Figura tomada y modificada de Ackermann, *Journal of Molecular Endocrinology* 2007.

B.6 REGENERACIÓN DEL PÁNCREAS ADULTO Y PANCREATECTOMÍA COMO MODELO EXPERIMENTAL DE REGENERACIÓN.

El páncreas, a diferencia de otros órganos tiene una capacidad regenerativa muy limitada, probablemente debido a una baja tasa de replicación o a la dificultad de activar la neogénesis. Sin embargo, en determinadas situaciones se ha podido estimular la capacidad regenerativa del páncreas (Albert Barberá Rosa Gasa).

Los modelos en donde se estudia la capacidad regenerativa del páncreas comprenden daño al páncreas mediante tóxicos o mediante una cirugía. Para los modelos de daño con cirugía, se puede utilizar una pancreatectomía parcial (60-70 %), o subtotal de un 90% a un 95%, o bien una ligación del ducto. En este último caso se produce una destrucción e inflamación de una parte del páncreas debido a la liberación de los productos de secreción exocrinos (Bowens et al. 2005)

La pancreatectomía es la remoción de una parte del páncreas mediante una cirugía. Hay muchos tipos de pancreatectomía: pancreatectomía distal o parcial, pancreatectomía segmental y pancreatectomía total.

En una pancreatectomía parcial no se restaura por completo el volumen pancreático original, siendo la respuesta regenerativa proporcional a la cantidad de páncreas removido. En la hemipancreatectomía, el 50% del páncreas restante crecerá solo un 20%. En el caso de dejar una tercera parte del volumen inicial después de una pancreatectomía de dos terceras partes, el páncreas crecerá solo 30%. Cuando solo una décima parte del volumen inicial se deja después de una pancreatectomía subtotal, el volumen residual pancreático crece un 80 % (Pearson et al. 1977). Lo mismo ocurre para la parte endócrina del páncreas; Dor et al. 2004 usando células transgénicas marcadas mostró que después de una pancreatectomía de dos terceras partes no hay evidencia de la formación de nuevas células beta por diferenciación de progenitores negativos a insulina o de stem cells. Estas conclusiones parecen contraponerse con las observaciones de aquellos que reportan neogénesis de células beta de ductos proliferantes después de una pancreatectomía subtotal (Bonner et al. 1993). Estas discrepancias pueden ser explicadas por la diferencia en la cantidad de tejido dañado y la capacidad de la estimulación del crecimiento entre los dos modelos que fueron usados, por ejemplo, entre la pancreatectomía del 70 y el 90%. Otra diferencia importante es que una condición de hiperglucemia es inducida por una pancreatectomía del 90% pero no por una del 70 %. Entonces es posible que en el último caso la replicación de células beta este activado, mientras que en el caso de la pancreatectomía del 90 %, un crecimiento de células beta es mayormente activado por neogénesis además de por replicación. En otros estudios de ratas sometidas a una pancreatectomía del 90%, el doble de la masa de células restante fue obtenida a una semana post cirugía (Plachot et al. 2001), mientras que solo del 30-40 % del páncreas incremento al término de la cuarta semana posterior a una pancreatectomía del 60 % (Leahy et al. 1988).

B.7. DIABETES

La diabetes es un grupo de enfermedades caracterizadas por una hiperglucemia crónica resultado de defectos en la secreción o acción de la insulina o ambos. (American Diabetes Association 2010).

B.7.1 Epidemiología

En el 2013, la IDF (por sus siglas en inglés International Diabetes Federation) estimó que a nivel mundial existen 382 millones de personas diagnosticadas con diabetes, equivalente al 8.3% de la población adulta y que para el 2035 esta cifra aumentará a 593 millones. Más del 80% de las muertes por diabetes se registran en países de ingresos bajos y medios. Casi la mitad de esas muertes corresponden a personas de menos de 70 años, y un 55% a mujeres. La OMS prevé que las muertes por diabetes se multipliquen por dos entre 2005 y 2030 (OMS 2012). La diabetes se encuentra entre las primeras causas de muerte en México (Federación Mexicana de diabetes), México ocupa el 6to. lugar mundial en número de personas con diabetes.

Existen varios tipos de diabetes, siendo su etiología la principal característica para su clasificación. Los tres tipos de diabetes más comunes son: la tipo I, II y la gestacional. Cabe mencionar que existen otros tipos de diabetes, causadas ya sea por: defectos genéticos en las células- β (conocidas como diabetes tipo MODY), defectos genéticos en la acción de la insulina, enfermedades del páncreas exócrino, endocrinopatías, químicos y medicamentos así como por infecciones. Sin embargo, de todos los tipos de diabetes, la tipo 1 y 2 son las más frecuentes.

La diabetes tipo II representa el 90% de los casos mundiales y se debe en gran medida a un peso corporal excesivo y a la inactividad física. Hasta hace poco, la diabetes tipo II sólo se observaba en adultos, pero en la actualidad también se está manifestando en niños (OMS).

B.7.2 Diabetes tipo I

La diabetes tipo I (también denominada *diabetes insulino dependiente* o *diabetes juvenil*) afecta al sistema inmunológico. Puede ocurrir a cualquier edad pero se produce con más frecuencia en niños y adolescentes.

La diabetes tipo I se caracteriza por la destrucción paulatina de las células beta pancreáticas que producen la insulina, que son destruidas por un proceso inmunológico. La frecuencia es del 10% de todos los casos de diabetes.

En el 90% de los pacientes se detectan anticuerpos anti-islotos (ICA), anti-descarboxilas del ácido glutámico (anti GAD), anti-insulina (IAA) y transmembrana tirosin-fosfatasa (IA-2).

B.7.3 Diabetes tipo-II

La diabetes tipo-II representa aproximadamente el 85-90% de los casos totales de diabetes en el mundo. Se caracteriza por una disminución en la acción de la insulina y/o una secreción anormal de la insulina. El padecimiento generalmente aparece en edades posteriores a los 40 años, por lo que también se conoce como Diabetes de la Edad Adulta. Si bien el factor genético participa en el desarrollo de la diabetes tipo-II, la forma de vida es determinante en la aparición de la enfermedad. La ingesta excesiva de alimentos con alto índice de calorías y la disminución de la actividad física, predispone al desarrollo de ésta. Los islotes de personas con diabetes tipo II presentan como característica una deposición amiloidea, y una disminución en células beta funcionales (Hiden et al. 2007) Al igual que en la diabetes tipo I, se calcula que alrededor del 50 % de la masa total de células beta está disminuida al momento del diagnóstico de la diabetes tipo2 (Leahy et al. 2006).La diabetes tipo II representa el 90% de los casos totales de diabetes.

B.8. VENTANA CRÍTICA

Se define como ventana crítica al periodo durante el desarrollo normal de un órgano, en el cual la exposición a ciertos factores ambientales puede programar su función en etapas posteriores de la vida (Lucas et al. 1998).

El periodo embrionario, la lactancia y el destete son periodos que constituyen una ventana crítica en el desarrollo de los islotes pancreáticos. Estos cambios son los que determinan la completa maduración de los islotes, su correcta función y una adecuada morfología.

El destete representa un gran reto metabólico ya que el organismo se ve sometido a un cambio nutricional brusco, en el que se pasa de una dieta rica en lípidos que caracteriza a la leche materna, a una dieta omnívora rica en carbohidratos principalmente. En los roedores el destete se presenta al día 21 después del nacimiento, y prosigue esta ventana crítica postnatal para el órgano, que como ya se ha dicho, es un periodo en el cual ocurren importantes cambios estructurales y funcionales, en el cual factores ambientales como la nutrición, influyen mucho y pueden originar consecuencias adversas en etapas posteriores (Lucas, A et al. 1995).

Se ha reportado que del día 21 al 28 postnatal en ratas, las células beta neonatales presentan una baja sensibilidad a la glucosa y una secreción de insulina escasa y unimodal comparada con células beta adultas, lo cual refleja una inmadurez funcional. En cuanto a las células alfa se ha reportado que, en la ya mencionada ventana crítica, hay un importante decremento en células positivas a glucagon localizadas en la cabeza del páncreas, mientras que se presenta un incremento en la zona del cuerpo y la cola. Este efecto se da paralelamente a un decremento en las concentraciones de glucagon en suero (Aguayo, C. et al. 2006).

B.9. LA BIOTINA

La biotina (vitamina B7 o H) es una vitamina hidrosoluble esencial para la vida de todos los organismos, la pueden sintetizar las plantas, la mayoría de las bacterias y algunos hongos (Alban et al. 2000). Químicamente es un compuesto heterocíclico, con un anillo de imidazolidona enlazado a un anillo de tetrahidrotiofeno y unido con una cadena lateral de ácido valérico (Fig. 11). La biotina actúa como grupo prostético de las carboxilasas, enzimas que participan en la transferencia de CO_2 durante las reacciones de carboxilación, descarboxilación, transcarboxilación, las cuales son esenciales en el metabolismo. Los animales no pueden sintetizar biotina, por lo que es necesario consumirla en la dieta diaria, y la podemos encontrar en los alimentos (Dakshinamurti et al. 1994). La biotina se encuentra unida a péptidos y debe ser hidrolizada para su absorción, rompiendo el enlace semipeptídico por la acción de la biotinidasa pancreática. (Hymes y Wolf et al. 1996).

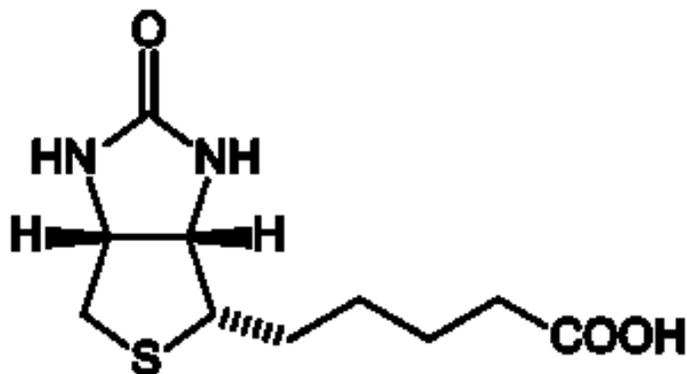


Figura 11. Fórmula química de la Biotina

B.9.1 La función de la biotina a concentraciones farmacológicas

De manera independiente de su acción como grupo prostético de las carboxilasas, la biotina a concentraciones farmacológicas modifica funciones biológicas como la proliferación celular, el desarrollo embrionario, funciones inmunológicas y el metabolismo de carbohidratos y lípidos (Zempleni 2005; Vilches y Fernández et al. 2005). En modelos animales (ratón y rata) se ha visto el efecto a concentraciones farmacológicas desde 2mg/kg de peso hasta 14 mg/Kg de peso (Zempleni 2005; Vilches y Fernández et al. 2005) y en personas desde 5 mg hasta 15mg/diarios (Zempleni 2005; Vilches y Fernández et al. 2005)

Hasta ahora se han propuesto dos mecanismos para explicar el efecto de la biotina sobre la expresión genética. El primero es a través de la vía de señalización guanilato ciclasa soluble /proteína cinasa G (GC_s /PKG). Y el segundo es la biotinilación de histonas (Rodríguez et al. 2003; Zempleni, 2005) estos dos mecanismos podrían coexistir ya que no son mutuamente excluyentes.

Algunos estudios han cuestionado el papel de la biotinilación de histonas como mediador de los efectos de la biotina en la modulación de la expresión genética. (Bailey et al. 2008; Healy et al. 2009)

En un estudio de microarreglos en personas adultas sanas, se encontró que la administración de 2.15 mg/día de biotina durante 21 días modificó positivamente la expresión de 139 genes, mientras que disminuyó la de 131 genes en células mononucleadas de sangre periférica (Widemann et al., 2004).

B.9.2 Efectos de la biotina sobre el metabolismo de la glucosa

El primer estudio que documenta dicho efecto, fue realizado en la década de los 60's por Dakshinamurti quienes al administrar una dosis de 1mg/kg de peso, encontraron un incremento en la actividad de la glucocinasa hepática; observándose tanto en condiciones post-prandiales, situación metabólica en la que la glucocinasa se encuentra normalmente aumentada, como en condiciones metabólicas en donde la actividad de la enzima hepática se encuentra disminuida como es el ayuno o la dieta rica en grasas. Con el desarrollo de la biología molecular en 1991 Chauhan *et al*, reportaron que el efecto de la biotina sobre la glucocinasa se debe a un aumento en la transcripción de su gen.

La biotina estimula la expresión de insulina y glucocinasa pancreática, una enzima que juega un papel importante en la homeostasis de la glucosa regulando la secreción de insulina en respuesta a cambios en las concentraciones de la glucosa en plasma.

Otra proteína esencial involucrada en el metabolismo intermediario, es el receptor de insulina, y se ha demostrado que es modificado por la biotina. Estudios por

Dela Vega L et al. 2000 encontraron que la biotina incrementa la expresión del receptor de insulina a nivel post-transcrpcional, y que este efecto requiere la activación de la cascada de señalización de GMPc.

Los hallazgos anteriormente descritos indican que, la biotina tiene efectos estimulatorios en la expresión de genes de acción hipoglicémica (insulina, receptor de insulina, glucocinasa hepática y pancreática), y disminuye la expresión de la fosfoenol piruvato carboxilasa (Dakshinamurti K, Li W et al. 1994), una enzima gluconeogénica que estimula la producción de glucosa por el hígado.

B.9.3 Efectos de la biotina en los islotes pancreáticos

Estudios han encontrado que la biotina a concentraciones de 10 a 1000 nM aumenta la actividad de la glucocinasa y la abundancia de RNAm en cultivos de islotes pancreáticos de ratas no deficientes de biotina (Romero-Navarro et al. 1999); además de que incrementa la expresión y la secreción de insulina. Por otro lado en islotes de ratas deficientes de biotina se encontró que la actividad de la glucocinasa así como los niveles del RNAm disminuyen a la mitad comparado con las ratas controles (Romero-Navarro et al. 1999). También se observó una disminución en la secreción de insulina en islotes de ratas deficientes de biotina (Romero-Navarro et al. 1999).

B.9.4 Efectos de la suplementación con Biotina en Diabetes

De acuerdo con los efectos farmacológicos de la biotina sobre la expresión de genes del metabolismo de carbohidratos, diversos estudios han encontrado que la administración de dosis farmacológicas de biotina disminuye la hiperglucemia tanto en pacientes (Cogeshal 1985; Maebashi 1993; Koutsikos et al.1996) como en modelos animales diabéticos (Zhang 1997; Redi 1998; Zhang et al.1996).

Estudios clínicos han encontrado que pacientes con diabetes tipo 1 tratados durante una semana con biotina sin recibir insulina exógena disminuyeron sus concentraciones de glucosa en ayuno (Coggeshal, J. et al. 1985). En otro estudio con pacientes diabéticos tipo 2 se encontró que la administración oral de 9 mg de biotina diarios durante un mes disminuyó las concentraciones séricas de glucosa en ayuno, así como de piruvato y lactato (Maebashi, M. et al. 1993) .

La suplementación con biotina también disminuye la hiperglucemia en modelos animales de diabetes. En ratones de la cepa KK no obesos, un modelo animal de diabetes tipo 2 moderada, caracterizado por resistencia a la insulina, el tratamiento con 2 y 4 mg/kg de peso de biotina durante 10 semanas disminuyó la glucemia post-prandial, mejorando la tolerancia a la glucosa. Además la dosis de 4 mg/Kg se observó una disminución de la insulina plasmática. Estos estudios también encontraron que el tratamiento con biotina aumenta la sensibilidad a la insulina. (Redi et al. 1988). Otro estudio encontró que la tolerancia a la glucosa de las ratas

con diabetes inducida con estreptozotocina mejora parcialmente con el tratamiento durante 15 días con biotina (100µg/día) (Zhang et al. 1997).

C. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El post-destete es un periodo crítico de maduración para el páncreas, en el cual se adquieren las cualidades encaminadas a alcanzar la capacidad funcional del islote que permita poseer un control glucémico efectivo en etapas posteriores de la vida. En estudios del laboratorio en el cual realicé la presente tesis de licenciatura, se encontró que la administración de biotina durante ocho semanas posteriores al destete tiene efectos en la estructura y función del islote pancreático, aumentando la secreción de insulina y la expresión de genes que participan en la secreción de esta hormona, características que sugieren que la biotina es capaz de producir islotes robustos morfológica y funcionalmente. Dado que se ha documentado que una maduración correcta del páncreas favorece su función y lo hace menos susceptibles ante daños o retos metabólicos, en este trabajo se propone investigar, si la suplementación con biotina dada en un periodo de ventana crítica, como lo es el post-estete, es capaz de proteger al islote pancreático ante daño producido por pancreatectomía.

D. HIPOTESIS

La ventana crítica es un periodo en el ocurren cambios funcionales importantes en la estructura y funcionamiento del islote, la suplementación con biotina en un periodo posterior al destete permitirá proteger ante un daño al islote en la etapa adulta.

E. OBJETIVOS

E.1. Objetivo general

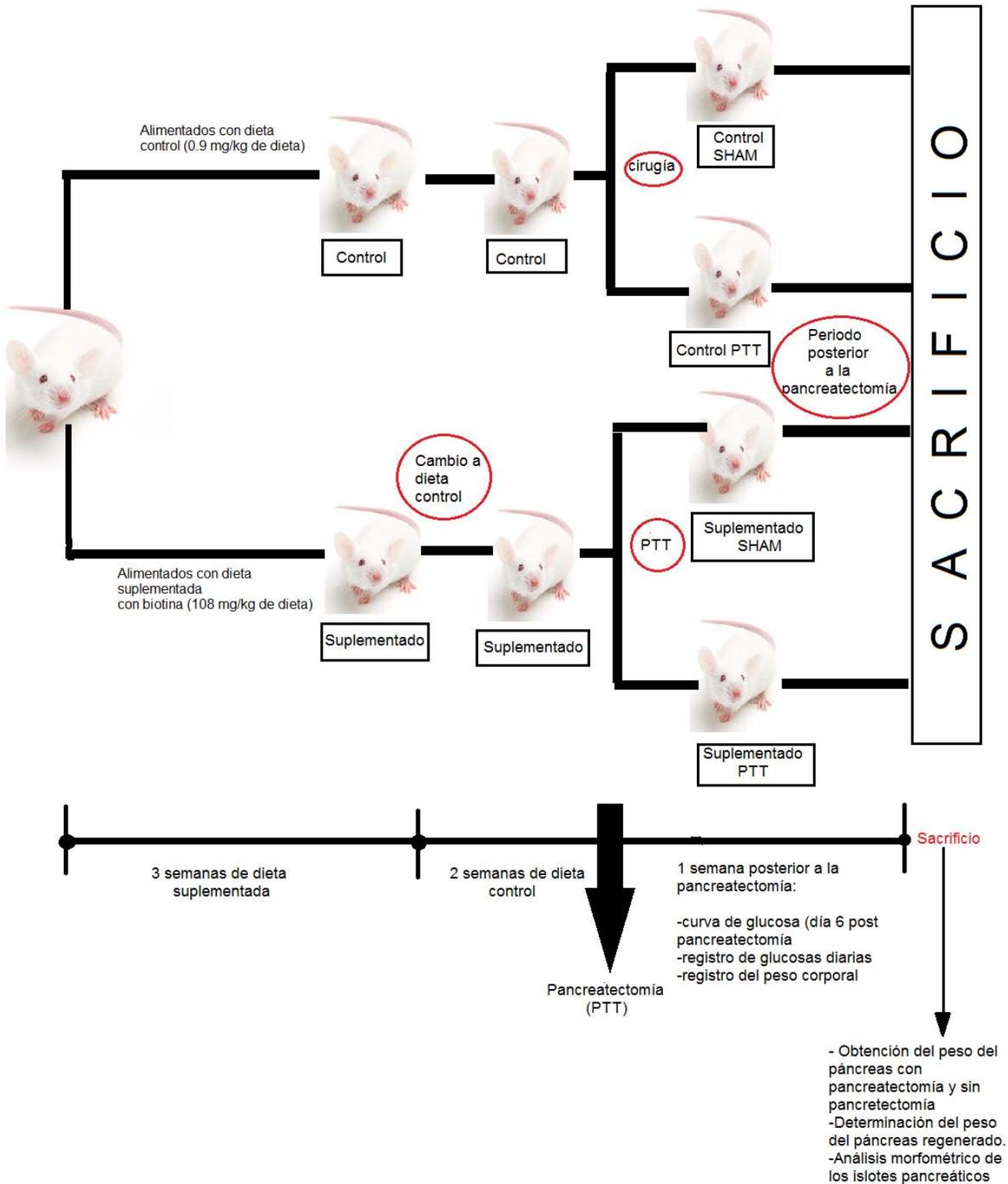
Determinar si los cambios producidos por la biotina durante etapas tempranas de la vida hacen más resistente al islote pancreático ante un daño.

E.2. Objetivos particulares.

Analizar cuál es el efecto de la suplementación de biotina en etapas tempranas de la vida ante el daño pancreático inducido por pancreatectomía sobre:

- El peso del páncreas
- Las concentraciones sanguíneas de glucosa y la tolerancia a la glucosa
- La morfología de los islotes pancreáticos

F. DISEÑO EXPERIMENTAL



G. MATERIAL Y MÉTODOS

G.1. Animales de experimentación

Se utilizaron ratones hembras de la cepa Balb/cAnN Hsd, comprados en la compañía Harlan, que fueron destetados a las tres semanas de edad y se mantuvieron en condiciones de bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, bajo ciclos de luz-obscuridad de 12 h. Los ratones durante todas las etapas fueron manejados de acuerdo con los procedimientos establecidos por el Comité de Ética para la Experimentación del Instituto de Investigaciones Biomédicas. La mitad de ratones recibió una dieta control que contenía 0.9 mg de biotina/ kg de alimento y la otra mitad de ratones una dieta suplementada que contiene 108 mg de biotina/ kg de alimento durante 3 semanas. Posterior a estas 3 semanas se suspendió la dieta suplementada y todos los ratones fueron alimentados únicamente con dieta control durante 2 semanas. Posterior a las dos semanas se realizó una cirugía, y se formaron 4 grupos: un grupo (control SHAM) en el cual se alimentó únicamente de dieta control y simplemente se le realizó una incisión sin extraer páncreas; el grupo (suplementado SHAM) el cual se alimentó durante tres semanas con dieta suplementada y únicamente se le realizó una incisión; un grupo denominado control pancreatectomía (control PTT) el cual se alimentó únicamente con dieta control y se le realizó una pancreatectomía parcial; y el grupo suplementado pancreatectomía (suplementado PTT) el cual recibió una dieta suplementada durante tres semanas y se le realizó una pancreatectomía parcial. Posterior a la cirugía se continuó suministrando dieta control durante una semana hasta el día del sacrificio (día 7 post cirugía).

G.2. Procedimiento quirúrgico.

Se realizó una pancreatectomía del 80 % del páncreas. El páncreas fue removido con la técnica de Bonner Weir et al. (1983), con algunas modificaciones, manteniendo intacta la parte que está unida al duodeno. Los ratones fueron anestesiados con sevoflurano (sevoflurano Abbott Laboratories, México) inhalado para el procedimiento quirúrgico; se les practicó una laparotomía y se expuso el páncreas, un porcentaje aproximado del 60-80 % del páncreas de la parte adjunta al bazo fue extraído delicadamente con un isopo estéril. Posterior a la extracción se suturaron los ratones, se les aplicó un antiséptico y se les inyectó intraperitonealmente, por 4 días posteriores a la cirugía, una dosis de 4 µL de solución de antibiótico (Baytril vet 5% Bayer, México)

G.3. Determinación de glucosa en sangre

Antes de realizar la cirugía se midió la glucosa en sangre a todos los grupos y se tomó como glucosa en sangre al día cero, también se tomaron las concentraciones de glucosa diarias en sangre durante 5 días posteriores a la cirugía, las muestras de sangre se tomaron de la vena de la cola y fueron medidas mediante el uso de un glucómetro y el uso de tiras reactivas (dispositivo y tiras obtenidos de Medisense Opium Xceed, Laboratorios Abbott México).

G.4. Curva de crecimiento

Se pesó a los ratones antes de realizarse la cirugía y se tomó como peso al día cero, posterior a este, fueron obtenidos los pesos diarios de los ratones durante 6 días, para determinar si hubo cambios en los pesos de los ratones.

G.5. Curvas de tolerancia a la glucosa

Al sexto día posterior a la pancreatectomía se les realizó una curva de tolerancia a la glucosa. Los ratones se mantuvieron en ayuno durante 16 h y se les midió la glucosa previo a la administración de una dosis de 2g /Kg de peso (glucosa inicial). Posterior a la inyección de glucosa se determinaron los valores de glucosa en sangre a los 15, 30, 60 y 120 minutos, las muestras sanguíneas se obtuvieron de la vena de la cola. La glucosa se cuantificó mediante glucómetro y tiras reactivas como se describió previamente.

G.6. Analisis histológicos de páncreas

Los animales fueron sacrificados siete días después de la cirugía. Los páncreas fueron extraídos y fijados durante 24 horas en paraformaldehído al 4% disuelto en buffer de sales durante 24 horas a 4 °C, se deshidrataron en una serie de concentraciones de alcohol (etanol al 50°,70°, 90°, 96°, y 100°, etanol al 100°/xilol y xilol puro, 1 h en cada uno) y después fueron embebidos en parafina (paraplast) a 58-60°C se colocaron dentro de moldes de plástico. Los tejidos fueron cortados en rebanadas con 5 µm de grosor usando un microtomo y montados en portaobjetos previamente tratados con poly-L-lysina (Sigma-Aldrich). Posteriormente los cortes fueron desparafinados y rehidratados en diferentes gradientes de xilol y etanol durante cuatro minutos en cada dilución y se lavaron con PBS 1X durante 5 min. Se realizó la recuperación de antígeno hirviendo las

laminillas en buffer de citratos (pH 6) de 10 a 15 min a 90°C, después se permeabilizaron con suero normal de cabra al 1% y Tritón X-100 al 0.3 % durante 40 min a temperatura ambiente y se incubaron toda la noche con los anticuerpos: anti insulina montado en cobayo (Gene Tex, EUA) a una dilución 1:150. Para la detección de glucagón los cortes se incubaron por tres horas con un anticuerpo montado en ratón (Sigma-Aldrich, EUA) a una dilución 1:4000. Posteriormente las laminillas se lavaron tres veces durante 5 min con suero normal de cabra al 1% diluido en PBS 1X, después se incubaron durante 1 h a 4° C con los anticuerpos secundarios IgG conjugado con FITC anti-cobayo (1:200) para la detección de insulina, e IgG conjugado con Cy3 anti ratón (1:800) para la detección de glucagón. Los núcleos se tiñeron con Dapi durante 5 min. Finalmente se lavaron las laminillas con PBS 1X por 5 min tres veces y se cubrieron con cubreobjetos medio de montaje fluorescente (Dako). Las imágenes de los islotes fueron tomadas utilizando un microscopio Olympus iX71 (Olympus, Japón) acoplado a una lámpara de mercurio y las fotos de los islotes fueron tomadas con una cámara Evolution VF Cooled color (Media Cybernetics, Canada), objetivo 20X. Se cuantificó el área positiva a insulina y glucagón, así como el área total de los islotes, esto se realizó en el programa Image J 1.48.

G.7. Análisis estadístico

Se utilizó el programa Stat View V.4.5 y el programa GraphPad Prism 6.01. (Abacus Concepts). Todos los datos corresponden al promedio \pm error estándar. Se realizaron las pruebas estadísticas t de Student y ANOVA de dos vías para el análisis entre dos o más grupos, respectivamente. Los valores con significancia estadística fueron aquellos cuya $P \leq 0.05$.

H. RESULTADOS

H.1. Peso del páncreas extraído.

Se determinó el peso del páncreas extraído el día de la pancreatectomía. Como puede verse en la Tabla 1 no hubo diferencias significativas en el peso del páncreas entre los dos grupos, siendo el promedio del páncreas extraído de 0.0904 ± 0.0072 g en el grupo control y 0.099 ± 0.007 en el grupo suplementado.

CONTROL PTT		SUPLEMENTADO PTT	
	peso páncreas extraído día 0 (g)		peso páncreas extraído día 0 (g)
ratón 1	0.1043	ratón 1	0.088
ratón 2	0.0704	ratón 2	0.085
ratón 5	0.0908	ratón 3	0.123
ratón 6	0.0960	ratón 4	0.098
		ratón 5	0.102
promedio	0.0904		0.0991
DE	0.0144		0.015
EE	0.0072		0.007

Tabla 1. En esta tabla puede observarse el promedio del páncreas extraído el día de la pancreatomectomía tanto para el grupo control como para el grupo suplementado, así como la desviación estándar (DE) y el error estándar (EE).

H.2. Peso corporal

Con el fin de determinar cómo enfrentaron el reto quirúrgico los animales bajo diferentes tratamientos se analizó el peso corporal a partir del día de la intervención. La figura 12 muestra una curva de crecimiento en porcentaje de los ratones alimentados *ad libitum* durante los 5 días posteriores a la cirugía. Como era de esperarse ésta produjo una disminución en el peso de los ratones en todos los grupos. El primer día después de la intervención se vio un mayor descenso en los grupos pancreatomectomizados que en los grupos SHAM. Las mediciones del curso temporal del peso corporal mostraron que los animales que recibieron la dieta suplementada con biotina en el periodo posterior al destete, tanto del grupo SHAM como el pancreatomectomizado mostraron menor descenso de peso que los animales de sus dos respectivos grupos control.

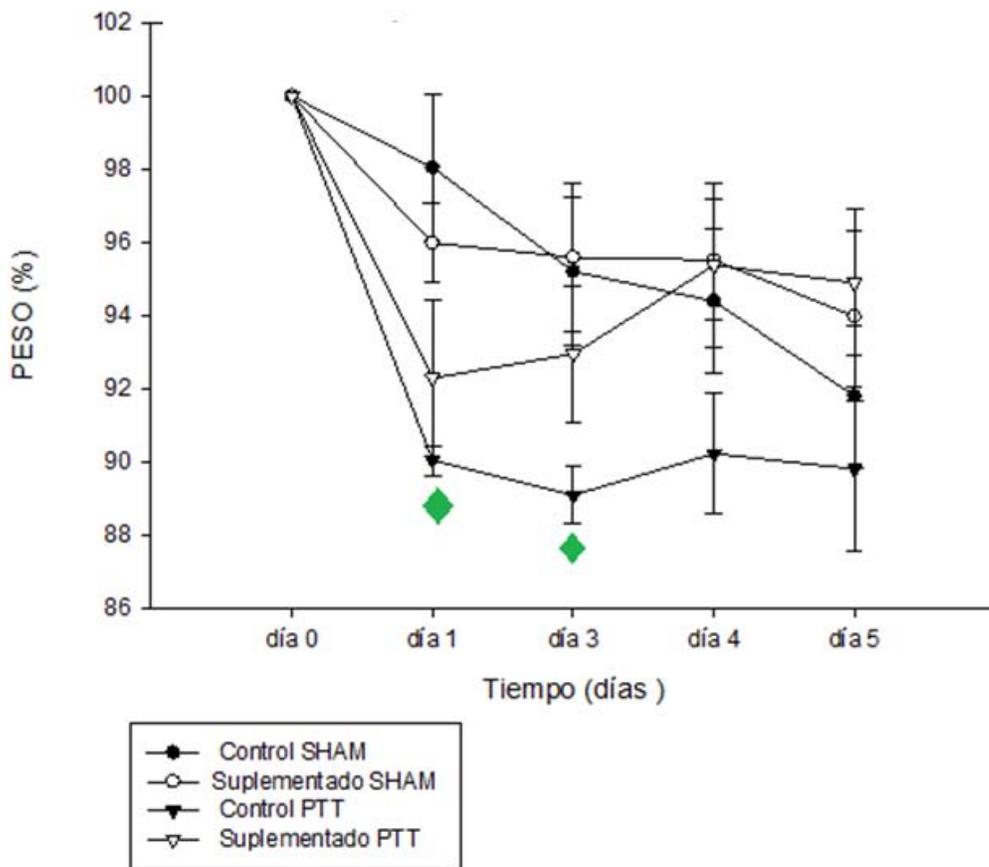


Figura 12. Curva de crecimiento en porcentaje. Se tomo como cien por ciento el peso al día 0, que corresponde al día de la cirugía. Los datos representan la media \pm EE). El símbolo en verde significa que en esos días se encontraron diferencias significativas con una $p \leq 0.05$ cuando se comparó al grupo control sham v.s el control PTT.

H.3. Concentraciones de glucosa.

Se monitorearon las concentraciones diarias de glucosa en ratones alimentados *ad libitum* durante una semana. Se vio que los ratones pancreatectomizados presentaban niveles de glucosa más altos que los grupos SHAM a excepción del día 1 post cirugía. En cuanto a la suplementación con biotina podemos ver en general que los grupos suplementados con biotina presentan valores menores cuando se compara con su respectivo grupo control, a excepción del día uno post cirugía (Fig.13).

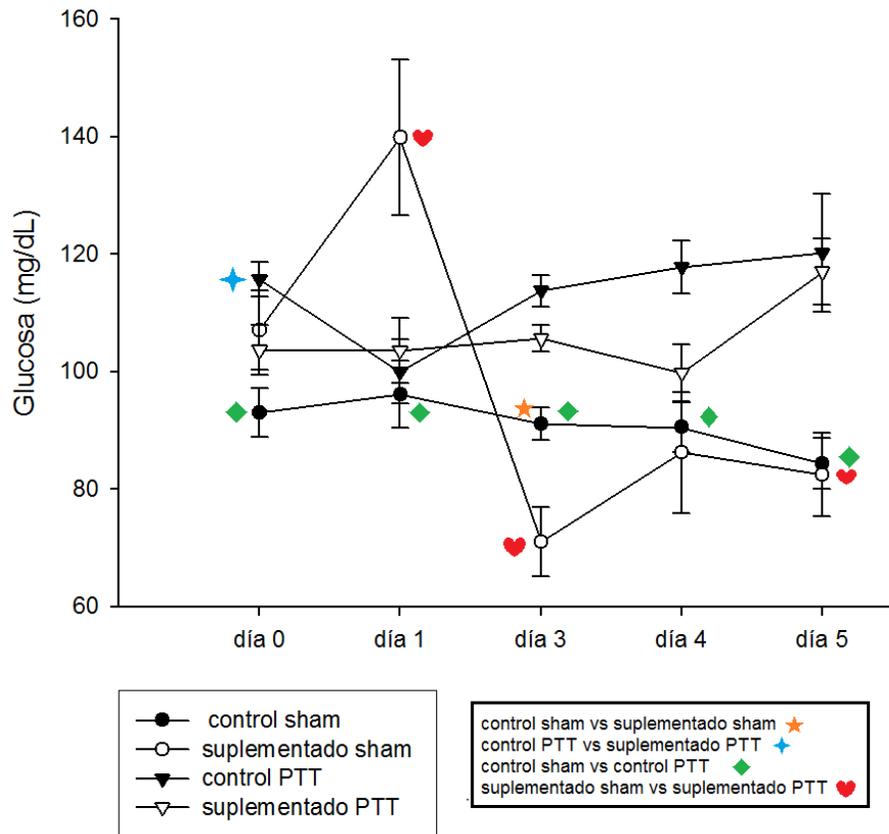


Figura 13. Glucosas diarias . Los datos representan la media \pm ES. Los símbolos en colores indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los diferentes grupos comparados (recuadro derecho), también se muestra una simbología para indicar a qué grupo pertenece cada curva (recuadro izquierdo).

En la Figura 14 se muestran las concentraciones de glucosa en ayuno a los 6 días después de la intervención quirúrgica. De acuerdo con lo esperado los ratones pancreatectomizados presentaron concentraciones de glucosa más altas que los grupos sham. En cuanto a la suplementación con biotina podemos ver que los grupos suplementados con biotina presentan niveles de glucosa menores cuando se compara con su respectivo grupo control.

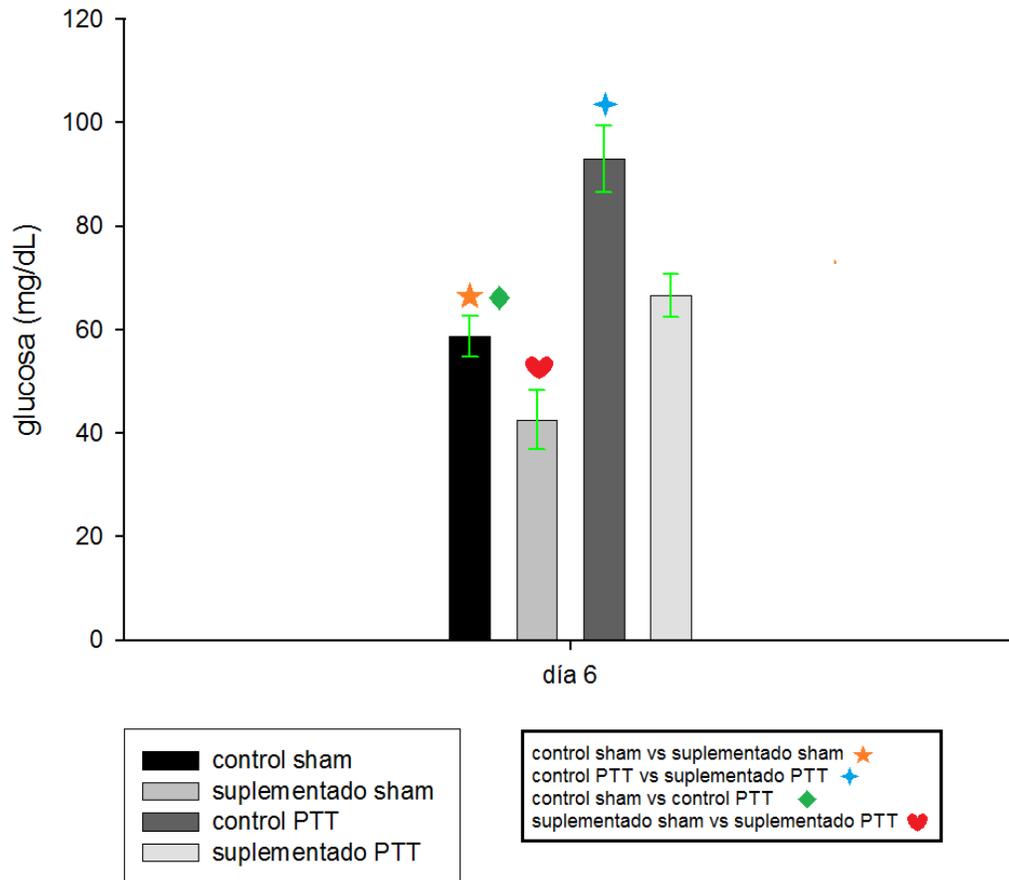


Figura 14. Concentraciones de glucosa en ayuno a los 6 días postcirugía. Los datos representan la media \pm ES. Los símbolos en colores indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los diferentes grupos comparados (recuadro derecho), también se muestra una simbología para indicar a qué grupo pertenece cada curva (recuadro izquierdo).

H.4. Curva de tolerancia a la glucosa

Al día 6 post-cirugía se realizó una curva de tolerancia a la glucosa para determinar los efectos de la biotina sobre la homeostasis de la glucosa. Como lo muestra la figura 15 los grupos que recibieron la dieta suplementada con la vitamina tanto del grupo sham como del pancreatectomizado presentan curvas de tolerancia menores que las respectivas de los grupos que recibieron la dieta control.

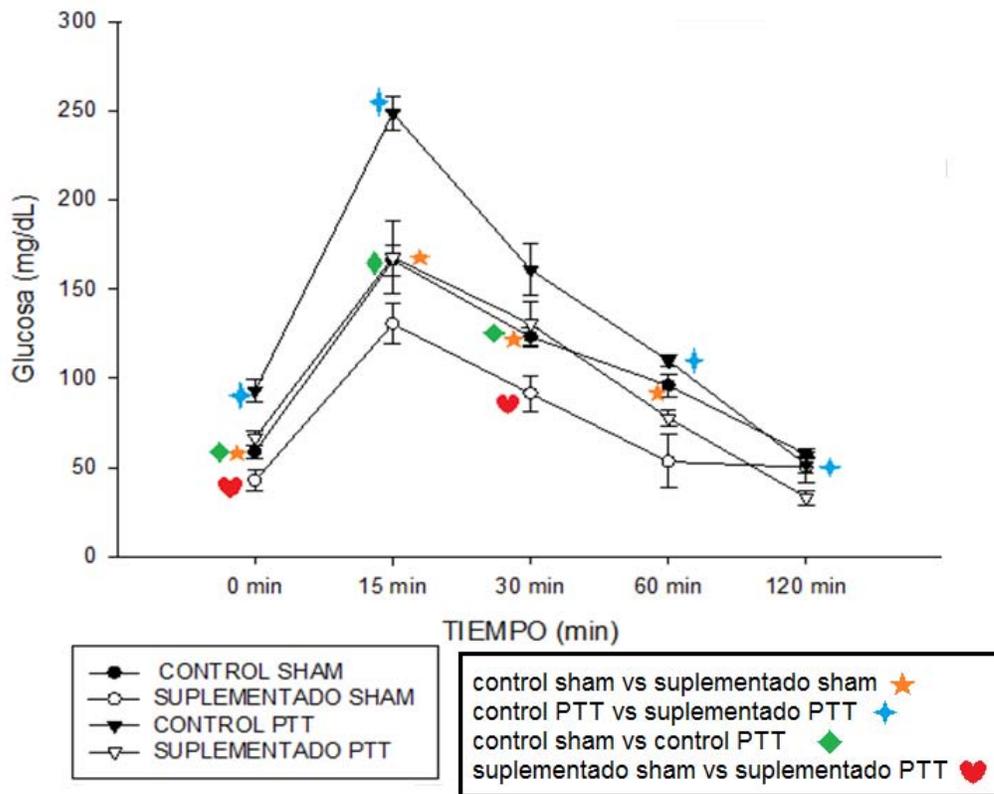


Figura 15. Curva de tolerancia a la glucosa 6 días post cirugía. Los datos mostrados aquí representan la media \pm SE, con diferencias significativas ($p \leq 0.05$) indicadas con diferentes símbolos dependiendo de los grupos comparados (recuadro lado derecho), también se muestra una simbología para indicar a qué grupo pertenece cada curva (recuadro izquierdo). El minuto cero es la glucosa basal en ayuno, es decir antes de la inyección, mientras que los demás tiempos son periodos post inyección de glucosa.

H.5. Peso del páncreas

Se evaluó el peso neto final del páncreas a una semana post cirugía. Como era de esperarse los grupos pancreatectomizados tuvieron un peso de páncreas menores que los ratones sham (Fig.16). La comparación del peso del páncreas entre los grupos que recibieron dieta control y la dieta suplementada encontraron que aquellos ratones que fueron suplementados con biotina presentan un peso del páncreas significativamente mayor con una $P < 0.05$ que los que recibieron la dieta control.

Peso absoluto del páncreas (g)	CONTROL SHAM	SUPLEMENTADO SHAM	CONTROL PTT	SUPLEMENTADO PTT
Promedio	0.106	0.156	0.043	0.096
EE	0.003	0.014	0.005	0.011

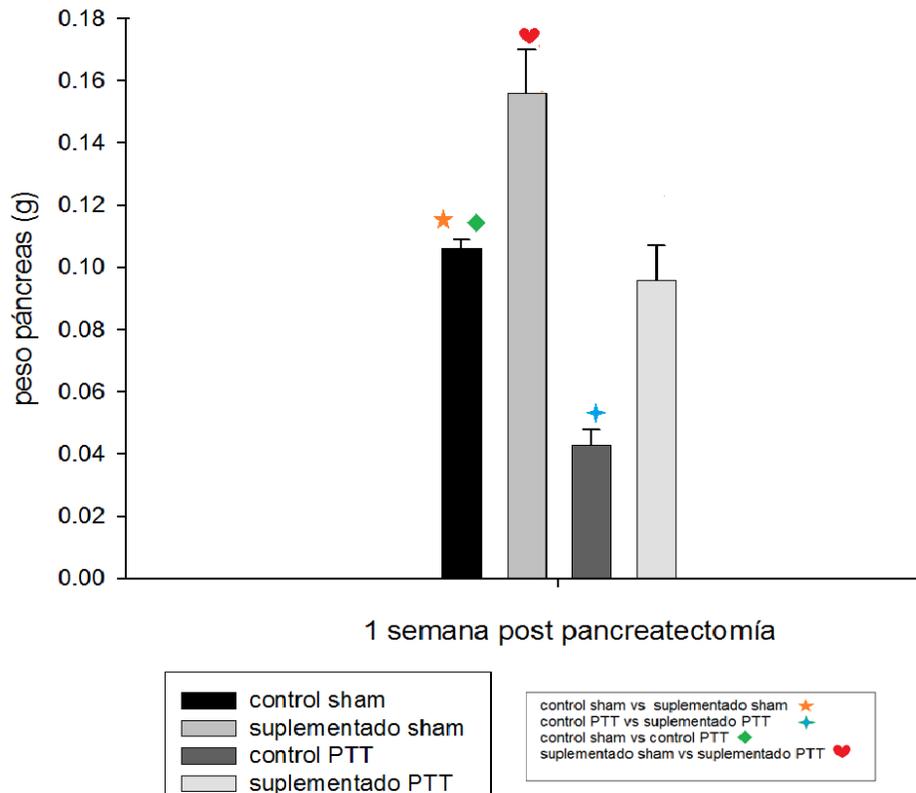


Figura 16. Peso del páncreas a una semana post pancreatectomía. Los datos representan la media \pm ES. Los símbolos en colores indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los diferentes grupos que fueron comparados (recuadro derecho), también se muestra una simbología para indicar a qué grupo pertenece cada barra en el gráfico (recuadro izquierdo).

H.6. Determinación de la regeneración del páncreas al día 7 post cirugía.

Para determinar si hubo regeneración en los grupos pancreatectomizados, se sumó la cantidad extraída al día 0 (día de la pancreatectomía) y la cantidad extraída el día final del experimento (al día 7 post pancreatectomía) y de esta manera obtuvimos el peso total del páncreas en los grupos pancreatectomizados (ver tabla 2). Se puede ver que el peso promedio del páncreas del grupo suplementado es significativamente más grande que los controles.

En la figura 17 se compara los pesos de los páncreas entre los grupos. En el grupo sham se consideró el peso total del páncreas el día del sacrificio, en tanto que en los grupos pancreatectomizados se consideró la suma de la cantidad extraída al día 0 (día de la pancreatectomía) y la cantidad extraída el día final del experimento. Comparando con el control sham el grupo control pancreatectomizado muestra un aumento significativo. Igualmente, la comparación en los grupos suplementados con la vitamina muestra un mayor tamaño en el grupo pancreatectomizado ($p < 0.05$). En todos los casos el grupo suplementado mostró mayor peso del páncreas con respecto al grupo control. Los valores de esta figura se encuentran en la (tabla 3).

CONTROL PTT			
	peso páncreas extraído DÍA 0 (g)	peso del páncreas restante (g)	Peso total aproximado del páncreas (SUMA)
ratón 1	0.1043	0.0371	0.1414
ratón 2	0.0704	0.0537	0.1241
ratón 5	0.0908	0.0491	0.1399
ratón 6	0.0960	0.0333	0.1293
promedio	0.0904	0.0433	0.1337
DE	0.0144	0.0097	0.0084
EE	0.0072	0.0048	0.0042
SUPLEMENTADO PTT			
	peso páncreas extraído día 0 (g)	peso del páncreas restante (g)	Peso total aproximado del páncreas
ratón 1	0.088	0.1237	0.2117
ratón 2	0.085	0.0672	0.1521
ratón 3	0.123	0.0822	0.2052
ratón 4	0.098	0.0840	0.1815
ratón 5	0.102	0.1216	0.2238
promedio	0.0991	0.0957	0.1949
DE	0.015	0.025	0.028
EE	0.007	0.011	0.013

Tabla 2. Se muestra el peso total de un páncreas de los grupos pancreatectomizados.

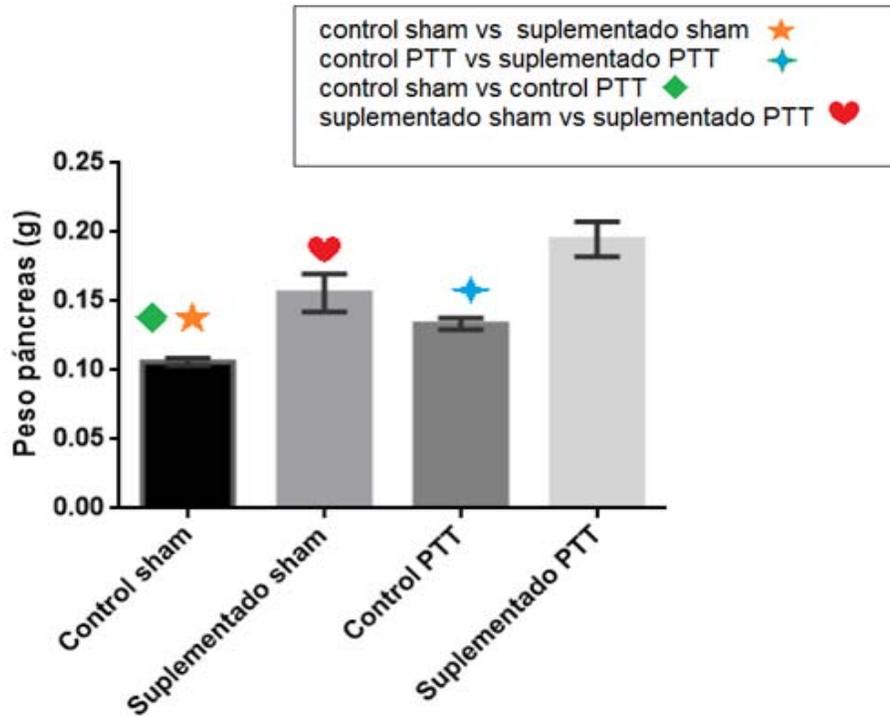


Figura 17. Peso del páncreas a 1 semana post cirugía . Los valores muestran la media \pm el error estándar del peso de un páncreas regenerado con respecto a un páncreas normal sin pancreatectomía. Los símbolos arriba de las barras muestran las diferencias significativas ($p \leq 0.005$) entre los diferentes grupos comparados.

CONTROL	
a)Promedio peso total páncreas SHAM	0.106
b)Promedio peso total aprox. del páncreas PTT	0.133
DIFERENCIA B-A (REGENERACIÓN)	0.0270
SUPLEMENTADO	
a)Promedio peso total páncreas SHAM	0.156
b)Promedio peso total aprox. Del páncreas PTT	0.194
DIFERENCIA B-A (REGENERACIÓN)	0.0380

Tabla 3. Cantidad de páncreas regenerado en los grupos pancreatectomizados

H.7. Morfología pancreática

Se realizaron estudios morfológicos del páncreas y se cuantificó el número de islotes y su tamaño; el porcentaje de células beta y el porcentaje de células alfa. Los resultados se muestran a continuación.

H.8. Número de Islotes

Se obtuvo el número promedio de islotes por corte y se observó que los grupos tratados con biotina presentaban más islotes que aquellos que había recibido la dieta control (Fig.18).

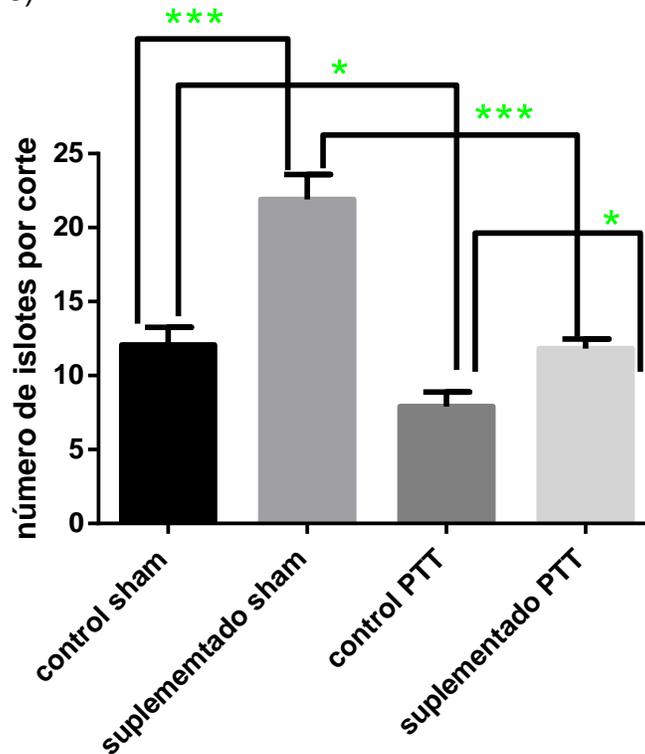


Figura 18. Número de islotes. Los datos muestran la media \pm ES. Las diferencias significativas con una $P < 0.05$ están indicadas con asteriscos verdes en la parte superior; la cantidad de asteriscos indica si hay mucha o poca diferencia significativa

H.9. Tamaño del islote

No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los grupos en cuanto al tamaño de los islotes, pero si puede observarse una tendencia a encontrar islotes más pequeños en los grupos pancreatectomizados que en los sham.(Fig.19)

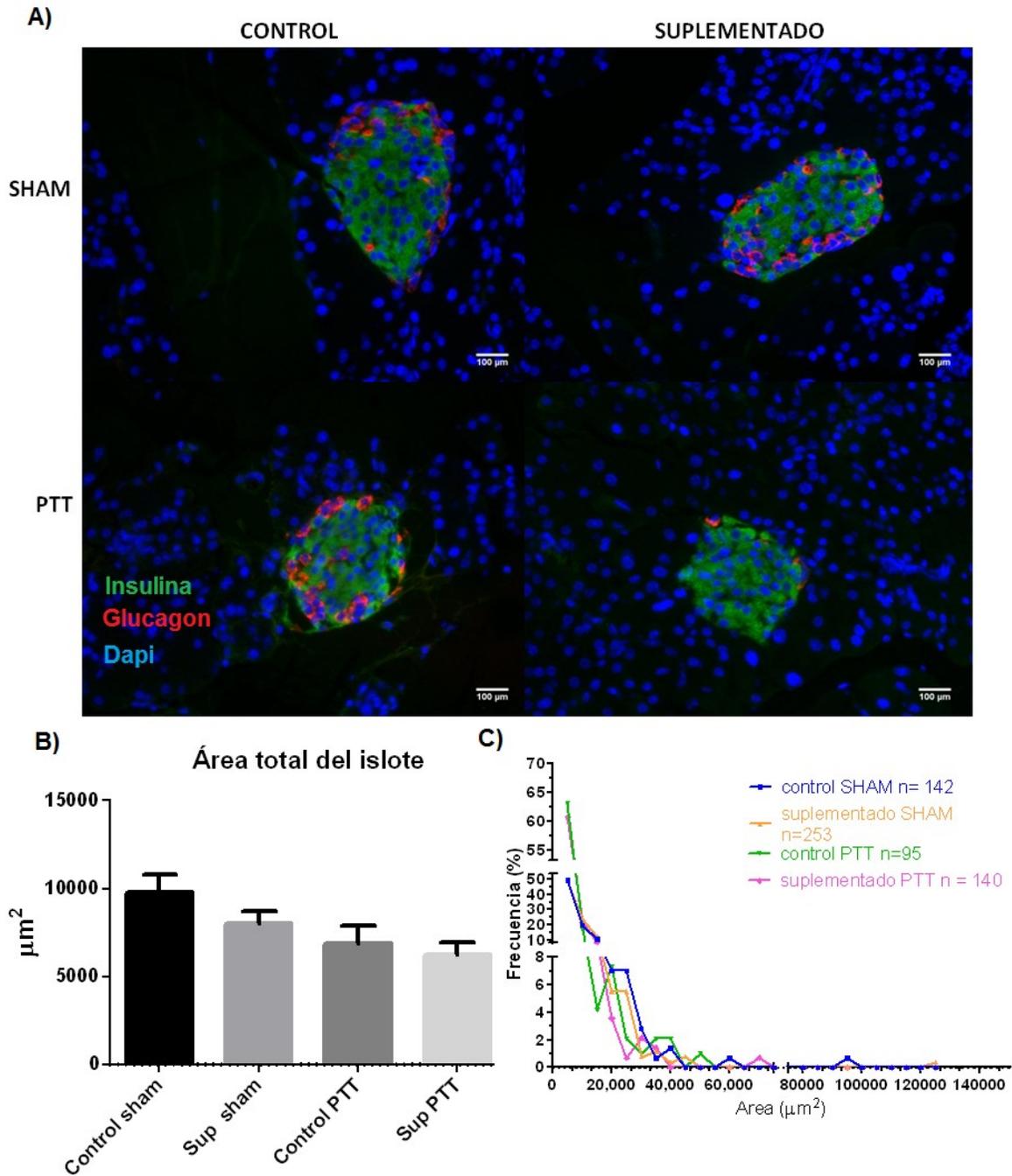


Figura 19. Tamaño del islote 1 semana post cirugía. A) Imágenes de inmunofluorescencia de islotes pancreáticos de ratón control sham (esquina superior izquierda), suplementado sham (esquina superior derecha), control pancreatectomía (esquina inferior izquierda), suplementado pancreatectomía (esquina inferior derecha) teñidos para insulina (verde) y glucagón (rojo). **B)** Tamaño promedio de islotes (media \pm ES). **C)** Distribución de frecuencias del tamaño de los islotes, que muestra cómo están distribuidos los islotes en tamaño, en el eje de las "y" aparece la frecuencia en porcentaje mientras que el eje de las x esta el área en μm^2 .

H.10. Porcentaje de células beta

En este análisis pudimos ver que el grupo suplementado sham presenta un porcentaje de células beta significativamente mayor con respecto al grupo control sham, lo cual nos indica que la biotina incrementa el porcentaje de células beta. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de células beta entre control pancreatectomizado y su correspondiente grupo suplementado.

Resultó interesante observar que los grupos que fueron sometidos a la pancreatectomía presentaron un aumento significativo en el porcentaje de células beta a 1 semana post cirugía cuando se compararon con su respectivo grupo sham. (Figura 20).

H.11. Porcentaje de células alfa

Pudimos observar que el grupo suplementado sham presenta un porcentaje de células alfa significativamente menor comparado con el grupo control sham. Este efecto no se observa entre los grupos pancreatectomizados (Figura 20).

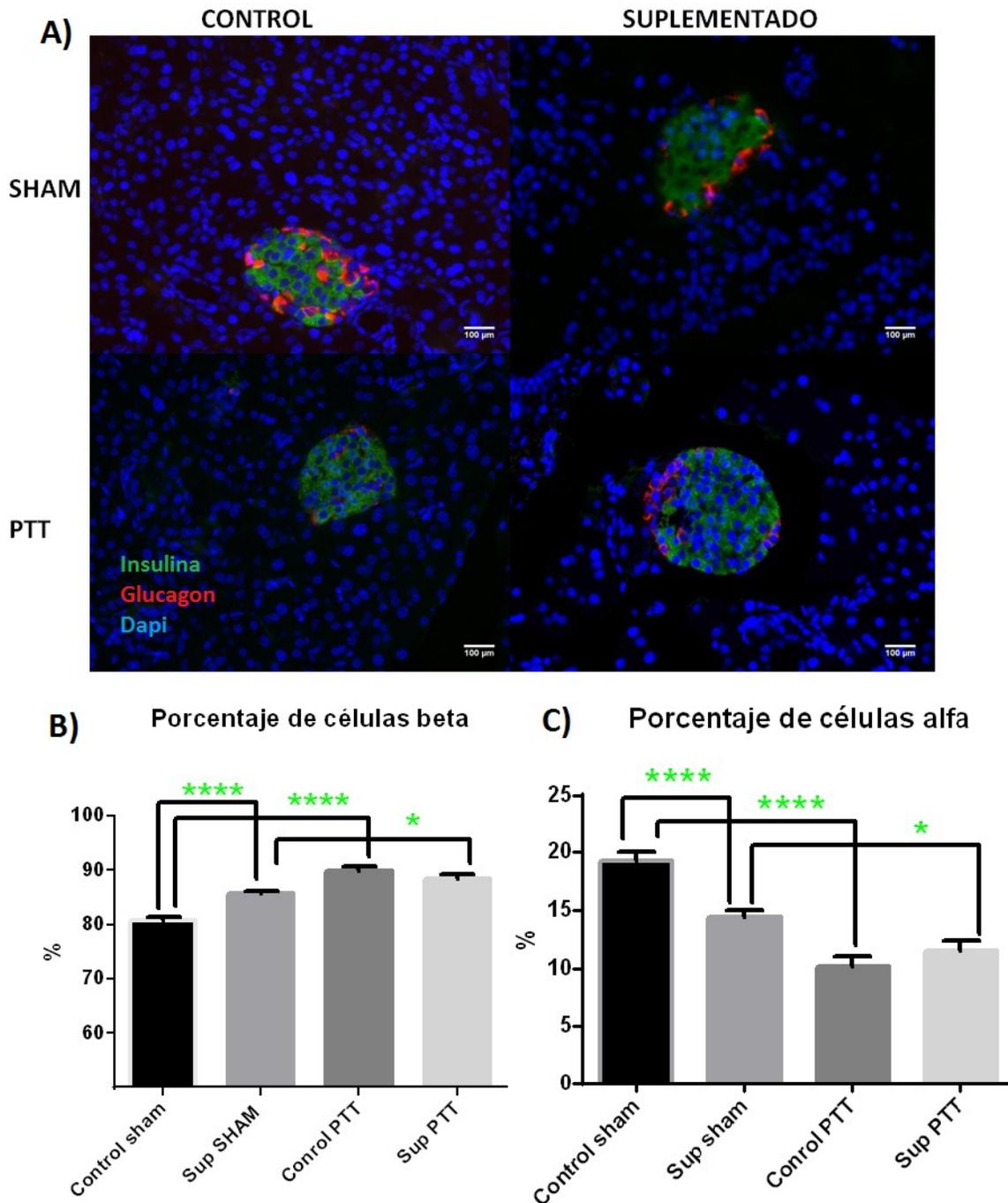


Figura 20. A) Imágenes de inmunofluorescencia de islotes pancreáticos de ratón control sham (esquina superior izquierda), suplementado sham (esquina superior derecha), control pancreatectomía (esquina inferior izquierda), suplementado pancreatectomía (esquina inferior derecha) teñidos para insulina (verde) y glucagón (rojo). **B)** Porcentaje de células beta; **C)** Porcentaje de células alfa a una semana post-cirugía. Las diferencias significativas con una $P < 0.05$ están indicadas con asteriscos verdes en la parte superior ; la cantidad de asteriscos indica si hay mucha o poca diferencia significativa. Los datos corresponden a la media \pm ES.

I. DISCUSIÓN

El periodo posterior al destete es de gran importancia debido a que en esta etapa es donde se producen los cambios para alcanzar la robustez y funcionalidad del islote, lo que conlleva a su buen funcionamiento en la etapa adulta (Miñana-Solis et al. 2008). Dado las cifras de personas que padecen diabetes ha ido aumentando con el paso del tiempo, tanto en México como en el mundo, y a que estas cifras son cada vez más alarmantes, es muy importante el estudio y la búsqueda de nuevos tratamientos que ayuden a prevenir y tratar esta enfermedad. Como ya se mencionó la biotina es una vitamina que a concentraciones farmacológicas es capaz de modificar algunos genes y tiene efectos en el metabolismo de la glucosa (Rodríguez Melendez et al. 2003, Fernández Mejía, C. 2005) y en el desarrollo (Watanabe et al. 1996). En este trabajo se analizaron los efectos de una dieta suplementada con biotina que fue administrada en el periodo posterior al destete, sobre los islotes pancreáticos, la homeostasis de la glucosa y la regeneración, ante un daño causado por pancreatectomía. Nuestros resultados encontraron efectos benéficos con la suplementación con biotina que se reflejaron en el peso corporal, las concentraciones de glucosa en sangre y la tolerancia a ésta. Además encontramos un aumento en la regeneración del páncreas en los ratones pancreatectomizados que recibieron la dieta suplementada.

I.1 Efecto de la biotina en el peso corporal.

Se ha reportado que la pancreatectomía induce una pérdida de peso corporal (HyeSeung Hung et al. 2009; A Hardikar et al. 1999), en nuestros estudios esta pérdida de peso se vio mejorada con la suplementación con biotina (fig. 12) , lo cual no se observó en los ratones controles pancreatectomizados que siguieron bajando de peso (fig.12); con lo cual podemos decir que la biotina tuvo un efecto protector ante el daño causado por la pancreatectomía que se vio reflejado en el mantenimiento y recuperación del peso corporal.

I.2. Efectos de la biotina en el metabolismo de la glucosa

Existen discrepancias sobre los efectos de la pancreatectomía sobre el desarrollo de hiperglucemia (HyeSeungHung et al. 2009; Ansarullha et al. 2012; Mina Peshavaría et. al 2006). En este estudio nuestros ratones nunca presentaron valores hiperglucémicos a una semana posterior a la pancreatectomía como se ha reportado en otros estudios, en los cuales los valores de glucosa llegan hasta los

300 mg/dL a los 4 días posteriores a la pancreatectomía (HyeSeungHung et al. 2009), sin embargo otros trabajos no reportan hiperglucemia a los 7 o 15 días posteriores a la pancreatectomía (Ansarullha et al. 2012; Mina Peshavaría et al. 2006).

Al igual que lo publicado en modelos diabéticos animales (Zhang et al. 1996; Zhang et al 1997; Reddi et al. 1988) y en humanos con diabetes (Kotsiukosetal et al. 1996; Maebashi et al. 1993; Coggeshal et al. 1985) en donde observan que la biotina mejora la condición diabética, los resultados arrojan que en el modelo de pancreatectomía la biotina administrada en el periodo posterior al destete produce una mejor tolerancia a la glucosa (Fig. 15), mejora la glucosa sanguínea (Fig. 13) y la glucosas en ayuno (Fig. 13 y 14 respectivamente), después de un daño causado por pancreatectomía comparada con el grupo control. Con lo cual se sugiere que la biotina administrada en periodos posteriores al destete ayuda a mejorar el metabolismo de la glucosa en la etapa adulta así como a un mejor enfrentamiento ante un daño causado por pancreatectomía, que más que ser un modelo de diabetes, es un modelo de regeneración; ya que para ser un modelo diabético se tiene que retirar un porcentaje mayor o igual al 90 % del páncreas lo cual no fue nuestro caso (<http://www.smu.org.uy/publicaciones/libros/historicos/dm/cap8.pdf>) y a pesar de esto se observó que la biotina ayuda a enfrentar mejor un daño causado por pancreatectomía a través de una mejoría en los niveles de glucosa (datos mostrados en figuras 13, 14 y 15). Es importante señalar que este es el primer reporte en el cual se reporta los efectos de la biotina en modelos de pancreatectomía.

I.3. Efecto de la biotina en el peso del páncreas y la regeneración.

Como ya se mostró en los resultados, el día de la cirugía no se encontraron diferencias en el peso promedio del páncreas extraído (ver tabla 1). No fue sino una semana posterior a la cirugía, es decir, el día del sacrificio, que encontramos que aquellos ratones tratados con biotina presentaban un páncreas con más peso que los del grupo control tanto en el grupo sham como en el pancreatectomizado (ver tabla 2, fig. 16 y 17); este es un dato novedoso, no antes observado en el laboratorio donde se realizó la presente tesis. En la figura 17 y tabla 3 se puede ver que ambos grupos pancreatectomizados regeneraron ya que presentan un páncreas con más peso que su respectivo grupo sham, interesantemente, se ve un páncreas con mayor peso en el grupo suplementado pancreatectomizado. Sin embargo, dado que se observó un aumento en el peso del páncreas del grupo sham suplementado con biotina no podemos saber si este aumento en el páncreas del grupo suplementado pancreatectomizado es debido a un efecto de

la biotina en la regeneración o a un aumento en el peso del páncreas, o de ambas. Se ha reportado que el porcentaje de regeneración es proporcional a la cantidad de páncreas extraído (K.W.Pearson et al. 1997), es decir, a mayor cantidad de páncreas extraído mayor es la regeneración, y se necesitaría realizar otro estudio en el cual se tome en cuenta esta diferencia en el peso del páncreas que nosotros encontramos en el grupo suplementado, para determinar si en realidad se extrae la misma cantidad y se deja la misma cantidad con este método de pancreatectomía parcial.

I.4. Efecto de la biotina en el número de islotes.

Se encontró que aquellos ratones tratados con biotina tenían una mayor cantidad de islotes que aquellos que no recibieron la dieta, este resultado concuerda con nuestro hallazgo en el cual se observó que la biotina aumenta el peso del páncreas y por lo tanto a mayor cantidad de páncreas, mayor cantidad de islotes. Este aumento en el número de islotes en los ratones suplementados explicaría el por qué la biotina mejora las concentraciones de glucosa sanguínea en ratones tanto sham como pancreatectomizados.

I.5. Efecto de la biotina en el tamaño de los islotes

Aunque no se observaron diferencias significativas en el tamaño de los islotes con el tratamiento de biotina, si se puede observar que la pancreatectomía tuvo un efecto en el tamaño y que está tendió a hacer los islotes más pequeños, que aquellos ratones que no sufrieron una pancreatectomía.

I.6. Efecto de la biotina en la proporción de células beta y células alfa.

En este estudio pudimos encontrar que la pancreatectomía induce un aumento en el porcentaje de células beta (Fig. 20) que concuerda como lo ya reportado por (HyeSeungHung; et.al 2009, Mina Peshavaria et al. 2006) en los cuales se reporta que la pancreatectomía induce una regeneración de células beta. Por otro lado, encontramos que en los grupos sham la biotina aumenta la proporción de células beta, sin embargo este efecto no se observó en los grupos pancreatectomizados probablemente debido a que como ya dijimos la pancreatectomía induce una regeneración de células beta y ésta pudo haber enmascarado el efecto que la

biotina pudiese tener en el aumento del porcentaje de células beta que se observa en los sham.

J. CONCLUSIONES

En conclusión, la biotina tuvo un efecto en el peso del páncreas, es decir los ratones suplementados con biotina tienen páncreas más grandes que los controles, esto tuvo un efecto en el número de islotes, que fue mayor en los suplementados y también en el metabolismo de la glucosa, ya que aquellos ratones que fueron suplementados con biotina presentaban una mejor tolerancia a la glucosa y concentraciones de glucosa sanguíneas menores que los controles tanto en los grupos sham como en los pancreatectomizados. También podemos concluir que la pancreatectomía induce una regeneración del páncreas en ambos grupos pancreatectomizados, pero la regeneración fue mayor en el grupo suplementado pancreatectomía. Debido a que en este estudio se encontró que la biotina aumenta el peso del páncreas no pudimos saber si esta cantidad de páncreas regenerado en el grupo suplementado fue debido a este aumento en el páncreas o porque en realidad la biotina indujo una mayor regeneración de este tejido.

K. PERSPECTIVAS

Se necesitaría realizar otros estudios para determinar si la biotina tiene un efecto o no en la regeneración. La estrategia requerirá analizar si el páncreas remanente en la pancreatectomía es igual tanto en los ratones controles como pancreatectomizados, y de tal forma que se manejen las mismas condiciones en ambos grupos pancreatectomizados. De ésta manera si se comprueba que la biotina induce una regeneración, lo siguiente sería investigar mediante que mecanismo induce una mayor regeneración, y se podrían medir algunos marcadores de regeneración, de proliferación y de neogénesis para determinar mediante cuál de estos tres mecanismos la biotina está regenerando y aumentando el tamaño del páncreas y el número de islotes.

L. REFERENCIAS

- Aguayo C, Sanchez C, Godínez-Puig V, Gutiérrez-Ospina G, Hiriart M. Restructuring of pancreatic islets and insulin secretion in a postnatal critical window. *PLoS ONE*; 1:e35.(2006).
- Alban C, JobD, Douce R. Biotin metabolism in plants . *Annu.Rev. Plant Physiol. Plant Mol.Biol.* Jun;51:17-47 (2000).
- Albert Barberá Rosa Gasá, Desarrollo embrionario del páncreas y regeneración en el páncreas adulto. El islote pancreático en el desarrollo y Tratamiento de la Diabetes, Capítulo 8. (2007).
- Amanda M Ackermann and Mureen Gannon, Molecular Regulation of pancreatic β -cell mass developmen, maintenance, and expansion. *Journal of Molecular Endocrinology* 38, 193-206,(2007)
- American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 28, 1:s5-s10 (2005).
- Apelqvist,A.;Li,H.;Sommer.L;Beatus,P.; Anderson,D.J.; Hongo T.; Hrabe de Angelis, M; Lendahl,U.;Edlund, H., Notch signaling controls pancreatic cell differentiation. *Nature*, 400:877-81(1999).
- Aizawa, T., Gilon, P. & Henquin, J.C, Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K^+ channels in mouse B cells. *J Clin Invest* 89, 1288-95 (1992).
- Aizawa, T. & Komatsu , M. Importance of nonionic signals for glucose induced biphasic insulin secretion. *Diabetes* 51 Suppl 1, S 96-8 (2002).
- Bailey LM, Ivanov RA, Wallace SW. Artifactual detection of biotin on histones by streptavidin. *Anal Biochem.* 373 (1):71-77 (2008).
- Bernard Kargar C & Korza A, Endocrine pancreas plasticity under physiological and pathological conditions. *Diabetes* 50 s30-s35,(2001).
- Bonner-Weir S, Baxter LA, Schuppín GT, and Smith FE. A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas. A possible recapitulation of embryonic development. *Diabetes* 42: 1715–1720, (1993).
- Bowens L., Wang RN, De Blay E, E, Pipeleers DG, and Klöppel G. Cytokeratins as markers of ductal cell differentiation and islet neogenesis in the neonatal rat pancreas. *Diabetes* 43: 1279-128 (1994).

- Brissova M, Fowler MJ, Nicholson WE, Chu A, Hirshberb B, Harlan DM, Powers AC. *Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy*. J Histochem Cytochem;53:1087–97 (2005).
- Brisova M & Powers A.C, *Architecture of Pancreatic Islets in B cells in Health & Disease*.(eds. Seino, S. & Graeme, I.B), (Springer, Japan, (2008).
- Cabrera O, Berman M, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren P, Caicedo A. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. PNAS;103:2334–9 (2006).
- Coggeshall, J.C., Hegggers, J.P., Robinson, M.C. & Baker, H. Biotin Status and Plasma Glucose in Diabetics. Ann NY Acad Sci 447, 389-392 (1985).
- Curry DL, Bennett L.L Grodosky GM , Dynamics of insulin secretion by the perfused rat páncreas. Endocrinology 83:572-584.(1968).
- Dakshinamurti y Chauhan J. Biotin-binding proteins. In: Vitamin receptors; vitamins as ligand in cell communication. U.S.A. pp.200-249. Cambridge University Press,(1994).
- Dakshinamurti K, Li W. Transcriptional regulaton of 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 asialogycoprotein receptors via cGMP-dependent protein kinase. AM J Physiol Cell Physiol; 279: C2037-42, (2000).
- Dean PM , Ultrastructural Morphometry of the pancreatic β -cell. Diabetología. 9:115119, (1973).
- Donald J. Steiner, Abraham Kim, Kevin Miller, and Manami Hara Pancreatic Islet Plasticity Interspecies comparison of islet architecture and composition, Department of Medicine; The University of Chicago; Chicago, IL USA , Islets. May ; 2(3): 135–145, (2010).
- Dor Y, Brown J, Martinez OI, and Melton DA. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 429: 41–46,(2004)
- Doyle, M.E. & Egan, J.M. Pharmacological agents that directly modulate insulin secretion. Pharmacol Rev 55, 105-31 (2003).
- Easom , R.A. CaM Kinase II: a protein kinase with extraordinary takents germane to insulin exocytosis. Diabetes 48, 675-84, (1999).

- Edluns, H. Developmental biology of the pancreas, *Diabetes*, 50(Suppl 1), S5, (2001).
- Elayat AA, el-Naggar MM, Tahir M. *An immunocytochemical and morphometric study of the rat pancreatic islets*. *J Anat*;186:629–37, (1995).
- Falina Smushkin., Adrian Vella., What is type 2 diabetes, *Diabetes: Basic Facts, Medicine* 38:11 , (2010).
- Federación Mexicana de Diabetes, Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, (2012)
- Fernandez Mejia , C. Pharmacological Effects of biotin. *J Nutr Biochem*16,424-7, (2005)
- Gembal, M, Guillon, P. & Henquin, J.C. Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K⁺ channels in mouse B cells. *J Clin Invest* 89, 1288-95, (1992).
- Georgia S and Bushan A. Beta cell replication is the primary mechanism for maintaining postnatal beta cell mass. *J Clin Invest* 114:963-968, (2004).
- Giddings, S.J; King C.D; Harman, K.W.; Flood, J.F.; Carnaghi, L.R. *Nat Genet*,6,310,(1994)
- Gilon P, Shephard RM, Henquin JC Oscillations of secretion driven by oscillations of cytoplasmic Ca²⁺ concentration resembling bursting electrical activity in single mouse islets of Langerhans. *FEBS Lett* 259:19-23. (1993)
- Healy S, Perez CB, Jia D, McDonald MK, Davie JR, Gravel RA. Biotin is not a natural histone modification. *Biochim Biophys Acta*. 1789 (11-12): 719-33, (2009).
- Henquin, J.C Triggering an amplifying pathway of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* 49, 1751-60, (2000).
- Hiriart, M. & Aguilar-Bryan , L. Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic beta-cell. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295, E1298-306 (2008)
- Hyden MR, Showers JR, Isletopathy in Type 2 diabetes mellitus: implications of islet RAS, islet fibrosis, islet amyloid, remodeling as oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* ,9:891-910, (2007).
- Hymes J, Wolf B. Biotinidase and its roles in biotin metabolism. *Clin Chim Acta*. 225 (1):1-11 (1996).

- Jensen, J, Gene regulatory factors in pancreatic development *Dev. Dyn.* 229,176-200 (2004).
- Joost, H.G et al. Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polypol transportation facilitators. *AM J Physiol Endocrinol Metab* 282, EP74-6, (2002).
- Jones , P.M& Persaud, S.J. Protein kinases, protein phosphorylation, and the regulation of insulin secretion from pancreatic beta- cells. *Endocr Rev* 19, 429-61, (1998).
- Jruher, K.A., Bhatt, H., Landt, M. & Easom, R.A. Calcium-stimulated phosphorylation of MAP-2 in pancreatic beta TC3-Cells is mediated by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II. *J Biol Chem* 272, 2746-9, (1995).
- Koutsikos, D. et al .Oral glucose tolerance test after high-dose i.v biotin administration in normoglycemic hemodialysis patients. *Ren Fail* 18, 131-7, (1996).
- Ku,H.T.;Zhang, N;;Kubo,A;O´connor,R;Mao,M;Keller,6.;Bromberg,J.S. *Stem Cells*,22,1205, (2004).
- Laychock., S.G., Modica, M.E. & Cavanaugh, C.T L-arginine stimulates cyclic guanosine 3´, 5´-monophosphate formation in rat islets of Langerhans and RINm5F insulinoma cells: evidence for L-arginine: nitric synthase. *Endocrinology* 129, 3043-52, (1991).
- Leahy JL, Bonner-Weir S, and Weir GC. Minimal chronic hyperglycemia is a critical determinant of impaired insulin secretion after an incomplete pancreatectomy. *J Clin Invest* 81: 1407–1414, (1988).
- Leahy, J.L., Hirsch, IB., Peterson, K.A & Schneider, D. Targeting beta-cell function early in the course of therapy for type 2 diabetes. *J Clin Invest* 116,1802-12 (2006)
- Lucas A., Programming by early nutrition: An experimental approach. *J Nutr* 128:401S-406S, (1998).
- Maebashi M, Makino Y, Furukawa Y, Ohinata K, Kimura S, Takao S. Therapeutic evaluation of the effect of bioin on hyperglycemia in patients with non-insulin diabetes mellitus. *J Clin Biochem Nutr*; 14:211-8, (1993).
- Matschinsky, F, M Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes* 45, 223-41, (1996).
- Meyers MG Jr, White MF *The Molecular Basis of Insulin Action*. En: *Insulin Signaling: From cultured cells to animal models*. Editor: Gruenberg G, Zick Y. Taylor and Francis, New York, pp 55-87, (2002).
- Minaña-Solis, M.D.C. & Escobar, C. Increased susceptibility to metabolic alterations in young adult females exposed to early malnutrition. *International journal of biological sciences*, 3(1), pp.12-9, (2007).

- 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 hyperplasi and hypertophy. *Doiabetes* 49 1341-1346, (2000).
- Olofsson CS, Gopel SO, Barg Set al, Fast Insulin secretion reflects exocytosis of docked granules in mouse pancreatic β -cell. *Pflugers Arch* 444:43-51, (2002).
- Orci L, Amherdt M, Malaisse-Large F, Rouiller C, Renold AE, Insulin release by emiocytosis: demostnation whith freeze-etchin tecnique. *Sience* 179:82-84, (1973)
- Orci L, Malasse-Lagae FRavazzola M, Amherdt M, Renold AE, Exocytosis-endocitosis coupling in the pancreatic beta cell. *Science* 181:561-562, (1973).
- Orgabnización Mundial de la Salud, Nota descriptiba No.132, Septiembre del (2012).
- Pearson KW, Scott D, and Torrance B. Effects of partial surgical pancreatectomy in rats. I. Pancreatic regeneration. *Gastroenterology* 72: 469–473, (1977).
- Plachot C, Movassat J, and Portha B. Impaired beta-cell regeneration after partial pancreatectomy in the adult Goto-Kakizaki rat, a spontaneous model of type II diabetes. *Histochem Cell Biol* 116: 131–139, (2001).
- Raimundo Goberna Ortiz La Insulina: de la biología a la patología molecular, Unversidad de Sevilla, Impreso en España, (1995).
- Redi, A., DeAngeki , B., Frank, O., Lasker, N. & Baker , H. Biotin supplementation improves glucose and insulin tolerances in generally diabetic KK mice. *Life SCI* 42, 1323-30, (1988).
- Rodriguez MR, Camporeale G, GriffinJB, Zeempleni J. Interleikin-2receptor γ -dependent endocytosis depends on biotin in Jurkat cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 284 (2): C415-C421, (2003).
- Rodriguez-Melendez,R. & Zempleni, J.Regulation of gene expresion by biotin (review), *J Nutr Biochem* 14, 680-90, (2003).
- Romero-Navarro G, Cabrera- Viladares G, German MS, Matschinsky FM,Wang J, Fernandez Mejia C. Biotin Regulation of pancreatic glucokinase and insulin in primary cultured rat islets in biotin deficient rats. *Endocrinology* ;140: 4595-600, (1999).
- Rosman, P. & Rentrom, E. Insulin granule dynamics in pancreatica beta cells. *Diabetología* 46, 1029-45, (2003).
- Russell, M.A & Morgan, N. Expression and functional roles of guanylate cyclase isoforms inBRIN-BD11 beta-cells. *Islets* 2, 23-31, (2010).

- Saharp, G.W. The adenylate cyclase-cyclic AMP system in islets of Langerhans and its role in the control of insulin release. *Diabetología* 16, 287-96, (1979).
- Scaglia L, Cahill CJ, Finergood DT & Bonner- Weir S 1997 Apoptosis participates in the remodeling of the endocrine pancreas in the neonatal rat. *Endocrinology* 138 1736-1741, (1997).
- Starub, S.G & Sharp, G.W. Glucose- stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. *Diabetes Metab Res Rev* 18, 451-63, (2002).
- Stefan Y, Grasso S, Perrelet A, Orci L. *The pancreatic polypeptide-rich lobe of the human pancreas: definitive identification of its derivation from the ventral pancreatic primordium*. *Diabetologia*;23:141–2, (1982).
- Stephen Nussey and Saffron Whitehead, Snt Jhon Medical School, London , UK , *Anatomical freatures of pancreatic islets in relation to hormone secretion and its control*, *Endocrinology*, Chapter 2 The Endocrine Páncreas , An Integrated Approach, BIOS Scientific Publishers, (2001).
- Thomson, J.A; Itskovitz-Eldor, J.; Shapiro, S. S; Wakuitz, M.A; Swiergel, J.j.; Marshall, V.S.; Jhones,J.M; *Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts*, *Science*, 282,1145, (1998).
- Ulrich Welsch , *Histología* , [traducción de Editorial Médica Panamericana , Jorge Horacio Negrete], 2^{da} edición revisada (2008).
- Van Hoof, D., D´Amour, K.& German,M. Derivation of insulin-producing cells from humman ambryonic stem cells. *Stem cell Research*3,73-87 (2009).
- Vilchies FA, Fernández MC. Efecto de la biotina sobre la expresión genética y el metabolismo. *Rev. Invest. Clin.* 57:716-724. (2005).
- Virginia Melo Ruiz , Óscar Cuamatzi Tapia,*Bioquímica de los proceso metabólicos* , 2^{da} edición , Reverte ediciones S.A de C.V, (2007).
- Watanabe, T. Morphological and Biochemical effects of excessive amounts of biotin on embryonic development mice. *Experientia* 52, 149-54 (1996).
- Wells, J.M.; Melton, D.A, *Vertebrate endoderm development*. *Annu.Rev Cell Dev. Biol.* ,15,393, (1999).
- Wells,J.M.;Melton, D.A., *Early mouse endoderm is patterned by soluble factors from adjacent germ layers*, *Development*, 127,1563,(2000).
- Wholheim CB, Sharp GW *Regulation of insulin release bye calcium*. *PhysiolRev* 61:914-973, (1981).

-Widemann S, Rodriguez Melendez R, Ortega CD, Zempleni J. 2004. Clusters of biotin-responsive genes in human peripheral blood mononuclear cells. *J Nutr Biochem*, (2004).

-Yasumaga, M.Nishikawa, S.; Chiba, T, Era, T; Nishikawa, S., Induction and monitoring of definitive and visceral endoderm differentiation of mouse ES cells, *Nat. Biotechnol.*,23,1542(2005).

-Zhang, H. et al. A high biotin diet improves the impaired glucose tolerance of long-term spontaneously hyperglycemic rats with non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 42,517-26, (1996).

-Zhang, H., Osada, K., Sone, H. & Furukawa, Y. Biotin administration improves the impaired glucose tolerance of streptozotocin- induced diabetic Wistar rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 43, 271-80, (1997).

Zempleni J,Uptake, localization and noncarboxylase roles of biotin. *Annu Rev Nutr*, 25: 175-196, (2005).