



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON BIOTINA EN LA DIETA
SOBRE DIVERSOS MARCADORES DE TOXICIDAD**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M en C Leticia Riverón Negrete

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. María Cristina Fernández Mejía
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

COMITÉ TUTOR: Dra. Ma. Eugenia Gonsebatt Bonaparte
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
Dr. José Pedraza Chaverrí
Facultad de Química, UNAM.

México, CD. MX., Septiembre 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON BIOTINA EN LA DIETA
SOBRE DIVERSOS MARCADORES DE TOXICIDAD**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M en C Leticia Riverón Negrete

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. María Cristina Fernández Mejía
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

COMITÉ TUTOR: Dra. Ma. Eugenia Gonsebatt Bonaparte
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
Dr. José Pedraza Chaverrí
Facultad de Química, UNAM.

México, CD. MX., Septiembre 2017




Lic. Ivonne Ramírez Wence
Director General de Administración Escolar, UNAM.
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 5 de junio del 2017, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **RIVERÓN NEGRETE LETICIA** con número de cuenta **8327144-7** con la tesis titulada **"ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON BIOTINA EN LA DIETA SOBRE DIVERSOS MARCADORES DE TOXICIDAD"**, realizada bajo la dirección de la Dra. María Cristina Fernández Mejía:

Presidente: DRA. VICTORIA CHAGOYA DE SÁNCHEZ
Vocal: DR. JESÚS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE
Secretario: DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE
Suplente: DRA. ANDREA SACHI DÍAZ VILLASEÑOR
Suplente: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI

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

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 11 de agosto del 2017.


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado de Ciencias Biológicas de la UNAM, por permitirme realizar el doctorado en su plan de estudios en el área de Biología Experimental y las facilidades otorgadas en todas las entidades académicas participantes.

La realización de esta tesis fue gracias a los apoyos recibidos por CONACyT proyecto CB 219787 y al Instituto Nacional de Pediatría, fondos federales con número de registro 074/2013.

Mi profundo reconocimiento al comité tutor: Dra. Ma. Cristina Fernández Mejía, Dra. Ma. Eugenia Gonsebatt Bonaparte y Dr. José Pedraza Chaverrí; por aceptarme y guiarme durante todo mi doctorado con paciencia, consejos, supervisión y su invaluable conocimiento.

AGRADECIMIENTOS

A mi jurado integrado por la Dra. Victoria Chagoya de Sánchez, Dr. Javier Espinosa Aguirre, Dra. Ma. Eugenia Gonsebatt Bonaparte, Dr. José Pedraza Chaverrí y la Dra. Andrea Sachi Díaz Villaseñor por sus acertados comentarios en la redacción de la tesis.

A la Unidad de Genética de la Nutrición del Instituto Nacional de Pediatría / Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM; donde se llevó a cabo la parte experimental de esta tesis.

DEDICATORIA

A Dios, por todo lo recibido.

A todos mis familiares y amigos, con los que he compartido alegrías, tristezas, éxitos, fracasos, pérdida de seres queridos y un sin fin de momentos memorables.

A quienes por su crítica, me ayudaron a reflexionar y mejorar cada día.

A los que con su aprobación me alentaron a seguir con mis metas y objetivos.

A todos mis profesores y compañeros, que a lo largo de mi vida académica me transmitieron su conocimiento, valores y amistad.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y el Instituto Nacional de Pediatría por la estancia que me brindan, a los cuales veo con gratitud y respeto.

ÍNDICE

RESUMEN.....	4
ABSTRACT.....	6
ABREVIATURAS.....	8
I INTRODUCCIÓN.....	11
I.1 BIOTINA.....	11
I.1.1 Química y metabolismo.....	11
I.1.2 Función y ciclo de la biotina.....	13
I.1.3 Función de las carboxilasas dependientes de la biotina en mamíferos. 	14
I.1.4 Efectos farmacológicos de la biotina.....	14
I.1.5 Efectos farmacológicos de la biotina sobre el metabolismo de los lípidos.....	15
I.1.6 Efectos farmacológicos de la biotina sobre el metabolismo de la glucosa.....	16
I.1.7 Efectos tóxicos de la biotina.....	18
I.1.8 Efectos farmacológicos de la biotina sobre la morfología tisular.....	19
I.2 HÍGADO.....	20
I.2.1 Anatomía del hígado.....	20
I.2.2 Funciones hepáticas.....	23
I.2.3 Función excretora de la bilis.....	23
I.2.4 Catabolismo de proteínas en el hígado.....	24
I.2.5 Función detoxificante del hígado.....	24
I.2.6 Pruebas de integridad y funcionamiento hepático.....	25

I.2.7 Estrés oxidante en el hígado.....	26
I.3 DAÑO GENOTÓXICO.....	29
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	30
III. HIPOTESIS	31
IV. OBJETIVO GENERAL.....	31
IV.1 Objetivos específicos.....	31
V. MATERIAL Y MÉTODOS	32
V.1. Diseño experimental.....	32
V.2 Marcadores de toxicidad hepática sérica.....	32
V.3 Determinación cuantitativa de aspartato aminotransferasa.....	33
V. 4 Determinación cuantitativa de alanino aminotransferasa.	33
V. 5 Determinación cuantitativa de fosfatasa alcalina.....	34
V. 6 Determinación gama glutamiltransferasa.	35
V. 7 Determinación de bilirrubina.	35
V. 8 Determinación cuantitativa de albúmina.....	36
V. 9 Actividad de superóxido dismutasa.	36
V.10 Actividad enzimática de la catalasa.	37
V. 11 Concentración de glutatión reducido y oxidado.....	37
V. 12 Concentración de óxido nítrico.....	38
V. 13 Daño morfológico.....	38
V. 14 Daño genotóxico.....	39
V. 15 Estadística.....	39
VI RESULTADOS	40

VI. 1	Peso del ratón e ingesta de alimento.....	40
VI. 2	Marcadores de toxicidad hepática.	40
VI. 3	Actividad de la superóxido dismutasa en el hígado.....	44
VI. 4	Determinación enzimática de la catalasa en el hígado.	45
VI. 5	Determinación de glutatión reducido y oxidado en el hígado.....	46
VI. 6	Concentración de óxido nítrico.....	47
VI. 7	Histomorfología de hígado teñido con hematoxilina-eosina.....	47
VI. 8	Determinación de daño genotóxico.....	54
VII	DISCUSIÓN	55
VIII	CONCLUSIÓN	60
IX	PERSPECTIVAS	61
X	REFERENCIAS	83

RESUMEN

La biotina es una vitamina hidrosoluble, que en concentraciones 30 a 650 veces mayores a su requerimiento diario (30 µg) es capaz de modificar varias funciones biológicas, como la homeostasis de la glucosa y de los triglicéridos. Estos hallazgos han llevado a proponerla como una estrategia en el tratamiento del síndrome metabólico y la diabetes. Sin embargo, no existen suficientes estudios que determinen si esta vitamina tiene efectos tóxicos en las concentraciones y con los modelos donde se han reportado estos beneficios. Por lo que este trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto que produce la suplementación de biotina sobre diferentes marcadores como la bioquímica sérica, daño oxidante e histomorfología del hígado, un tejido en el que se ha reportado ampliamente que concentraciones farmacológicas de biotina modifica la expresión de genes del metabolismo de la glucosa y de los lípidos. También se determinó el daño genotóxico en la médula ósea. Los estudios se realizaron en ratones macho de la cepa BALB/cAnN de tres semanas de edad, en 2 grupos de 10 ratones cada uno. El grupo control recibió una dieta de 1.76 mg de biotina/kg alimento y el grupo experimental la recibió a 97.7 mg/kg de alimento. Los animales recibieron agua y alimento *ad libitum* durante 8 semanas. Como control positivo de toxicidad se usaron ratones tratados con tetracloruro de carbono (CCl₄) diluido en dimetilsulfóxido (DMSO) relación 1:1, con una dosis única de 2 ml/Kg de peso, durante 24 h. Al término de los tratamientos se sacrificaron los ratones y obtuvieron muestras de sangre, médula ósea e hígado en las que se realizaron las diferentes pruebas como: aspartato amino transferasa, (AST), alanino aminotransferasa (ALT), γ -glutamyl transferasa (GGT), fosfatasa alcalina (FAL), albúmina y urea para la bioquímica sérica. La actividad de la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), así como la concentración de óxido nítrico (NO), glutatión (GSH) y glutatión disulfuro (GSSG) para daño oxidante en hígado. El daño genotóxico se determinó con la prueba de formación de micronúcleos en reticulocitos y la histomorfología mediante cortes de hígado teñidos por hematoxilina- eosina (HE). En los resultados no se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y el suplementado en los diferentes marcadores de bioquímica sérica, ni daño oxidante y en

los cortes de hígado se observó un incremento de células binucleadas, nucleomegalia, así como una moderada dilatación de sinusoides y vascularización. En tanto que en la formación de micronúcleos hubo un incremento significativo en el grupo suplementado (0.6 ± 0.04) con respecto al control (0.5 ± 0.02). En conclusión no existe efecto detrimental de la suplementación con biotina en la dieta sobre los marcadores de bioquímica sérica, ni estrés oxidante; sin embargo, se requieren pruebas adicionales de genotoxicidad e inmunohistoquímica antes de proponer a la biotina como una estrategia en el tratamiento del síndrome metabólico y la diabetes.

ABSTRACT

Biotin is a water-soluble vitamin that acts as a covalent bound coenzyme of carboxylases. Unrelated to this role, biotin at pharmacological concentrations, about 30-650 times greater than its requirement of 30 micrograms per day, modifies gene expression. Several studies in humans and animal models have found that pharmacological concentrations of biotin have favorable effects on triglycerides and glucose homeostasis. These effects suggest that biotin could be used for the treatment of dyslipidemia, glucose intolerance and diabetes. However, there is scarce information about whether biotin has toxic effects at concentrations that produce their beneficial effects on glucose and lipids homeostasis. We analyzed the effects of biotin supplementation on different markers such as serum biochemistry, oxidative stress, genotoxic markers and liver histomorphology, in an animal model in which it has been found favorable effects of biotin on triglycerides and glucose homeostasis. Two groups of male mice were fed from weaning to 11 weeks of age (8 weeks of treatment) with a control diet containing (1.76 mg biotin/ food kg) or with a biotin supplemented diet (97.7 mg biotin/ food kg). A third group received biotin-control diet and was treated with a single dose of carbon tetrachloride (CCl₄, 2 ml/kg body weight), and was used as a positive control. At the end of the treatment mice were food deprived for 16 h, anesthetized with Sevoflurane and blood, liver and bone marrow were extracted. Finally, mice were killed by cervical dislocation. The biochemical tests in serum were aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), γ -glutamyl transferase (GGT), alkaline phosphatase (ALP), albumin and urea. The activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and the level of nitric oxide (NO), glutathione (GSH) and glutathione disulfide (GSSG), were determined as oxidative stress markers. The genotoxic effect was determined by reticulocyte micronuclei formation and liver histomorphology in sections stained with hematoxylin-eosin. We found that eight weeks of biotin supplementation in the diet did not modify any of the biochemical tests and oxidative markers tested, but produced a significant increase in micronuclei formation (Control=0.6 \pm 0.04; supplemented 0.5 \pm 0.02). Liver histomorphology showed an increase

of binucleate cells, nucleomegaly, as well as a moderate dilation of sinusoids and vascularization in the liver sections. We concluded there is not a detrimental effect of pharmacological effects of biotin on biochemical test and oxidative stress markers, however, the increase of micronuclei and on liver morphology indicate that biotin toxicity studies need to be addressed with different tools because the pharmacological concentrations of biotin affect tissue morphology and have nuclei effects.

ABREVIATURAS

ACC	Acetil CoA carboxilasa.
ALT/ GPT	Alanino aminotransferasa.
AMES	Prueba para evaluar agentes mutagénicos.
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero.
AST/GOT	Aspartato aminotransferasa.
BHE	Bereau of home economics.
CAT	Catalasa.
CCl ₄	Tetracloruro de carbono.
Cu	Cobre.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
FAL	Fosfatasa alcalina.
FAS	Ácido graso sintasa.
GGT	Gama glutamil transferasa.
GLUT-2	Transportador de glucosa 2.
GSH	Glutación reducido.
GP	Glutación peroxidasa.
GR	Glutación reductasa.
GSSG	Disulfuro de glutación.

H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno.
HE	Hematoxilina-eosina.
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución.
IC ₅₀	Concentración Inhibitoria del 50%.
LDH	Lactato deshidrogenasa.
MDH	Malato deshidrogenasa.
Mn	Manganeso.
MyoD	Proteína de diferenciación miogénica.
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotido de hidrógeno.
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.
NO	Óxido nítrico.
NO ₂	Nitritos.
NO ₃	Nitratos.
O ₂ ^{·-}	Anión superóxido.
OH	Hidroxilo.
OLEFT	Otsuka Long Evans Tokushima Fatty.
ONOO ⁻	Peroxinitrito.
PBS	Solución salina amortiguada por fosfatos.
PFK-1	Fosfofructocinasa-1.
p-NPP	p- nitrofenilfosfato.
PC	Piruvato carboxilasa.

PCC	Propionil CoA carboxilasa.
PK	Piruvato cinasa.
PPAR- γ	Receptor de peroxisoma proliferador activado gamma.
ROS	Especies reactivas de oxígeno.
RNS	Especies reactivas de nitrógeno.
SFB	Suero fetal bovino.
SMVT	Transportador múltiple de vitaminas dependiente de sodio.
SOD	Superóxido dismutasa.
STZ	Estreptozotocina.
SREBP1-c	Proteínas de unión al elemento regulador de esteroides 1c.
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad.
XO	Xantina oxidasa.
Zn	Zinc.

I INTRODUCCIÓN

I.1 BIOTINA

I.1.1 Química y metabolismo.

Su descubrimiento lo efectuó Boas en el año 1927 en estudios realizados en la yema de huevo. Posteriormente fue aislada por Kögl y Tonnis en 1936, finalmente su síntesis total la realizó Harris *et al.*, en 1943. A la vitamina biotina se le conoce también como vitamina hidrosoluble del complejo B, vitamina H o vitamina B8; químicamente está formada por un anillo tetrahidrotiofeno, un anillo ureido y ácido valérico (Fig. 1). Su peso molecular es de 244.31 g/mol y actúa como grupo prostético de las carboxilasas en los mamíferos (Dakshinamurti y Li, 1994; Said, 2012).

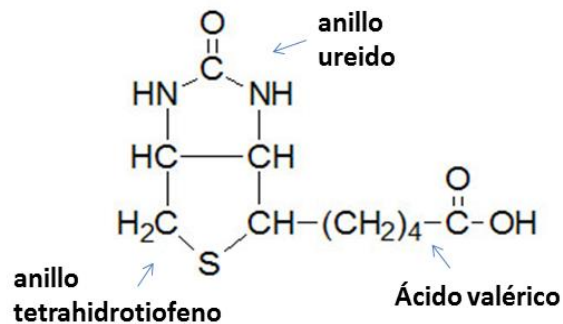


Fig. 1. Estructura química de la biotina.

Los mamíferos no tienen la capacidad de sintetizarla, por lo que sus requerimientos diarios tienen que ser cubiertos por la dieta. En las plantas, la biotina se presenta por lo general en su estado libre, lo que hace que su absorción sea inmediata, mientras que en las levaduras, los productos de origen animal como la carne roja, de aves y huevos, está unida en las proteínas de manera covalente en un residuo de lisina. Al ser ingerida la biotina, la biotinidasa pancreática (una hidrolasa), rompe el enlace, que permite su liberación, utilización y reutilización (Mock, 1996; Said *et al.*, 2000). En el organismo, la

localizamos en el borde de las vellosidades de los enterocitos; para facilitar su ingreso cuenta específicamente con el transportador múltiple de vitaminas dependiente de sodio (SMVT), dependiente de la temperatura, en concentraciones farmacológicas predomina su difusión en la porción distal del duodeno y proximal del yeyuno (Fig. 2), para posteriormente entrar al torrente sanguíneo (Dakshinamurti y Chauhan, 1989; Mock, 1996). Siendo el hígado el órgano que absorbe la mayor cantidad de biotina para su metabolismo (Zempleni, 2005). A nivel celular se le localiza en el citoplasma, mitocondria, microsomas y núcleo. En la mitocondria se almacena en la parte intramitocondrial (Said, 2012).

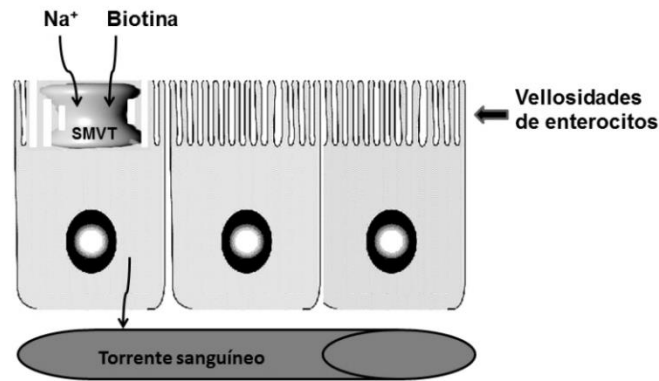


Fig. 2. Ingreso de la biotina en el intestino delgado (Nicola, 2015).

El mecanismo mediante el cual la biotina llega al hígado y otros tejidos después de su absorción y distribución en el plasma lo realiza el transportador SMVT (Balamurugan *et al.*, 2003), que es el mismo transportador específico de los enterocitos. Aproximadamente la mitad de la biotina que llega al hígado es transformada a metabolitos como la bisnorbiotina, tetranorbiotina, sulfóxido de biotina, sulfona de biotina y eliminados en la orina (Mock, 1996). Se ha reportado que en la excreción urinaria, las concentraciones séricas de la biotina y sus metabolitos aumentan proporcionalmente en respuesta a las dosis administradas (Zempleni *et al.*, 1997). Sin embargo hay discrepancias entre los diferentes métodos empleados, como el

radioinmunoensayo y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que sugieren valores promedio que oscilan entre 0.5-10 nmol/L (Mock, 1996).

I.1.2 Función y ciclo de la biotina.

Las carboxilasas son sintetizadas como apocarboxilasas que carecen de actividad enzimática, cuando se unen covalentemente a la biotina adquieren su capacidad catalítica y son llamadas holocarboxilasas, a este proceso se le conoce como biotinilación y la enzima que participa es la holocarboxilasa sintetasa (Rodríguez, 2000). La biotina unida a proteínas es degradada proteolíticamente hasta biotinil-lisina o biocitina; posteriormente interviene la biotinidasa que corta específicamente la unión del residuo amino y biotina, dejándola libre para ser reutilizada (Fig. 3).

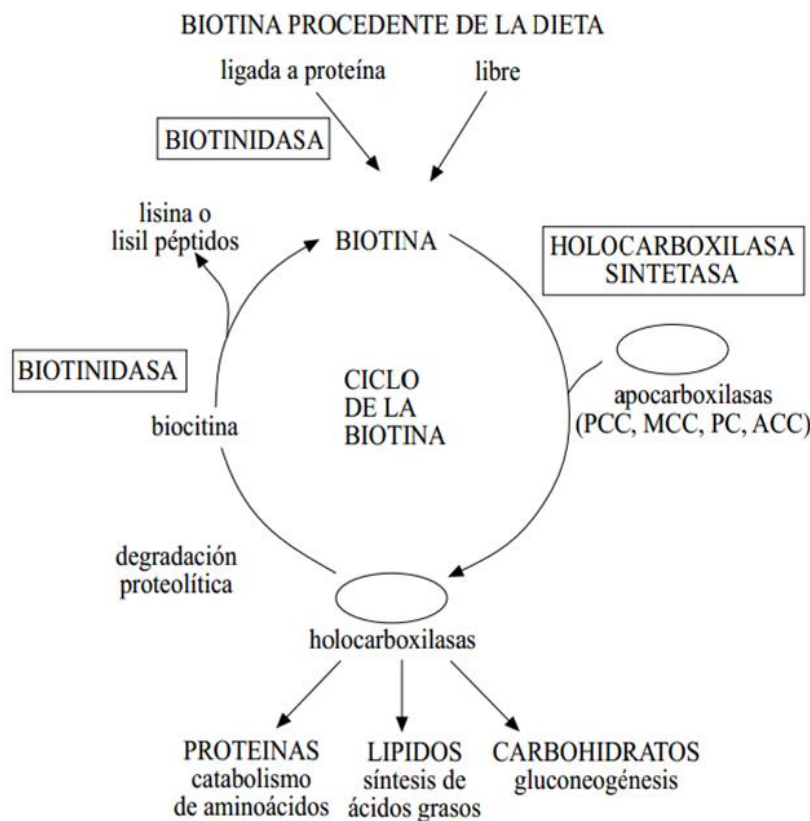


Fig. 3. Ciclo de la biotina e intervención de las holocarboxilasas, que juegan un papel muy importante en el metabolismo de proteínas, lípidos y carbohidratos. PCC- Propionil CoA carboxilasa, MCC- Metilcrotonil CoA carboxilasa, PC- Piruvato carboxilasa, ACC- Acetil CoA carboxilasa. (Tomado de Rodríguez, 2000).

I.1.3 Función de las carboxilasas dependientes de la biotina en mamíferos.

Las carboxilasas dependientes de la biotina conocidas en los mamíferos son cinco: la acetil-CoA carboxilasa 1 o alfa (ACC_1), la acetil CoA carboxilasa 2 o beta (ACC_2), piruvato carboxilasa (PC), propionil CoA carboxilasa (PCC) y la metilcrotonil CoA carboxilasa. La ACC_1 y ACC_2 , codificadas por diferentes genes, en su forma madura están compuestas por un polipéptido, que tienen como función catalizar la transformación de acetil CoA a malonil CoA (Abu-Elheiga *et al.*, 1995). La ACC_1 se encuentra en el citoplasma de las células en los tejidos lipogénicos como el hígado y el tejido adiposo de los mamíferos. La ACC_2 se encuentra en la mitocondria, preferentemente del músculo esquelético y el corazón, participa en el catabolismo de ácidos grasos (Choi *et al.*, 2007) y se ha propuesto como un reservorio de la biotina (Shriver *et al.*, 1993). La diferencia entre estas enzimas es su regulación transcripcional, ya que ACC_1 lo realiza por nutrientes como la glucosa y la insulina, mientras que la ACC_2 está regulada por factores específicos como proteína de regulación miogénica (MyoD), como lo reportó Lee *et al* en 2001. La piruvato carboxilasa, se encuentra en la mitocondria y convierte al piruvato a oxalacetato como acción fundamental en la gluconeogénesis y la anaplerosis del ácido tricarbóxico. La estructura de la piruvato carboxilasa se compone de cuatro subunidades idénticas de 130 KDa dispuestos en una estructura de tetraedro (Jitrapakdee *et al.*, 2008). La propionil CoA carboxilasa, es una enzima mitocondrial formada por dos polipéptidos diferentes, el alfa y beta, la subunidad alfa es la que tiene unida la molécula de biotina (Browner *et al.*, 1989), participa en el catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada y ácidos grasos, también puede darse la transformación de propionil CoA en metilmalonil CoA (Pacheco-Álvarez *et al.*, 2002). La enzima metilcrotonil CoA carboxilasa, se localiza en la mitocondria, está compuesta por dos subunidades alfa y beta, actúa en el catabolismo de la leucina y el metabolismo de isoprenoides (McKean *et al.*, 2000).

I.1.4 Efectos farmacológicos de la biotina.

Independientemente de su función como cofactor de las carboxilasas, en concentraciones farmacológicas (alrededor de 1-50 mg), esto es de 30-650 veces su

requerimiento diario se ha encontrado que modifica diversas funciones biológicas como el desarrollo embrionario (Paul *et al.*, 1973; Bergsten *et al.*, 2003), la reproducción (Paul & Duttagupta, 1976; Simmins & Brooks, 1983; Baez-Saldaña *et al.*, 2009), la función inmune (Zempleni, 2001; Kuroishi, 2015), la homeostasis de la glucosa y de los lípidos. Este efecto se encuentra asociado a cambios en la expresión de genes tanto al nivel transcripcional, traduccional y post-traduccional (Revisado en: Riverón-Negrete, Fernández-Mejía, 2017).

I.1.5 Efectos farmacológicos de la biotina sobre el metabolismo de los lípidos.

Se ha reportado que el tratamiento con dosis farmacológicas de la biotina disminuye las concentraciones de triglicéridos y colesterol. Estudios efectuados en 1960 por Steigerwal y Boheler, encontraron que 30 minutos después de la inyección de 10 mg de biotina en adultos sanos se produjo un decremento en la concentración de lípidos séricos totales. En otro estudio, la administración de 5 mg de biotina durante 4 semanas en pacientes con aterosclerosis e hipercolesterolemia, produjo una disminución en las concentraciones de colesterol total (Dukusova & Krivoruchenko, 1972). En voluntarios sanos se encontró que la administración de 0.9 mg/día de biotina modificó los niveles de lípidos plasmáticos (Marshall *et al.*, 1980). En nuestro laboratorio encontramos que en pacientes diabéticos y no diabéticos con hipertrigliceridemia, el tratamiento con 5mg de biotina tres veces al día disminuyó las concentraciones de triglicéridos sanguíneos y de las lipoproteínas de muy baja densidad (Revilla *et al.*, 2006).

En estudios con animales de experimentación también se encontró que la biotina modifica la hiperlipidemia. En la cepa de ratas bureau of home economics (BHE) con predisposición genética para desarrollar elevadas concentraciones sanguíneas de glucosa y lípidos (Marshall *et al.*, 1969), el tratamiento con biotina disminuyó las concentraciones de lípidos séricos (Marshall *et al.*, 1976). Estudios en nuestro laboratorio encontraron que en ratones sanos la administración de una dieta durante 8 semanas con 56 veces el contenido de una dieta control, disminuyó los niveles séricos e intrahepáticos de triglicéridos (Larrieta *et al.*, 2010, Aguilera-Méndez & Fernández-Mejía, 2012). Esta disminución se encontró asociada con una menor expresión del

ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de enzimas y factores transcripcionales lipogénicos. En el tejido adiposo, la abundancia del ARNm de los factores transcripcionales: proteína de unión a elementos de respuesta a esteroides 1 (SREBP-1c), factor crítico en la expresión de genes lipogénicos, así como la expresión del receptor de peroxisoma proliferador activado gamma (PPAR- γ) disminuyeron en el grupo que fue alimentado con la dieta rica en biotina. De acuerdo con la disminución del mensajero de SREBP-1c, la expresión del ARN mensajero de enzimas reguladas por éste: acetil CoA carboxilasa 1, ácido graso sintasa, estearil CoA desaturasa 1 y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa fue menor que lo observado en los ratones control. En el hígado de los ratones suplementados con biotina, se observó una menor abundancia del ARNm de SREBP-1c y del transportador de glucosa GLUT2, así como de las enzimas acetil CoA carboxilasa 1, ácido graso sintasa y piruvato cinasa; pero no en el ARNm de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, enzima en la que encontramos un aumento en la abundancia de su ARN mensajero y cuya transcripción participa SREBP-1c (Larrieta *et al.*, 2010). Esta discordancia podría deberse a que la enzima, también participa en otros procesos biológicos como la protección al estrés oxidante, el crecimiento y por ende es regulada por otras hormonas y factores (Coleman & Lee 2004; Nguyeh *et al.*, 2008) además de SREBP-1c. En otros estudios de nuestro grupo en un modelo de ratas hipertriglicéridémicas encontraron que la inyección durante 28 días de concentraciones farmacológicas de biotina (2mg/ kg de peso) disminuyó las concentraciones séricas de triglicéridos y la expresión de genes lipogénicos en el tejido adiposo (Vital *et al.*, 2006). El papel protagónico que tiene la lipogénesis en el desarrollo de la obesidad y resistencia a la insulina realza la importancia de este efecto de la biotina.

I.1.6 Efectos farmacológicos de la biotina sobre el metabolismo de la glucosa.

Diversos estudios han encontrado que la administración de dosis farmacológicas de biotina disminuye la hiperglucemia tanto en pacientes (Coggeshall *et al.*, 1985; Maebashi *et al.*, 1993; Koutsikos *et al.*, 1996) como en modelos animales con diabetes (Reddi *et al.*, 1988; Zhang *et al.*, 1996, 1997). En pacientes con diabetes tipo 1 sin administración de insulina exógena, la administración de 16 mg/día de biotina durante

una semana, produjo una disminución significativa de la glucosa sanguínea (Coggeshall, *et al.*, 1985). Estudios en pacientes con diabetes tipo 2, que se les suministro oralmente 9 mg/día de biotina durante un mes, los resultados mencionan que se mejoró la tolerancia a la glucosa y disminuyó la hiperglucemia en ayuno (Maebashi *et al.*, 1993). En pacientes bajo hemodiálisis, la administración de 50 mg/día de biotina durante 2 meses logró mejorar la tolerancia a la glucosa (Koutsikos, 1996). En contraste en nuestro laboratorio encontramos que, en pacientes con diabetes tipo 2 con hiperglucemia moderada, el consumo de cápsulas conteniendo 5 mg de biotina, tres veces al día (15 mg/día) durante 28 días no produjo cambios en las concentraciones de glucosa en ayuno (Baez-Saldaña *et al.*, 2004; Revilla-Monsalve *et al.*, 2006).

En modelos animales, Reddi *et al.*, en 1988 reportaron que en ratones de la cepa KK, los cuales se caracterizan por presentar resistencia a la insulina, la administración de 2 mg de biotina/kg de peso durante 10 semanas disminuyó los niveles de glucosa post-pandrial y la resistencia a la insulina. En ratas Otsuka Long Evans Tokushima Fatty (OLETF) con diabetes tipo-2, la administración biotina de 1-4 mg/ kg de peso corrigió la intolerancia a la glucosa, mejoró la hiperinsulinemia y disminuyó el peso corporal (Zhang *et al.*, 1996).

En islotes pancreáticos, estudios realizados por nosotros y otros autores, han encontrado que *in vitro* la biotina aumenta la secreción de insulina (Borboni *et al.*, 1996; Romero-Navarro *et al.*, 1999; Yoshikawa *et al.*, 2002; Vilches-Flores *et al.*, 2010). Recientemente, en estudios *in vivo* nuestro grupo (Lazo de la Vega *et al.*, 2013) encontró que la suplementación de biotina en la dieta incrementó la secreción de insulina y aumentó la expresión de genes que regulan su producción y secreción, como son los factores transcripcionales Foxa2, Pdx1 y Hnf4a, la glucocinasa, el canal de calcio Cacna1d, la acetil-CoA carboxilasa-1 y la insulina.

Con base en las evidencias de que la biotina tiene efectos favorables sobre la homeostasis de la glucosa y de los lípidos, existen productos comerciales que contienen biotina y son recomendados para el tratamiento del síndrome metabólico y diabetes tipo-2 (Fuhr *et al.*, 2005; Albarracin *et al.*, 2005, 2007; Singer & Geohas 2009;

Geohas *et al.*, 2007). Estos productos contienen concentraciones de biotina que representan de 40 a 166 veces más la ingesta diaria recomendada por la Food and Nutrition Board en 1998, que es de 30 µg. Sin embargo, existen pocos estudios analizando las acciones tóxicas que podría tener la biotina a estas concentraciones (Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes and its Panel on Folate, Other B Vitamins, and Choline and Sub comite on Upper Reference Levels of Nutrients Food and Nutrition board, Institute of Medicine 2000; Fiume, 2001).

I.1.7 Efectos tóxicos de la biotina.

En humanos la biotina ha sido administrada en un rango de 0.25 a 50 mg hasta por 40 días, de manera oral, intramuscular e intravenosa en niños, pacientes con diabetes tipo 1 o 2 o individuos sanos sin mostrarse efectos sintomáticos adversos (Dukusova & Krivoruchenko, 1972; Hayes *et al.*, 1984; Revilla-Monsalve *et al.*, 2006; Hemmati *et al.*, 2013). En roedores, con tratamientos a corto plazo no encontraron toxicidad en dosis de 353 mg/kg peso, pero estos reportes no otorgaron detalles del procedimiento usado (Heyes, 1984). En la prueba de Ames en donde ocuparon cepas de *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*, se encontró que la vitamina presentó efectos mutagénicos hasta los 10 mg/placa (SRI-International, 1979). En un estudio reciente Ronquillo *et al.*, en 2013 analizaron el efecto de la vitamina sobre las subfamilias del citocromo P450 CYP1A1 y CYP1A2, cuya función es metabolizar compuestos endógenos y xenobióticos, los resultados indicaron que en ratas la administración intraperitoneal diaria de 2 mg/kg, aumentó únicamente en el primer día el RNAm de estas enzimas, sin embargo no se modificó los niveles de su proteína ni su actividad durante 1, 3, 5 ó 7 días de estudio.

Las dosis letales al 50% (LD₅₀) orales e intra-peritoneales reportadas para ratas son de 354 y 29 mg/kg de peso corporal (Bonjour, 1991). Para los ratones la LD₅₀ intravenosa es de 1000 mg/kg de peso corporal (Bonjour, 1991). Sawamura *et al* 2015, encontraron que ratas de 3 semanas de edad alimentadas con dietas conteniendo 1,000 a 10,000 mg biotin/kg no afectó la ingesta de alimento ni parámetros como la creatinina, urea, alanina aminotransferasa, y aspartato aminotransferasa, pero 100,000 mg /kg de biotina

en la dieta afectó la ganancia de peso, la ingesta de alimento, el peso del hígado y el riñón.

I.1.8 Efectos farmacológicos de la biotina sobre la morfología tisular.

Estudios en nuestro laboratorio han encontrado que concentraciones farmacológicas de biotina modifican la estructura de diferentes tejidos. En ratones, la administración durante 8 semanas de una dieta conteniendo 56 veces la cantidad de biotina presente en la dieta control incrementó el tamaño del islote y la masa de las células beta (Lazo de la Vega *et al.*, 2013). La morfología de los islotes se encontró modificada observándose un porcentaje más elevado de islotes con células alfa localizadas hacia el centro del islote con respecto a los controles.

En otro estudio encontramos que esa misma dieta durante 9 semanas produjo cambios en la estructura de los ovarios, decreciendo el número de folículos primarios y de folículos de Graaf (Baez-Saldaña *et al.*, 2009). El tratamiento agudo con biotina indujo atrofia en el cuerpo lúteo en ratas (Paul *et al.*, 1973).

En modelos de animales con diabetes la suplementación con biotina mejoró la morfología histopatológica del hígado (Aldahmash *et al.*, 2016), riñón (Aldahmash *et al.*, 2015) y páncreas (Sahin *et al.*, 2013). En ratas a las que se les administró durante 12 días consecutivos 5 mg de biotina/ kg de peso previos a la inducción de diabetes con estreptozotocina, Sahín y colaboradores encontraron que en el riñón disminuyó el número de glomérulos distorcionados, células inflamadas y macrófagos gigantes, presentes en las ratas diabéticas a las cuales no se les administró la vitamina previamente. En el páncreas de los animales a los cuales se les administró biotina se revirtieron los daños producidos por la estreptozotocina, observándose una mejoría en la arquitectura del islote con respecto a las células alfa y beta y la ausencia de necrosis (Sahin *et al.*, 2013).

En el hígado se notó un marcado decrecimiento de la dilatación de la vena porta, infiltración de leucocitos y disminución de la esteatosis (Aldahmash *et al.*, 2016).

I.2 HÍGADO

I.2.1 Anatomía del hígado.

El hígado es un órgano con múltiples funciones vitales para el organismo. En el humano tiene un peso medio de 1500 gramos y se encuentra situado en la parte superior derecha del abdomen, debajo del diafragma.

El hígado está formado por lóbulos, cada uno constituye una masa de células hepáticas, que tradicionalmente para su estudio, se divide en una unidad estructural y funcional llamada acino (Fig. 4), este está delimitado por la ubicación de los vasos sanguíneos y la dirección del flujo sanguíneo.

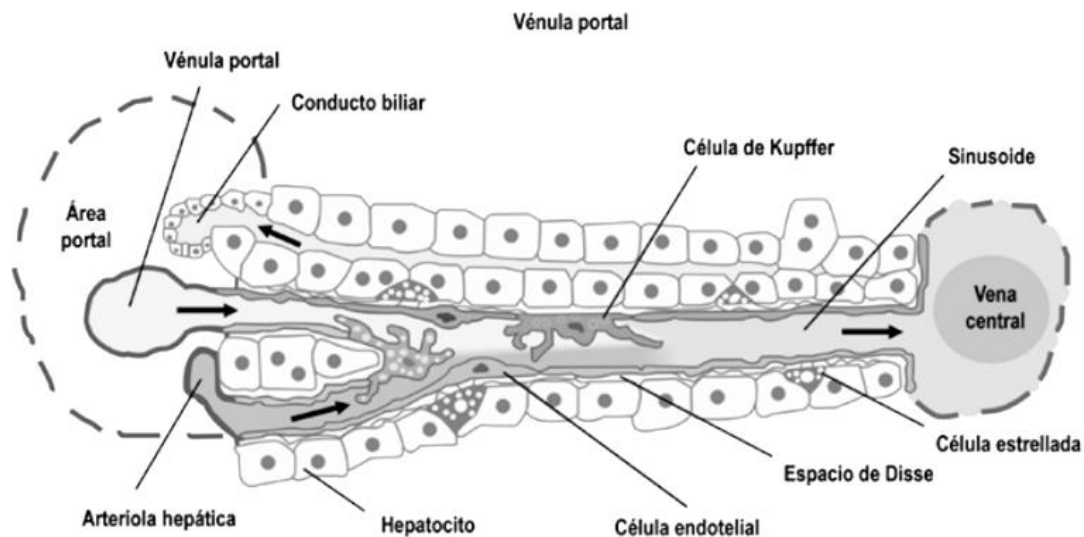


Fig. 4. Esquema de un acino, unidad estructural y funcional del hígado, con sus estructuras, células que lo constituyen, dirección de la sangre y dirección de circulación de la bilis (Tomado de Baialardo, 2015).

El lóbulo individual del hígado es subdividido en periportal y perivenoso; presenta una sección hexagonal y un contorno llamado lobulillo hepático, cada lobulillo contiene: una estructura fibrilar que le sirve de armazón; hepatocitos en laminillas de una o dos células de espesor, que constituyen aproximadamente el 60% de todas las células del hígado y 90% de la masa celular hepática (Celto *et al.*, 2010). El otro 40% son

diferentes células como las de Kupffer que forman parte del sistema inmunitario; con funciones como la fagocitosis de agentes infecciosos y síntesis de citocinas. Los capilares biliares, por donde se transporta la bilis secretada por los hepatocitos. Los sinusoides, son los espacios que separan las distintas láminas de los hepatocitos, ocupan el 6-8 % de la superficie endotelial, realizan endocitosis, intervienen en la síntesis de la matriz extracelular, sintetizan interleucinas 1 y 6, prostaciclina y prostaglandinas; el espacio de Disse, que se encuentra entre los sinusoides y la membrana de los hepatocitos (Baialardo, 2015), a través de ellos produce un intercambio entre la sangre y los hepatocitos (Fig. 5).

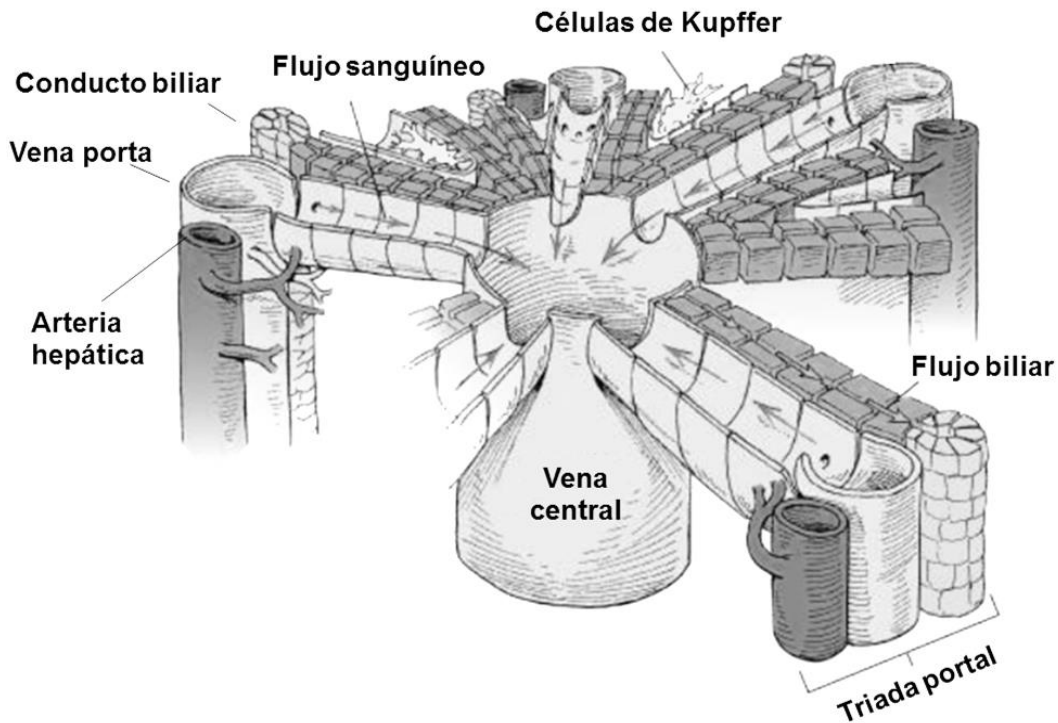


Fig. 5. Estructura tridimensional que nos indica la orientación que presenta la triada portal compuesta por el conducto biliar, vena porta y arteria hepática (Lippincott y Wilkins, 2003).

Los hepatocitos tienen una forma poliédrica de aproximadamente 30 μm de diámetro, se disponen en láminas de manera radiada entre el espacio porta y las venas centrales (Fig. 6), poseen una vida media que va de los 200-400 días, la cual cambia drásticamente, cuando hay un daño causado por una patología, reacciones hepatotóxicas, tratamiento agudo o quirúrgico, cualquiera de las causas anteriores lesiona del 10-20% del parénquima, ocasionando un incremento en su proliferación celular para compensar el daño que está presentando el órgano (Lorenti, 2001).

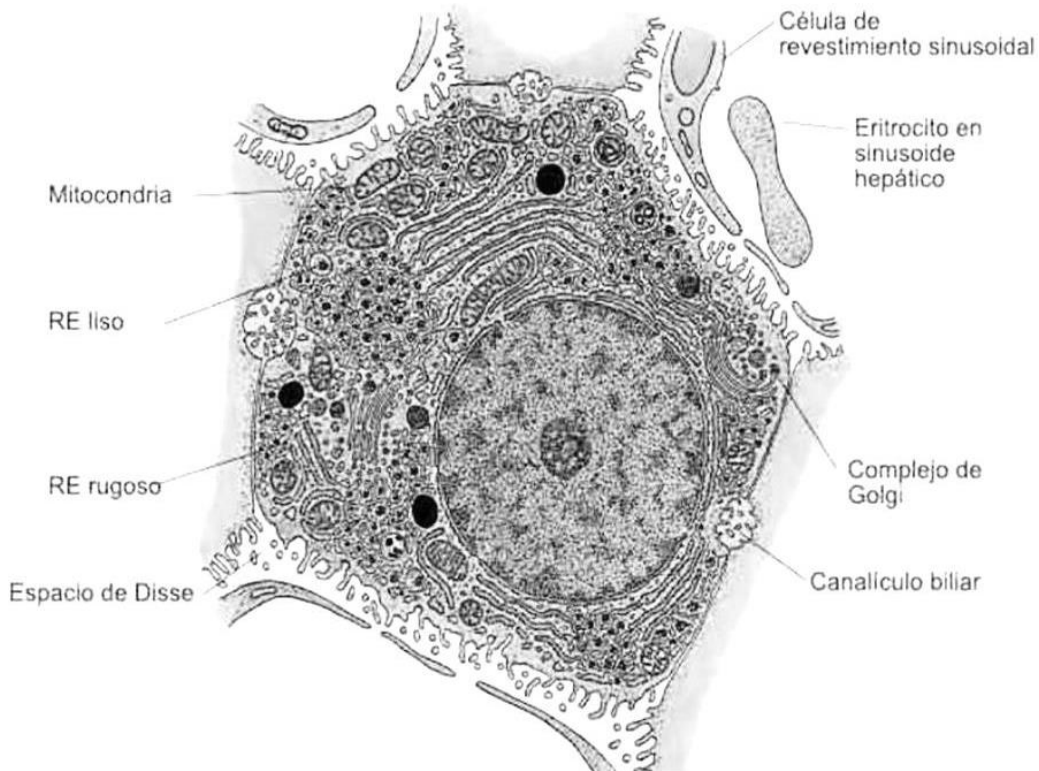


Fig. 6. Morfología del hepatocito, el cual constituye el 90% de la masa celular hepática.

I.2.2 Funciones hepáticas.

El hígado tiene múltiples funciones, entre ellas se encuentra la secreción de bilis, la cual es esencial para la digestión de las grasas. Otras funciones importantes son el catabolismo de proteínas y la síntesis de urea, la síntesis de proteínas plasmáticas, la función detoxificante, el almacenamiento de vitaminas y glucógeno. La ausencia del hígado o su falta de funcionamiento es incompatible con la vida.

I.2.3 Función excretora de la bilis.

La bilirrubina es un pigmento biliar de color amarillo-anaranjado que resulta del catabolismo de la hemoglobina, mioglobina o citocromos, proviene el 85% de la destrucción fisiológica de los eritrocitos del sistema reticuloendotelial. La mayor parte de la bilirrubina es transportada por la albúmina (conjugada) y solo una pequeña fracción circula libre (no conjugada), para posteriormente pasar al hígado, conjugarse y formar la bilirrubina hidrosoluble esterificada (directa o conjugada), tomada por los lisosomas y el aparato de Golgi, se excreta en los canalículos biliares, pasa a la vesícula biliar y al intestino delgado. La bilirrubina que llega al duodeno y circulación enterohepática un 90% aproximadamente vuelve al hígado y reinicia su ciclo al intestino, el 10% restante, se excreta en orina. Cuando hay un daño, las concentraciones de la bilirrubina directa e indirecta se incrementan e indica una obstrucción biliar que podría desencadenar en una ictericia, necrosis o colestasis (Johnston, 1999; Dufour *et al.*, 2000) Dicha degradación se produce en el bazo. Más tarde la bilirrubina se conjuga en el hígado. Estos pigmentos se almacenan en la vesícula biliar formando parte de la bilis (que luego es excretada hacia el duodeno, lo que da el color a las heces).

La bilis es necesaria para la digestión de los alimentos, contiene sales biliares formadas por el hígado a partir del ácido glicocólico y ácido taurocólico que a su vez derivan de la molécula de colesterol. La bilis es excretada hacia la vía biliar y se almacena en la vesícula biliar de donde se expulsa al duodeno cuando se ingieren alimentos. Gracias a la bilis es posible la absorción de las grasas contenidas en los alimentos.

I.2.4 Catabolismo de proteínas en el hígado.

El hígado desempeña un papel muy importante en el metabolismo de los aminoácidos, ya que es el encargado de producir urea como producto de su desaminación. La orina representa la principal vía de excreción de la urea. La elevación de sus valores en suero nos indica una alimentación con alto contenido proteico o daño renal, por el contrario, si los rangos están por debajo de lo normal y el individuo no se encuentra desnutrido, nos indica una insuficiencia hepática. Para corroborar dicho diagnóstico es importante determinar la concentración de albúmina, la cual es sintetizada en las células hepáticas y se encuentra en el suero entre un 50- 65% de entre las proteínas totales, es la proteína más abundante en plasma y un indicador importante en la actividad sintética del hígado, una disminución de albúmina en el suero, se observa cuando hay destrucción masiva del tejido hepático y es uno de los principales factores pronósticos de la cirrosis (Duford *et al.*, 2000; Desmont, 2002).

I.2.5 Función detoxificante del hígado.

El hígado es considerado el tejido detoxificador por excelencia. Su alta capacidad metabólica, su comunicación sanguínea con el intestino mediante la vena porta facilita la protección a otros órganos.

Existen dos fases de biotransformación en el hígado. En la fase I se produce una modificación del xenobiótico por oxidación, reducción o hidrólisis, formando grupos polares, hasta lograr la hidrosolubilidad que facilite su excreción. En la fase II, puede ser un xenobiótico o un metabolito de la fase I, que se conjuga con una sustancia endógena y facilita su transporte en el organismo y su excreción como se ve en la Fig. 7 (Bandrés & Arribas, 2015).

Para conocer y determinar la existencia de daño en la función del hígado, es necesario realizar una serie de pruebas bioquímicas clínicas, que nos permitan conocer la integridad del hepatocito, la función excretora de la bilis, la síntesis y catabolismo de las proteínas, mediante la medición de diferentes marcadores en el suero que proviene del torrente sanguíneo.

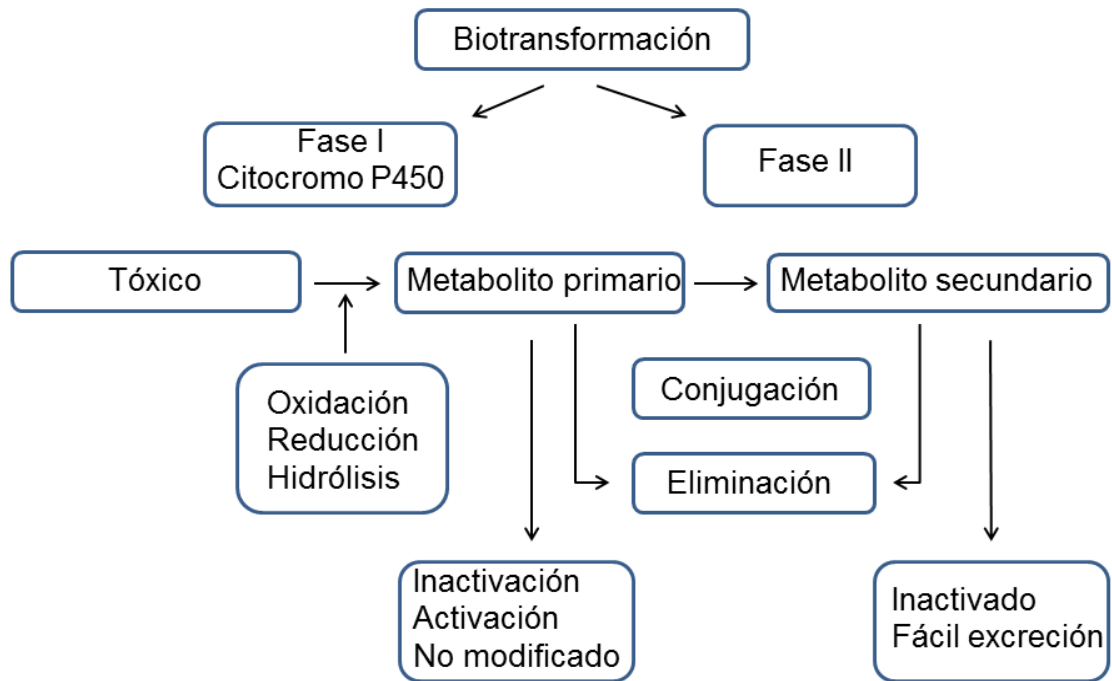


Fig. 7. Reacciones de biotransformación de los xenobióticos para ser eliminados del organismo con mayor facilidad (tomado de Bandrés, 2015).

I.2.6 Pruebas de integridad y funcionamiento hepático.

Entre las determinaciones más importantes se encuentran las enzimas transaminasas que se encuentran en altas concentraciones en el citoplasma de los hepatocitos, donde catalizan la transferencia de los grupos amino para producir ácido pirúvico y oxalacético, cuando se presenta un daño en la membrana, estas enzimas pasan al plasma aumentando su concentración en la circulación sanguínea. En este grupo se encuentra la aspartato aminotransferasa, que es sensible, pero poco específica; cuando incrementa su actividad, se debe realizar simultáneamente la determinación de la alanino aminotransferasa, para corroborar el resultado, si ambas están incrementadas nos indica que hay necrosis hepatocelular. La prueba de AST no es confiable si se realiza de manera aislada, ya que también está involucrada en enfermedades

extrahepáticas como la cardiopatía, las relacionadas con el músculo estriado, páncreas y pulmones (Desmont, 2002; Gianinni *et al.*, 2002).

La enzima fosfatasa alcalina, se encuentra distribuida en el hueso, intestino, placenta e hígado, en este último se encuentra en la superficie canalicular, si los valores están incrementados en el suero, indica una disfunción biliar. Sin embargo esta prueba debe ir acompañada de la γ -glutamyl transferasa, que regula el transporte de aminoácidos a través de las membranas celulares al catalizar la transferencia de un grupo glutamil a los aminoácidos libres, efecto casi exclusivo del hígado, además es sensible para detectar un daño hepatobiliar, por lo tanto sirve para corroborar la elevación de la fosfatasa alcalina e indica la presencia de cualquier tipo o forma de obstrucción biliar, dada por un compuesto hepatotóxico o colestasis (Pérez *et al.*, 2013).

1.2.7 Estrés oxidante en el hígado.

La oxidación, está catalizada por hidrolasas dependientes de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), ubicadas en el retículo endoplásmico liso, que incrementa la actividad del citocromo P-450. La respuesta de los hepatocitos es la formación de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) y Especies Reactivas de Nitrógeno (RNS), principalmente en los complejos I y III de la cadena respiratoria localizados en la mitocondria (Singal *et al.*, 2011).

Estas especies pueden convertirse en productos negativos para el metabolismo celular, ya que si se pierde el equilibrio entre los compuestos prooxidantes y los antioxidantes se genera el estrés oxidante, que se caracteriza por un desequilibrio entre la generación y eliminación de las ROS y puede llegar a causar daños a nivel celular como es la lipoperoxidación, alterar los grupos sulfhidrilo (SH) de las proteínas, bases púricas y pirimidicas, considerado como las primeras etapas para el desarrollo de patologías (Corrales & Muñoz, 2012). Las especies reactivas de oxígeno que se forman son el anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$), el radical más abundante, en la cadena de transporte de electrones por reacciones de autooxidación, al igual que los peroxinitritos (ONOO-) y peróxido de oxígeno (H_2O_2), lo que conlleva a la oxidación de proteínas, liberación del citocromo C al citoplasma e inicio de la apoptosis celular; el radical

hidroxilo (OH), posee una alta reactividad, debido a que reacciona de manera inespecífica con el ácido desoxirribonucleico (DNA), proteínas, lípidos y carbohidratos, esto se debe a que las células no cuentan con un sistema enzimático contra este radical; el óxido nítrico (NO), presenta un electrón impar y puede reaccionar con el anión superóxido, dando como resultado al peroxinitrito. En condiciones fisiológicas, los organismos poseen sistemas de defensa tanto enzimáticos, como no enzimáticos, que actúan conjuntamente para proteger a la célula y neutralizar a las especies reactivas. En el sistema enzimático se encuentra la superóxido dismutasa (SOD), es la primera que se activa, cataliza la conversión de los radicales anión superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno (Mates, 2000). Cualquier célula que utilice oxígeno tiene la capacidad de producir anión superóxido y tener la superóxido dismutasa (Fridovich, 1974). Hay isoformas como la SOD cobre-zinc superóxido dismutasa (Cu Zn SOD), localizadas en el citoplasma y espacio extracelular, la manganeso superóxido dismutasa (Mn-SOD), localizada en la matriz mitocondrial. Su acción se basa en que los dos electrones que posee el superóxido, forman dos enlaces covalentes con dos protones donados por una molécula de agua y otro por una histidina, liberándose H_2O_2 , de esta manera la enzima se regenera y mantiene un equilibrio redox. La glutatión peroxidasa (GPx), reduce el H_2O_2 al utilizar como cofactor al selenio y como proveedor de electrones al glutatión reducido (GSH) que interacciona con los peróxidos para transformarlos en agua, durante este proceso el glutatión es oxidado (GSSG), para posteriormente por la acción de la glutatión reductasa (GR), vuelve a su estado reducido. Otra enzima que también neutraliza el efecto del H_2O_2 es la catalasa (CAT), que tiene un grupo hemo en su sitio activo, cataliza la conversión de H_2O_2 en H_2O y oxígeno molecular (Fig. 8).

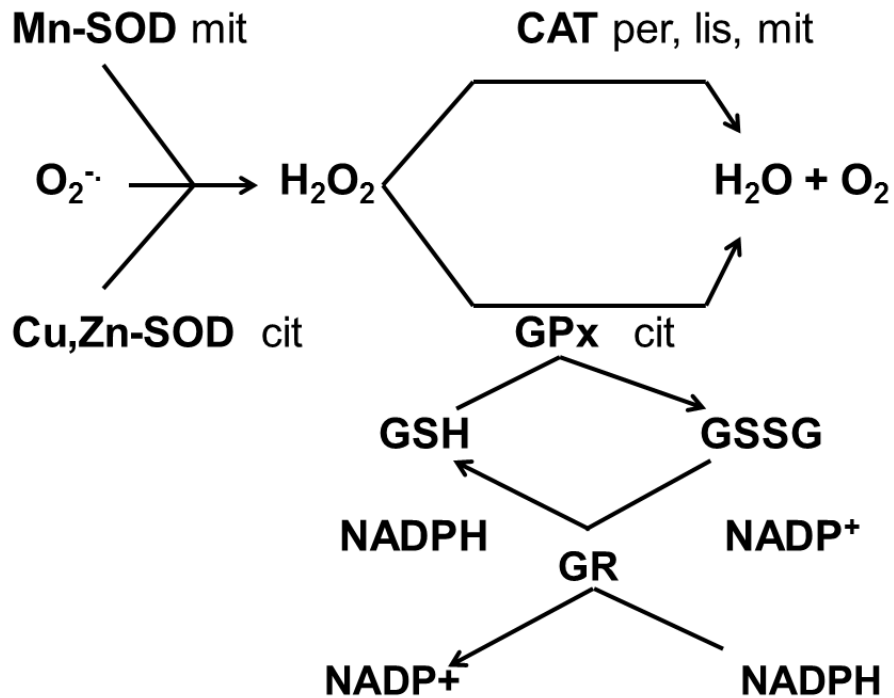


Fig. 8. Esquema general del sistema que se activa como defensa ante las ROS y reacciones que neutralizan su efecto. Mit- mitocondria, per- peroxisoma, lis-lisosoma, cit-citoplasma (Tomado de Soto-Bernardini & Ravetos-Vorst, 2008)

También hay el sistema de defensa no enzimático, el más importante es el glutatión reducido (GSH), su grupo tiol es capaz de donar un electrón, resultando ser muy reactivo y se une fácilmente con otro GSH para formar disulfuro de glutatión (GSSG), esta reacción se produce por la actividad de la glutatión peroxidasa (GPX), posteriormente es regenerado por la acción de la glutatión reductasa (GR), que utiliza la coenzima NADPH como donador de electrones, manteniendo así la proporción GSH/GSSG y manteniendo el equilibrio redox (Fig. 8). Cuando hay una disminución en la proporción de GSSG/GSH se considera que hay estrés oxidante. Cuando hay estrés oxidante, se presenta un desequilibrio entre la formación de ROS y el sistema de defensa antioxidante, provocando daño en lípidos, a este proceso se le llama peroxidación lipídica, entre los daños se encuentra la permeabilidad de la membrana celular y muerte celular. En las proteínas, hay oxidación en aminoácidos como la

fenilalanina, tirosina, histidina y metionina, además se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas y la formación de grupos carbonilos. En el DNA hay la pérdida de expresión o síntesis de una proteína por daño de un gen, modificaciones oxidativas de las bases, se presentan mutaciones, fragmentación de las cadenas dobles del DNA, reordenamientos cromosómicos, dando como resultado daño génico (Chakarov *et al.*, 2014).

I.3 DAÑO GENOTÓXICO

Los daños génicos se hacen más evidentes en las células que proliferan rápidamente, como son las células germinales, epiteliales y de médula ósea, por lo tanto, existe un gran número de células susceptibles a estos efectos. Las mutaciones pueden originarse por errores en la replicación o por reacciones que ocurren como consecuencia de la inestabilidad del DNA o por la acción de subproductos del metabolismo celular, como los mutágenos endógenos o estrés oxidante (Kirkland *et al.*, 2007)

En un estudio realizado con el objetivo de conocer que especie realiza una mayor formación de micronúcleos y poder determinar la frecuencia de eritrocitos micronucleados, se estudiaron 35 especies de mamíferos y se midió el daño genotóxico; los resultados mostraron que las especies con valores más altos son: el ratón con 21.4 ± 6.5 , la jirafa con 18.0 ± 0.0 , el gato siamés con 11.0 ± 0.9 , el gerbo con 9.4 ± 1.3 , el hámster con 6.3 ± 1.0 , la zarigüeya con 7.5 ± 0.0 y el cerdo con 6.9 ± 4.0 (Zúñiga *et al.*, 1996)

Siendo el ratón un modelo de laboratorio muy usado, de fácil reproducción en los bioterios y se recomienda usarlo como un biomarcador de genotóxicos, mediante el conteo de eritrocitos policromáticos y reticulocitos en pruebas a corto plazo y de exposición a genotóxicos (Kishi *et al.*, 1992; Wahnschaffe *et al.*, 2005).

Los micronúcleos se forman durante la transición de metafase/anafase de la mitosis, en la etapa en la que se separan las cromátidas; los mecanismos mejor conocidos para la formación de los micronúcleos son: La pérdida de fragmentos acéntricos; es considerado el mecanismo clásico, porque cualquier fragmento cromosómico que no posea centrómero no podrá integrarse a un núcleo, pues carece del elemento que le permite orientarse en el huso acromático y se caracteriza por el bloqueo de la polimerización de microtúbulos durante la formación del huso mitótico. Después de la telofase, los cromosomas normales, así como los fragmentos que poseen centrómero, dan origen a los núcleos de las células hijas normales; pero los elementos rezagados quedarán incluidos en el citoplasma de las células hijas, esta proporción es la que da origen a uno o varios núcleos secundarios, son más pequeños que el núcleo principal y es por esta razón que se le llama micronúcleo. La pérdida mitótica de cromosomas completos, sucede cuando se daña el funcionamiento del sistema mitótico, en donde el núcleo principal es reemplazado por un grupo de núcleos pequeños, son en general más grandes que el clásico micronúcleo, debido a que los cromosomas completos son los que constituyen a estos (Heddle *et al.*, 1991).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La evidencia de que la vitamina biotina en concentraciones farmacológicas tiene efectos favorables sobre la homeostasis de la glucosa y de los triglicéridos permite proponer su uso para el tratamiento de dislipidemias, intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2. La pregunta que surge es si los efectos benéficos encontrados en concentraciones farmacológicas no producen concomitantemente efectos tóxicos y cambios en la morfología tisular hepática, dos aspectos que han sido poco estudiados. Este trabajo propone analizar los efectos que producen concentraciones farmacológicas de esta vitamina sobre diversos marcadores de toxicidad y la histomorfología del hígado, en un modelo animal donde ya se han reportado efectos favorables del metabolismo de la glucosa y lípidos.

III. HIPOTESIS

La biotina en concentraciones farmacológicas puede modificar la morfología del hígado y como consecuencia producir daño hepático.

IV. OBJETIVO GENERAL

Analizar los efectos de la suplementación con biotina en la dieta en marcadores de toxicidad hepáticos y sobre cambios morfológicos del hígado.

IV.1 Objetivos específicos.

Analizar el efecto que produce la suplementación de biotina en una dieta de 8 semanas sobre:

- Marcadores de toxicidad hepática sérica.
- Actividad de la superóxido dismutasa, catalasa; la concentración de glutatión reducido, oxidado y óxido nítrico en el hígado.
- La histomorfología del hígado
- El daño genotóxico en médula ósea.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

V.1. Diseño experimental.

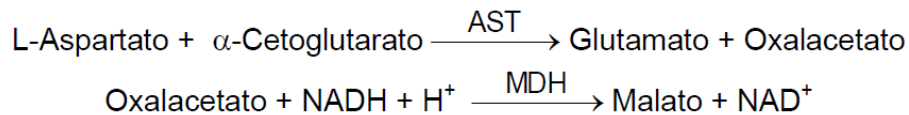
Se utilizó el modelo experimental previamente usado por nuestro grupo, en el cuál la suplementación de biotina en la dieta disminuyó las concentraciones de triacilgliceroles en suero (Larrieta *et al.*, 2010; Aguilera-Méndez 2012) y aumentó la secreción de insulina y la expresión de genes que participan en el mecanismo secretor de la hormona (Lazo-de la Vega *et al.*, 2013). Ratones macho de la cepa BALB/cAnN de tres semanas de edad recién destetados se mantuvieron en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM bajo ciclos de luz-obscuridad de 12 h, con libre acceso a agua y alimento durante todo el periodo experimental, a excepción del ayuno previo a su eutanasia. Los procedimientos fueron aprobados por el comité de Ética y Experimentación del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Los ratones recibieron una dieta control o una dieta suplementada durante ocho semanas. El grupo control recibió una dieta con 1.76 mg de biotina/kg alimento (TD-01362, Harlan Teklad); el grupo suplementado recibió la misma dieta conteniendo 97.7 mg de biotina/kg de alimento (TD-01363, Harlan Teklad). Un tercer grupo se utilizó como control positivo con 5 animales tratados con tetracloruro de carbono (CCl₄) [2ml/kg de peso]. La información completa de la dieta ha sido publicada previamente (Báez-Saldaña *et al.*, 2004). La dieta control proporciona suficiente cantidad de biotina para cubrir las necesidades metabólicas de los ratones, mientras que la dieta suplementada contiene cantidades de biotina de aproximadamente 56 veces más que la concentración del control. El peso corporal y el consumo de alimento se determinaron cada semana. A las ocho semanas de alimentación con las dietas, los ratones se ayunaron por 12 h, se anestesiaron con Sevoflurano (Sevorane) y se les extrajo la sangre, el hígado y los fémures.

V.2 Marcadores de toxicidad hepática sérica.

Para determinar las enzimas de escape indicadoras de daño hepático, la sangre obtenida de cada ratón se centrifugó a 1600 g durante 15 minutos a 4° C y se recuperó el suero, el cual se mantuvo a -72°C hasta su uso.

V.3 Determinación cuantitativa de aspartato aminotransferasa.

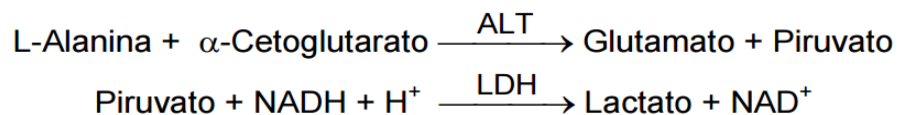
La aspartato aminotransferasa previamente llamada transaminasa glutamato oxaloacética cataliza la transferencia reversible de un grupo amino del aspartato al α -cetoglutarato con formación de glutamato y oxalacetato. El oxalacetato producido es reducido a malato en presencia de malato deshidrogenasa (MDH) y nicotinamina adenina dinucleotido de hidrógeno (NADH) como se muestra en la siguiente reacción :



La velocidad en la que disminuye la concentración de NADH en el medio, que se determina fotométricamente a 340 nm, es proporcional a la concentración catalítica de AST en la muestra. Siguiendo el protocolo del fabricante (Spinreact 41270), se ocupó suero no hemolizado. Los cálculos se realizaron de la siguiente manera: $\Delta\text{Abs} / \text{min} \times 1750 = \text{U/L}$ (cantidad de enzima que convierte 1 μmol de sustrato por minuto, en condiciones estándar y se expresa en unidades por litro)

V. 4 Determinación cuantitativa de alanino aminotransferasa.

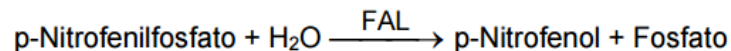
La alanino aminotrasferasa previamente llamada transaminasa glutámico pirúvica (GPT) cataliza la transferencia reversible de un grupo amino de la alanina al α -cetoglutarato con formación de glutamato y piruvato. El piruvato producido es reducido a lactato en presencia de LDH y NADH como se muestra:



La velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio, determinado fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de ALT en la muestra. De acuerdo con el protocolo del fabricante (Spinreact 41280) se ocupó suero no hemolizado, las muestras fueron determinadas cada minuto durante 3 minutos, a 340 nm y temperatura ambiente; los cálculos se realizaron de la siguiente manera: $\Delta\text{Abs}/\text{min} \times 1750 = \text{U/L}$ (cantidad de enzima que convierte 1 μmol de sustrato por minuto, en condiciones estándar y se expresa en unidades por litro).

V. 5 Determinación cuantitativa de fosfatasa alcalina.

La fosfatasa alcalina (FAL) cataliza la hidrólisis del p-nitrofenilfosfato (pNPP) a pH 10.4 liberando p-nitrofenol y fosfato, como la siguiente reacción:

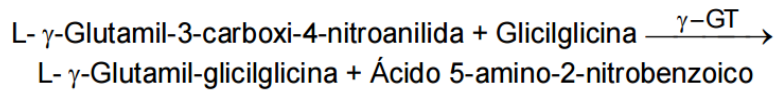


La velocidad de formación del p-Nitrofenol, determinado fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de fosfatasa alcalina en la muestra.

Siguiendo el protocolo del fabricante (Spinreact 1001130), se realizó el estudio en suero no hemolizado. El producto de la reacción fue calculado a 405 nm, a temperatura ambiente; cada minuto durante 3 minutos, los cálculos se realizaron de la siguiente manera: diferencia de $\Delta\text{Abs} / \text{min} \times 3300 = \text{U/L}$ (cantidad de enzima que convierte 1 μmol de sustrato por minuto, en condiciones estándar y se expresa en unidades por litro).

V. 6 Determinación gama glutamiltransferasa.

La gamma-glutamil transferasa cataliza la transferencia de un grupo γ -glutamilo de la γ -glutamil-p-nitroanilida al dipéptido aceptor glicilglicina, como la siguiente reacción:



La velocidad de formación del ácido 5-amino-2-nitrobenzoico, es proporcional a la concentración catalítica de γ -GT en la muestra. Siguiendo el protocolo del fabricante (Spinreact 1001185), se ocupó suero no hemolizado. El producto de la reacción se determinó a 405 nm, a temperatura ambiente cada minuto durante 3 minutos, Los cálculos se realizaron de la siguiente manera: la diferencia por minuto $\Delta\text{Abs} / \text{min} \times 1190 = \text{U/L}$ (cantidad de enzima que convierte 1 μmol de sustrato por minuto, en condiciones estándar y se expresa en unidades por litro).

V. 7 Determinación de bilirrubina.

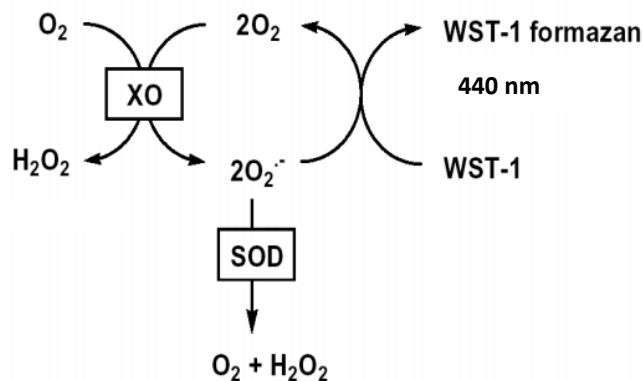
La bilirrubina se convierte en azobilirrubina mediante el ácido diazotado, producto que se determina fotométricamente. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de bilirrubina en la muestra que se analiza. Siguiendo el protocolo del fabricante (Spinreact 1001044), se realizaron las mediciones en suero no hemolizado, las muestras fueron determinados a 555nm, después de incubarlas 5 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C); los datos fueron reportados en $\mu\text{mol/L}$.

V. 8 Determinación cuantitativa de albúmina.

La albúmina se combina con verde de bromocresol a un pH ligeramente ácido, produciendo un cambio de amarillo verdoso a verde azulado, proporcional a la concentración de albúmina presente en la muestra a determinar. Siguiendo el protocolo del fabricante (Spinreact 1001023), se obtuvo el producto de la reacción en suero no hemolizado. Las muestras fueron examinadas a 630nm, previamente incubadas 10 minutos a temperatura ambiente (20-25°C), Los datos fueron reportados en mg/dL.

V. 9 Actividad de superóxido dismutasa.

SOD es una de las enzimas antioxidantes más importantes, cataliza la dismutación del anión superóxido (O_2^-) en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular, la tasa de reducción del oxígeno se relaciona linealmente con la actividad de xantina oxidasa (XO) que es inhibida por SOD. Por lo tanto, la CI_{50} (50% de inhibición de la actividad de SOD) se puede determinar colorimétricamente, es decir, la actividad SOD es la medición de la disminución de desarrollo de color a 440 nm. Como se muestra en el siguiente diagrama:



A partir de 1 μg de proteína de homogenado de hígado, se determinó colorimétricamente la actividad de la enzima SOD, siguiendo el protocolo del fabricante (SIGMA-ALDRICH Co LLC, No de Cat. 19160).

V.10 Actividad enzimática de la catalasa.

Se siguió el protocolo de Goth, 1991; donde la reacción se realiza entre el peróxido de hidrógeno y los iones de molibdato, dando como resultado un complejo estable de color amarillo por una hora. El tejido se llevó en una relación 1:10 peso/volumen, con buffer frío de fosfatos 0.1 M, pH 7.0, posteriormente se centrifugó el homogenado a 12 000 rpm, durante 15 minutos a 4° C, se obtuvo el sobrenadante de donde se tomaron las diluciones para el ensayo. Se incubó durante 30 segundos: 20 μl del homogenado (10 μg de proteína) con 120 μl de H_2O_2 , 12 mM en buffer de fosfatos pH 7.4. La reacción se paró con 120 μl de molibdato de amonio 32.4 mM y se determinaron las muestras a 405 nm.

V. 11 Concentración de glutatión reducido y oxidado.

Inmediatamente de la extracción del hígado estos fueron enjuagados con solución salina isotónica fría para eliminar restos de sangre. Las muestras se trabajaron en frío y fueron tratadas con ácido metafosfórico al 5%, en una relación 1/20 (peso/ volumen), este procedimiento tuvo como fin evitar que las proteínas interfirieran en el ensayo y el tejido sufriera oxidación progresiva. Posteriormente el homogenado se centrifugó a 12 000 rpm, durante 15 minutos a 4° C, se obtuvo el sobrenadante y se tomaron muestras para el ensayo de glutatión total y oxidado (si no se realiza el mismo día puede mantenerse a -80° C). Las muestras que se emplearon para glutatión oxidado fueron tratadas con 4-vinilpiridina 2M e incubadas a temperatura ambiente durante 1 h. Ambas determinaciones contaron con su curva estándar de 5 puntos con diluciones seriadas. Finalmente se determinaron en espectrofotómetro a 405 nm cada minuto durante 20

minutos, los datos se procesaron siguiendo el protocolo del fabricante (Trevigens, No de catálogo 7511-100-K).

V. 12 Concentración de óxido nítrico.

El óxido nítrico es una molécula extremadamente inestable que se une al oxígeno para dar lugar principalmente a sus dos metabolitos estables, los nitritos (NO_2) y nitratos (NO_3), que pueden ser determinados espectrofotométricamente. Este proceso se llevó a cabo mediante dos pasos, el primero fue la conversión de nitrato a nitrito, donde se utilizó la enzima nitrato reductasa, el segundo es la adición del reactivo Griess I, que contenía ácido sulfanílico y formó una sal diazonio, posteriormente se añadió el reactivo Griess II, que contenía alfa-naftilamina y desarrolló un color rosa-purpura, el cual se determinó a una absorbancia de 540 nm. Las pruebas se realizaron en homogenados de hígado, siguiendo el protocolo del fabricante (ThermoScientific No. de lote. PK210737).

V. 13 Daño morfológico.

Una fracción del lóbulo lateral izquierdo del hígado se colocó en formalina amortiguada al 10%, posteriormente se siguió el procedimiento de deshidratación (alcoholes graduados 70, 80, 96 y 100%, xilol-alcohol, relación 1:1 al 100% y xilol 100%), con esto se logró aclarar los tejidos e incluirlos en parafina (58° C), se formaron los bloques que contenían los tejidos, posteriormente fueron cortados con un grosor de 5 micras y colocados 3 cortes por laminilla que contenían polilisina como fijador. Finalmente se tiñeron con hematoxilina-Eosina (HE) y se realizó su análisis histológico en un microscopio óptico (Olympus BX51). Para el conteo de células binucleadas y nucleomegalia se realizó en 3 campos por corte y 6 cortes por cada ratón en un aumento 40X. Para la evaluación histológica del hígado se siguió el criterio de Ezzi L *et al.*, 2016, con la observación de 10 campos por corte y cuatro cortes por ratón en un aumento de 25X. Este criterio considera que una disrupción mínima es aquella que se

presenta en menos de 1% del campo, una disrupción leve de 1%–30% del área; moderada (31%–60%); severa (61%–90%) y muy severa (91%–100%).

V. 14 Daño genotóxico.

Se obtuvieron ambos fémures, que fueron cortados por los extremos proximales, posteriormente con una jeringa de insulina que contenía 500 µl de buffer de fosfatos (PBS) frío pH 7.0 con suero fetal bovino (SFB) al 5%, se extrajo la médula ósea y se vertió en un tubo Eppendorf, el cual se centrifugó a 500 g durante 10 minutos a 4°C, el proceso se realizó dos veces para eliminar el sobrenadante que contenía grasa. El botón formado, se resuspendió en 40 µl de PBS, para disgregar las células, y se añadieron 5 µl en un portaobjetos previamente desengrasado para hacer frotis por triplicado, se mantuvieron 24 h a temperatura ambiente para su secado y posteriormente se fijaron con metanol absoluto durante 10 minutos y tiñeron con Giemsa al 5% (Arencibia *et al.*, 2011). Se contaron al menos 2000 reticulocitos por animal, en un microscopio Olympus BH2 a un aumento de 40X y su confirmación a un aumento 100X, anotando las coordenadas para cada micronúcleo encontrado. La frecuencia de micronúcleos se calculó como el No. de micronúcleos en reticulocitos/2000 x 100, los datos obtenidos se expresaron como frecuencia de micronúcleos (0/00).

V. 15 Estadística.

Se usaron pruebas de ANOVA de una vía y la prueba no paramétrica de Mann-Whitney; considerándose como diferencia significativa una $p \leq 0.05$. Los cálculos se hicieron con el programa GraphPad Prism v 6.0.

VI RESULTADOS

VI. 1 Peso del ratón e ingesta de alimento.

Durante las 8 semanas experimentales se analizó el peso corporal y el consumo de alimento, no encontrándose diferencias entre los grupos. Al término de este periodo el peso corporal fue de 22.3 ± 1.6 g en el grupo control y de 22.6 ± 2.2 g en el grupo suplementado (Fig. 9A). El consumo de alimento diario promedio fue de 3.02 ± 0.48 g para el grupo control y de 3.2 ± 0.33 g para el grupo suplementado con biotina (Fig. 9B).

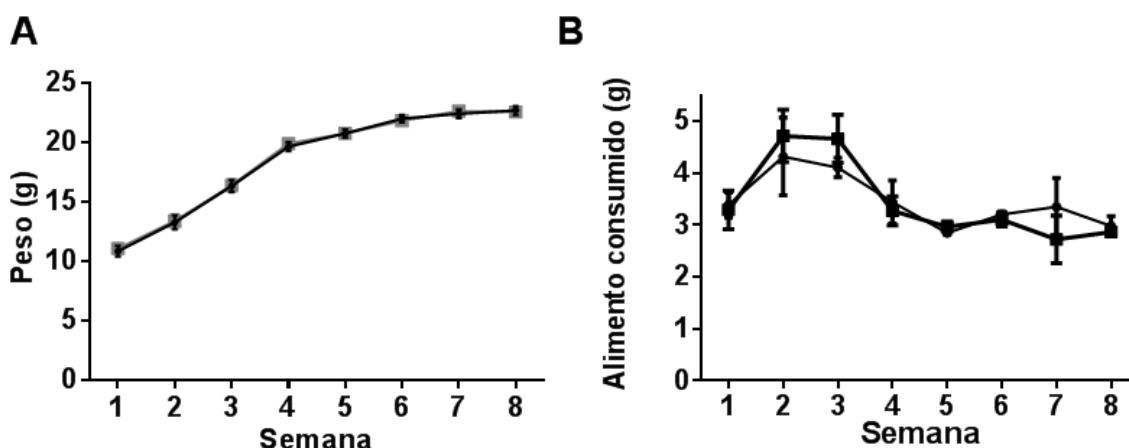


Fig. 9. Promedio del peso de los ratones (A) y alimento (B) consumido diario promedio durante las 8 semanas después del destete (control ■ y suplementado ●).

VI. 2 Marcadores de toxicidad hepática.

Para determinar daño hepático se realizaron una serie de pruebas clásicas, como son la determinación de la actividad en suero de las enzimas de escape aspartato aminotransferasa y la alanino aminotransferasa, las cuales se ilustran en la Figura 10. Ambas enzimas presentaron una actividad en un rango normal (representado en el recuadro punteado negro). Si bien el grupo suplementado con biotina presentó valores de actividad de AST significativamente más altos (* $p < 0.05$) con respecto al control

(control=163±11.0; suplementado=196±8.60 U/L) estos valores se encuentran dentro de los niveles considerados normales.

La actividad de ALT, no mostró diferencias significativas entre los dos grupos (control=32.9±3.29; suplementado=30.2±2.40 U/L). Como control positivo se hicieron experimentos usando el CCl₄, con dosis única de 2ml/kg de peso, en ambas gráficas podemos observar que en este grupo hay un incremento considerable de las enzimas de escape con respecto a los otros dos grupos (AST=954±23.6 U/L; ALT=833±13.2 U/L).

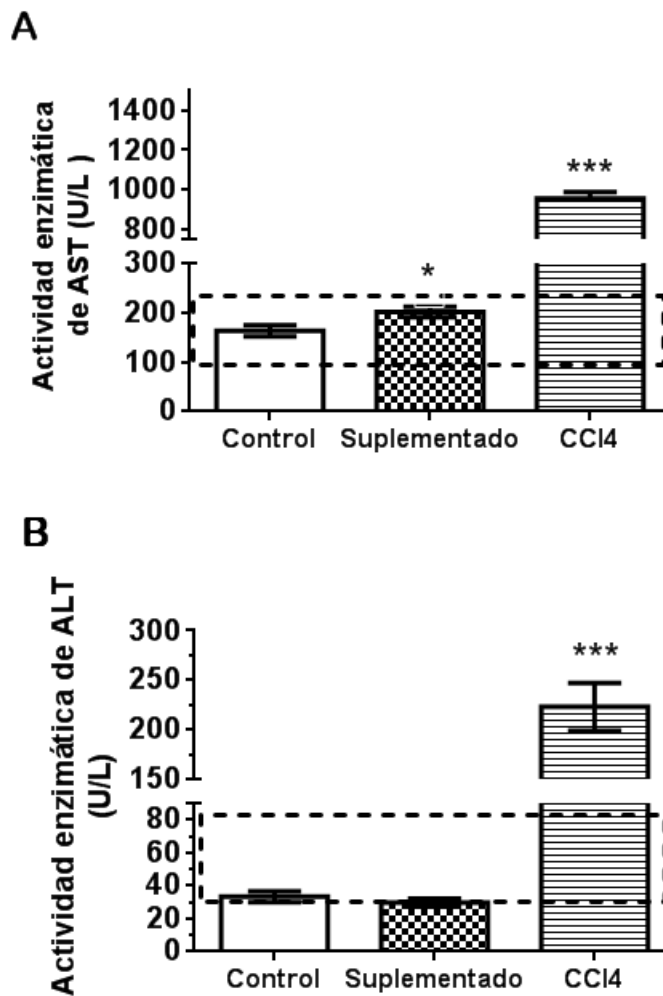


Fig 10. Los valores normales para AST (A) en machos de 9-14 semanas de edad es de 88.9 – 215.8 U/L y el de ALT= 32.2- 80.9 U/L (B), representados en el recuadro (REDEVET, 2011). Los datos representan el promedio ± SEM, ***p<0.001 y una N= 8.

Un incremento de fosfatasa alcalina y la γ - glutamil transferasa en el suero es indicativo de obstrucción biliar. Con el fin de determinar cuál es el efecto de la dieta suplementada con biotina sobre el flujo biliar se analizó la actividad de estas enzimas, como podemos observar en la Fig. 11 los valores obtenidos se encuentran en el rango considerado normal (REDVET, 2011), en tanto que el control positivo de daño hepático con tetracloruro de carbono se observó un incremento significativo.

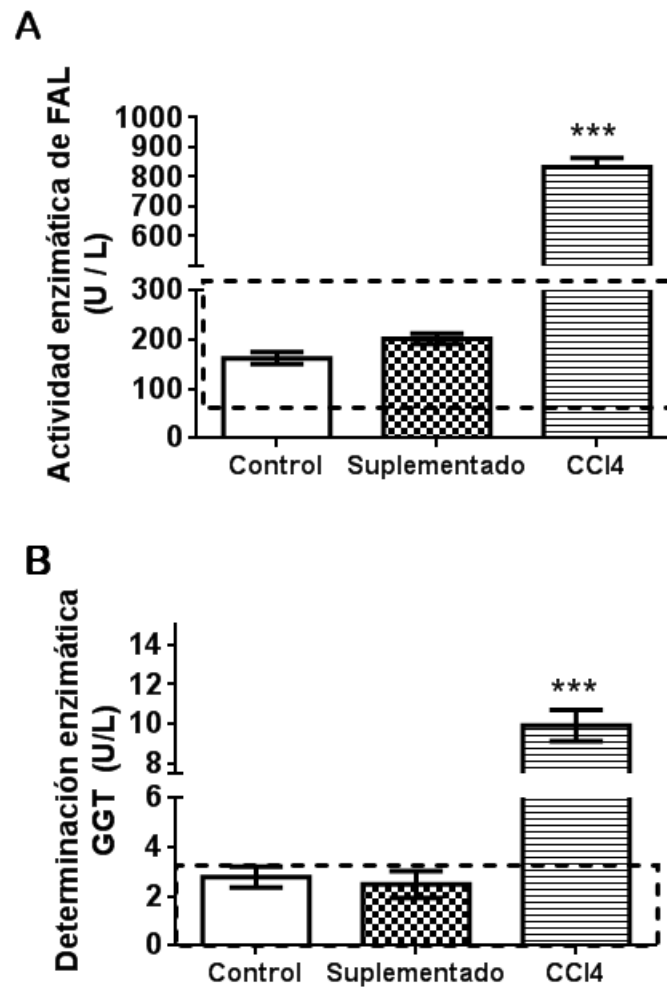


Fig. 11. Determinación de enzimas, que nos indican la integridad del hepatocito y flujo biliar. Los valores normales de FAL son de 85.4 – 311.7 UI/L (A) y para GGT de 0 – 3.0 U/L (B) en ratones macho de 9 a 14 semanas de edad, U/L= enzima que se convierte $1\mu\text{mol}$ de sustrato/minuto en condiciones estándar. Los datos representan el promedio \pm SEM, *** $p < 0.001$ y una N= 7.

La función excretora biliar se analizó por medio de la determinación de bilirrubina sérica, indicativa de la capacidad del hígado para eliminar los grupos hemo y excretarlos en las heces. Como se observa en la Tabla 1, no hubo diferencia significativa en la bilirrubina sérica entre el grupo control y suplementado con biotina, lo que nos indicó que no hay un daño en la excreción biliar. De acuerdo con lo esperado en los animales tratados con tetracloruro de carbono se observó un aumento de los valores séricos de ambas bilirrubinas.

Tabla 1. Valores obtenidos de bilirrubina total e indirecta en los grupos experimentales, los datos representan el promedio \pm SEM, * $p < 0.001$ y una $N = 8$.

Metabolito	Unidades	Control	Biotina	CCl ₄
Bilirrubina Total	[$\mu\text{mol/L}$]	0.30 \pm 0.040	0.22 \pm 0.029	1.22 \pm 0.28
Bilirrubina indirecta	[$\mu\text{mol/L}$]	0.29 \pm 0.071	0.22 \pm 0.020	1.02 \pm 0.1

La albumina es un indicador de la función hepática de síntesis de proteínas. Como podemos observar en la Fig. 12, las concentraciones de albúmina sérica no difieren significativamente entre el grupo suplementado con biotina con respecto al grupo control y se encuentra dentro de los rangos normales.

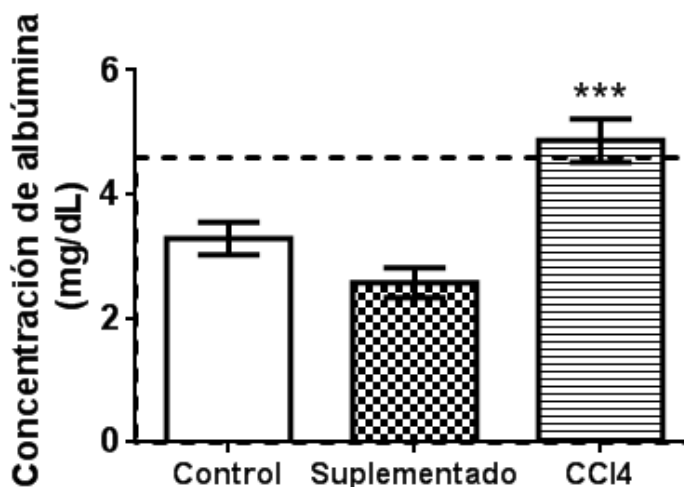


Fig. 12. Concentración de albumina en suero, Los datos representan el promedio \pm SEM, *** $p < 0.001$ y una $N = 9$.

Los niveles de urea se relacionan con la ingesta proteica, la función hepática y el nivel de catabolismo proteico endógeno. El análisis de urea reveló que la administración de la dieta suplementada con biotina durante 8 semanas no produjo cambios significativos en los niveles de este catabolito con respecto al grupo control (Fig. 13), en tanto que los valores de los ratones tratados con tetracloruro de carbono se vieron aumentados.

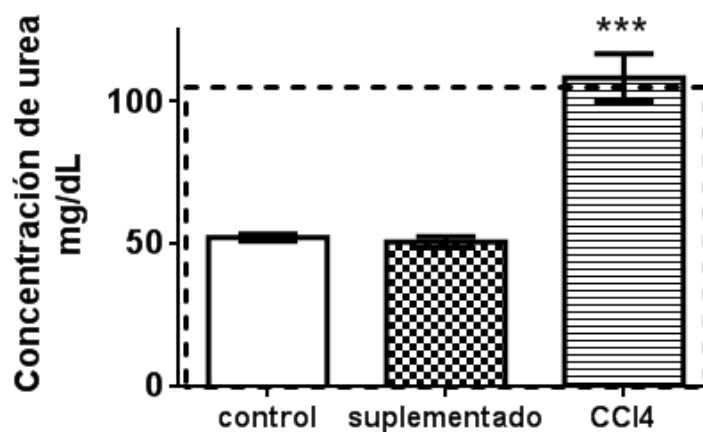


Fig. 13. Determinación de urea en suero de ratones, con el que se puede determinar catabolismo proteico. Los datos representan el promedio \pm SEM, *** p <0.001 y una $N=7$.

VI. 3 Actividad de la superóxido dismutasa en el hígado.

Para determinar el daño oxidante se analizó la actividad enzimática de la superóxido dismutasa en los homogenados de hígado (Fig. 14), encontrándose que no existen diferencias significativas entre los grupos control y suplementado. Sin embargo, se observó un aumento de la actividad de la enzima en los ratones tratados con tetracloruro de carbono (control = 14.8 ± 1.45 ; suplementado = 15.0 ± 1.48 ; tetracloruro = 25.4 ± 1.86 U/mg proteína).

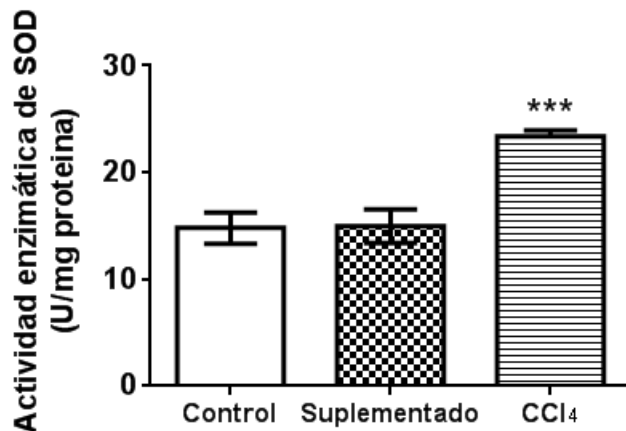


Fig. 14. Efecto de la SOD en homogenados de hígado. Los datos representan el promedio \pm SEM, *** $p < 0.001$ y una $N = 5$.

VI. 4 Determinación enzimática de la catalasa en el hígado.

El daño oxidante también se determinó mediante la actividad de catalasa, enzima que convierte el peróxido de hidrógeno en agua y de ésta manera se neutraliza el efecto de estrés oxidante. Como podemos observar en la Figura 15, no se encontró ninguna diferencia significativa entre el grupo control comparado con el grupo suplementado con biotina, (control= 144 ± 18.1 ; suplementado= 151 ± 13.5 U/mg proteína). El grupo control positivo (tetracloruro de carbono) mostró un aumento en los valores de la actividad de la catalasa: 286 ± 30.1 U/mg proteína, $p < 0.05$ comparado con los otros dos grupos.

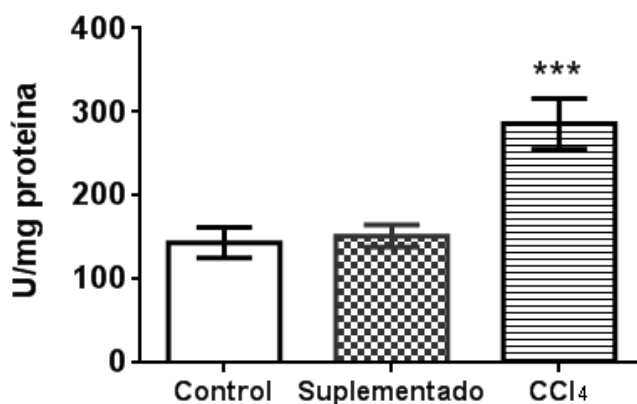


Fig. 15. Determinación de la actividad de CAT en los diferentes grupos usados en este proyecto. Los datos representan el promedio \pm SEM, *** $p < 0.001$ y una $N = 9$.

VI. 5 Determinación de glutatión reducido y oxidado en el hígado.

Se determinó la concentración de glutatión reducido y oxidado en homogenados de hígado. Los valores encontrados para el primero del grupo control fue de 34.2 ± 3.6 y en el suplementado de 32.1 ± 4.6 pM/ μg de tejido. Para el glutatión oxidado los valores fueron de 10.7 ± 0.57 para el grupo control y de 9.67 ± 2.12 en el grupo suplementado. La prueba estadística indica que no hubo diferencias significativas entre los grupos control y suplementado, pero en el grupo tratado con tetracloruro de carbono el sistema redox se vio afectado. En la relación entre la concentración de glutatión reducido y oxidado se encontró que el grupo control presentó un valor de 12.13 y el suplementado 12.74; no hubo diferencia significativa entre los grupos (Fig. 16).

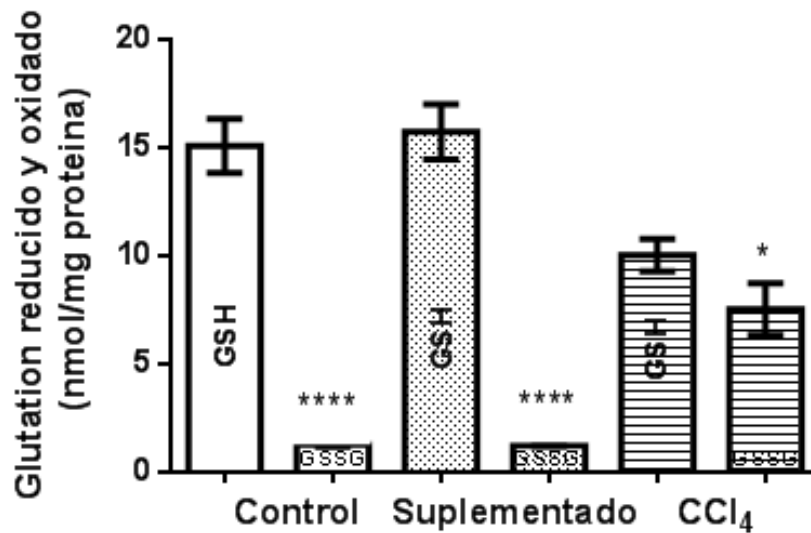


Fig. 16. Relación que se tiene entre el glutatión reducido y oxidado. Los datos representan el promedio \pm SEM, **** $p < 0.0001$ y una $N = 7$.

VI. 6 Concentración de óxido nítrico.

Se determinó la concentración de óxido nítrico mediante el análisis de sus metabolitos estables nitritos y nitratos en homogenados de hígado. Los datos obtenidos nos indican que no existen diferencias significativas entre el grupo control y el suplementado, siendo en el primero de 24.94 ± 0.98 , y de $25.68 \pm 0.94.31 \mu\text{mol/L}$ para el segundo. Se observó un aumento significativo en la producción de óxido nítrico en los ratones tratados con tetracloruro de carbono (Fig. 17).

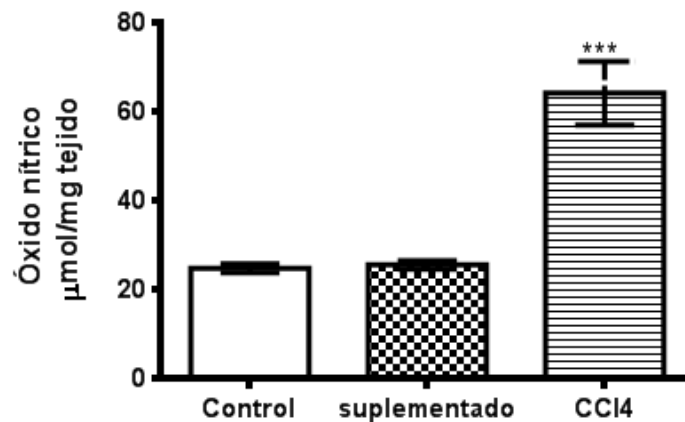


Fig 17. Determinación de óxido nítrico en homogenados de hígado. Los datos representan el promedio \pm SEM, *** $p < 0.001$ y una $N = 8$.

VI. 7 Histomorfología de hígado teñido con hematoxilina-eosina.

En el análisis histológico se encontraron diferencias entre los cortes de hígado que provenían de ratones suplementados con biotina con respecto a los controles. En los ratones que recibieron la dieta suplementada con la vitamina se observó 39% más de células binucleadas con respecto al grupo control (Fig. 18 A ←), característica que se asocia con mitosis sin citocinesis, mayor capacidad de regeneración del hígado y/o con hepatocitos en quiescencia (Concepción & Díaz, 2013).

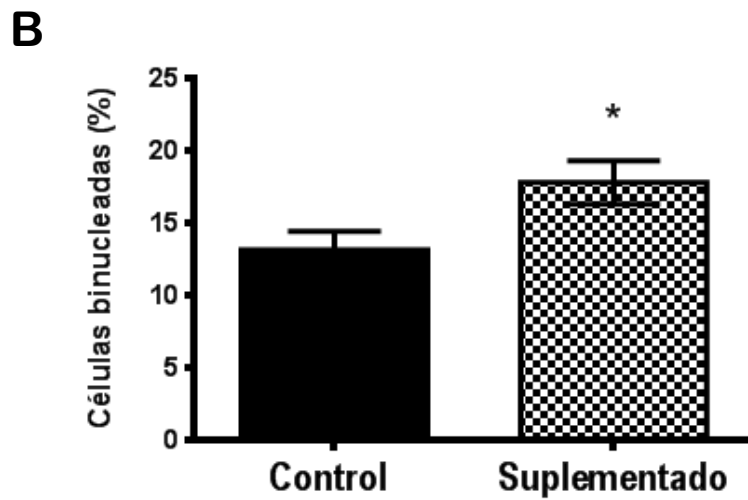
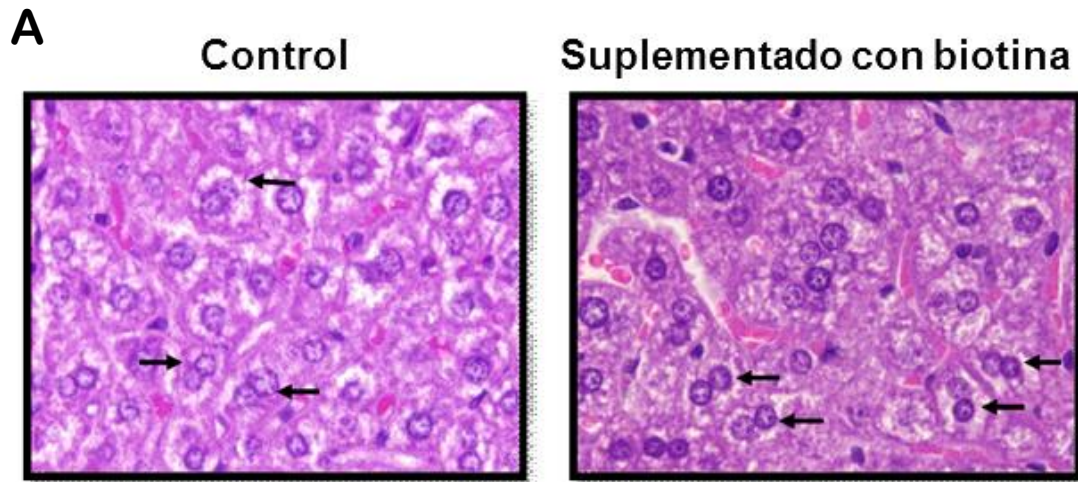


Fig. 18. Se observa un mayor porcentaje de células binucleadas (A) en el grupo suplementado con biotina (18.3%), con respecto al control (13.2%). La observación se realizó en un aumento 40X, con un microscopio Olympus BX51, el análisis fue de 3 campos por corte con un total de 6 cortes por muestra. Los datos representan el promedio \pm SEM, * $p < 0.05$ (B).

También, se observó que el número de hepatocitos con nucleomegalia (núcleos mayores de $12 \mu\text{m}$ \leftarrow , Fig 19 A) aumentaron con respecto a los presentados en el grupo control= 0.81 ± 0.11 ; suplementado= 1.30 ± 0.28 (Figura 19 B).

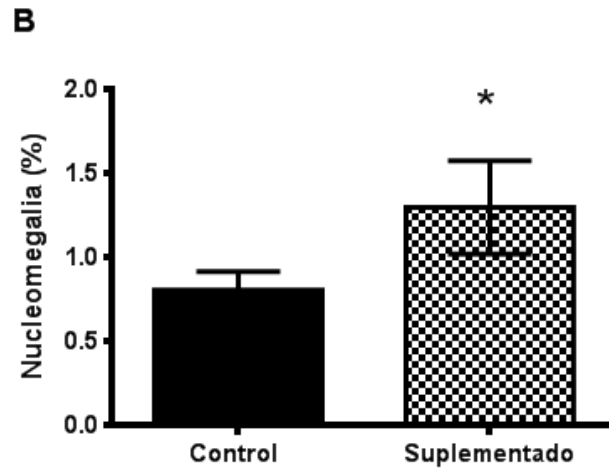
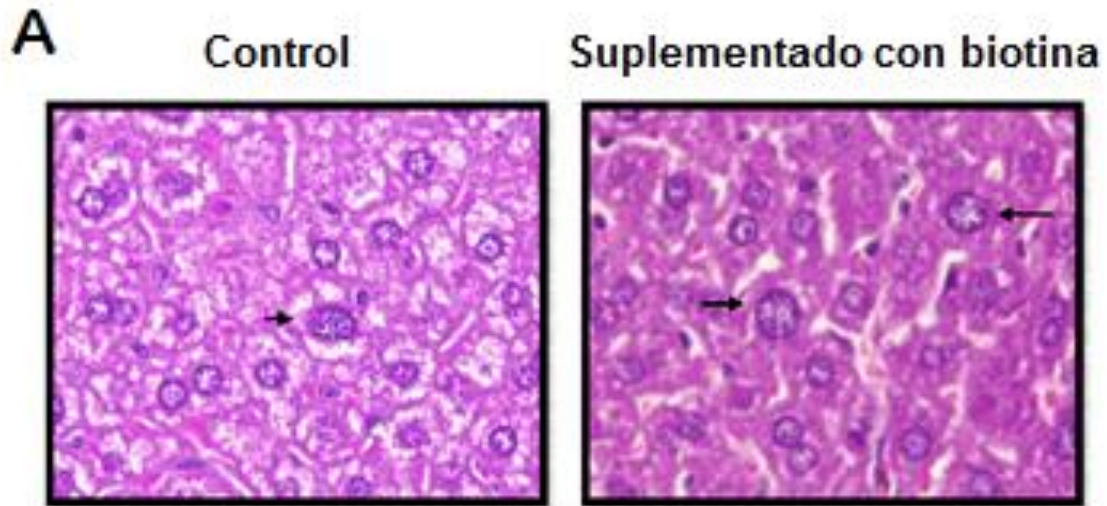


Fig. 19. Se observa un mayor porcentaje de células con nucleomegalia (A) en el grupo suplementado con biotina (aumento 40X, microscopio Olympus BX51). El análisis fue de 3 campos por corte con un total de 6 cortes por muestra. Los datos representan el promedio \pm SEM, * $p < 0.05$ (B).

Se encontró en la cuantificación de la frecuencia de áreas (μm^2) en los núcleos, que el grupo control presentó áreas de 16.27 a 125.54 μm^2 y el grupo suplementado con biotina de 14.48 a 188.89 μm^2 , (Fig. 20).

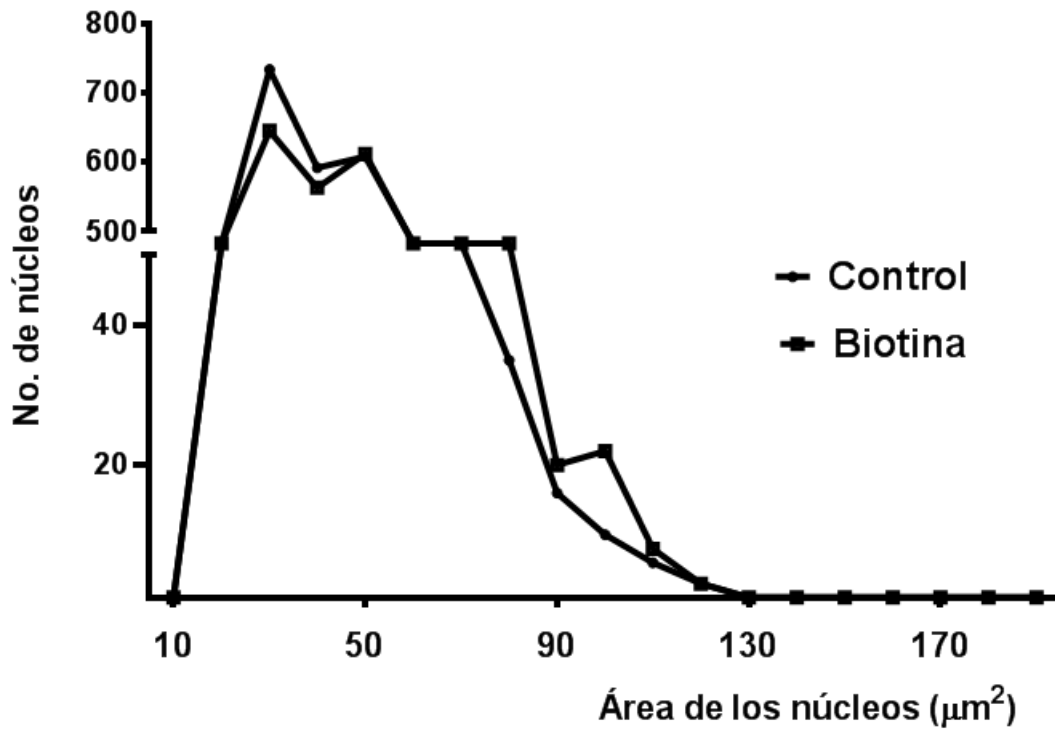


Fig. 20. Frecuencia de áreas nucleares para los grupos control y suplementado con biotina. El análisis fue de 300 áreas de núcleos por muestra.

También se encontraron otras modificaciones en la morfología hepática las cuales fueron cuantificadas de acuerdo con el criterio de Ezzi *et al.*, 2016, entre ellas se observaron cambios moderados en la dilatación de los sinusoides (Fig. 21A y B), aumento moderado en la vascularización (Fig. 22A y B) y leve incremento de conductos biliares (Fig. 23 A y B).

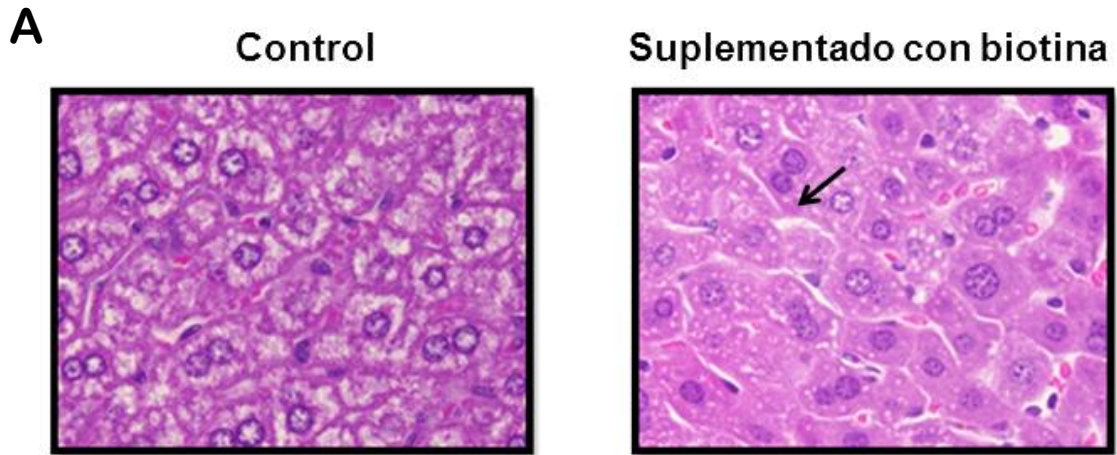


Fig. 21A. Se observa la presencia de moderada dilatación de sinusoides en el grupo suplementado con biotina (aumento 40X, microscopio Olympus BX51).

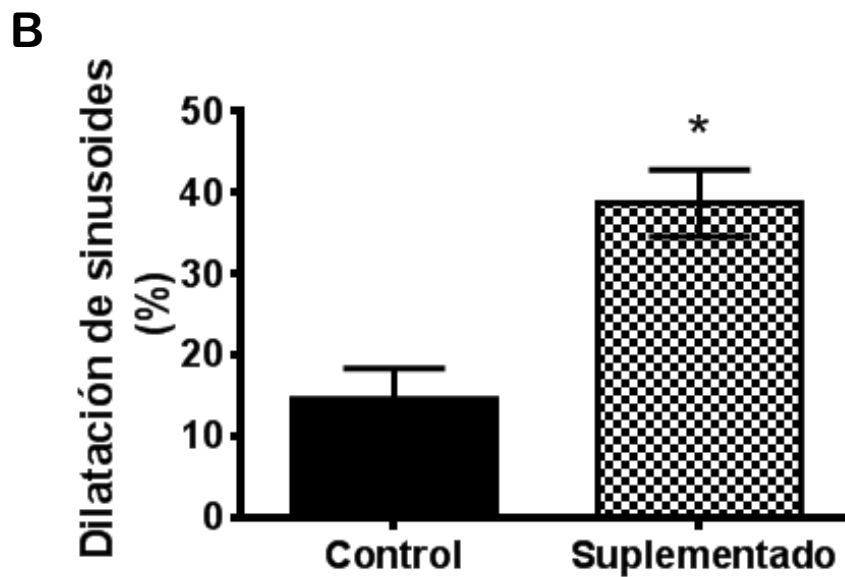


Fig. 21B. Porcentaje de dilatación de sinusoides, el grupo suplementado presentó un 38.8 ± 4.1%, considerándose una modificación moderada (31-60%, Ezzi *et al.*, 2016). Los datos representan el promedio ± SEM, *p<0.05.

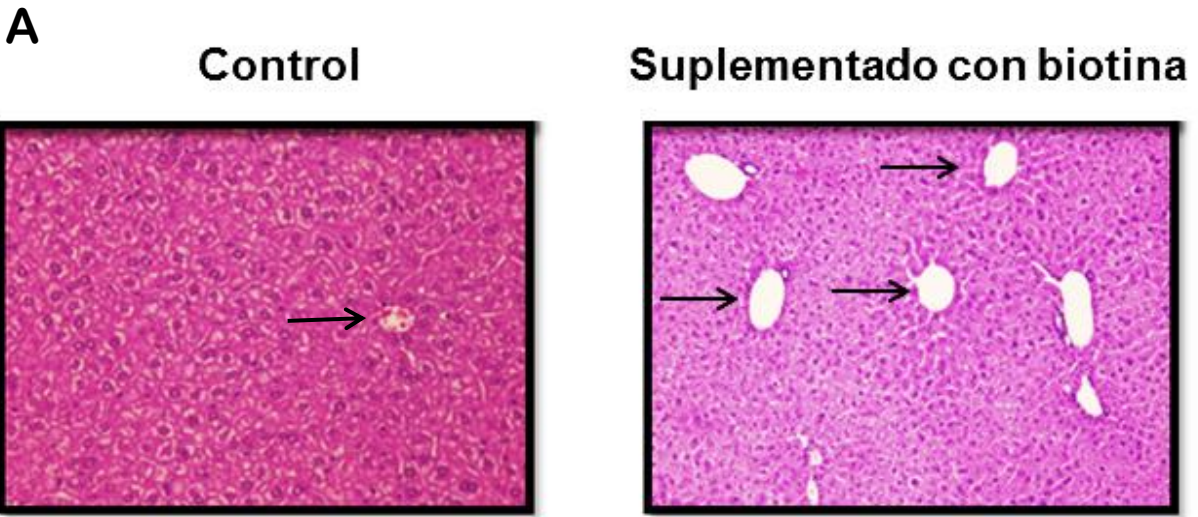


Fig. 22A. Se observa un moderado incremento en la vascularización en el grupo suplementado con biotina (aumento 10 X, microscopio Olympus BX51).

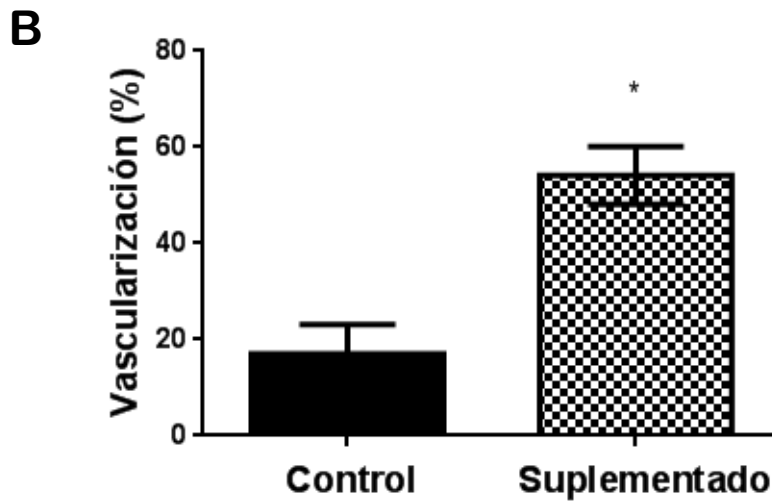


Fig. 22 B. Porcentaje de vascularización, el grupo suplementado presentó un $54 \pm 4.5\%$, considerándose una modificación moderada (31-60%, Ezzi *et al.*, 2016). Los datos representan el promedio \pm SEM, * $p < 0.05$.

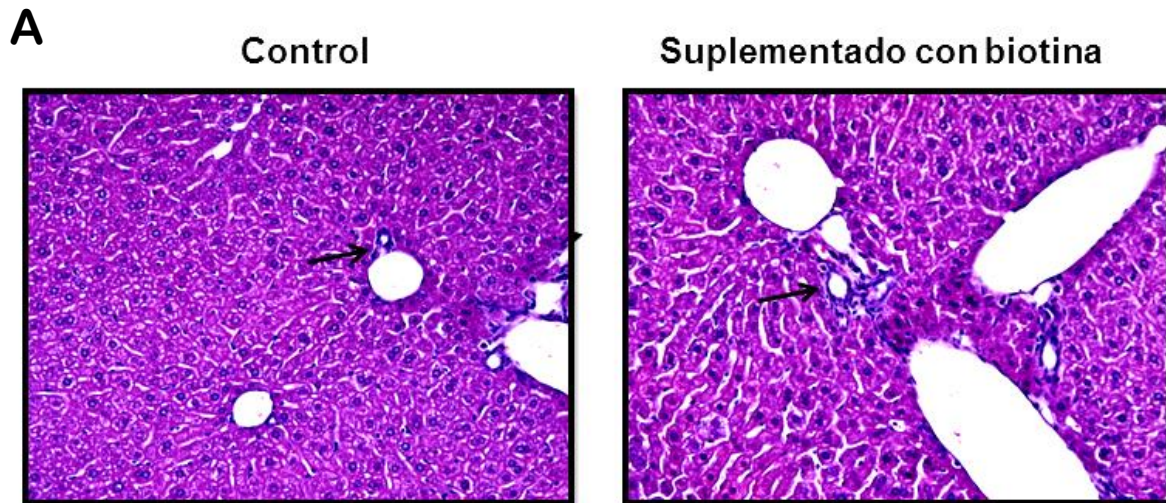


Fig. 23 A. Se observó un leve incremento en los conductos biliares en el grupo suplementado con biotina. (aumento 20X; microscopio Olympus BX51).

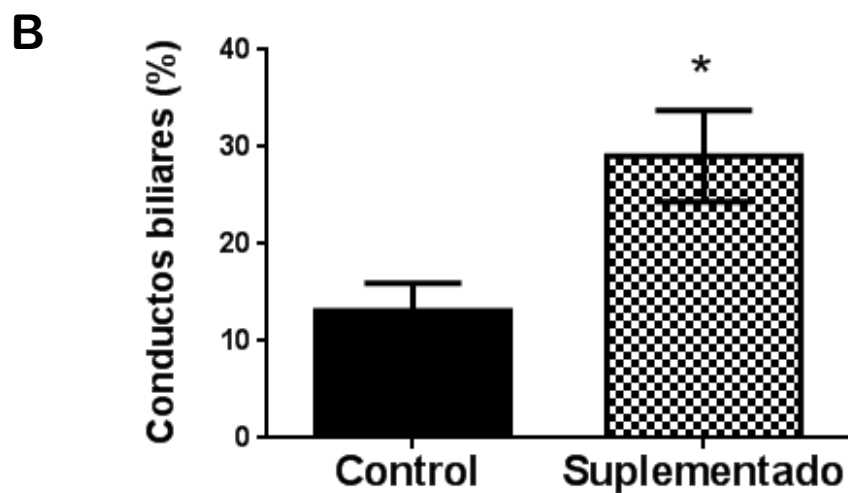


Fig. 23 B. Porcentaje de conductos biliares, el grupo suplementado presentó un $29 \pm 4.1\%$, considerándose una modificación moderada (31-60%, Ezzi *et al.*, 2016). Los datos representan el promedio \pm SEM, * $p < 0.05$.

VI. 8 Determinación de daño genotóxico.

En la prueba de formación de micronúcleos en reticulocitos se encontró un incremento en el porcentaje de daño genotóxico ($p < 0.05$) en el grupo suplementado, como podemos ver en la figura 24. Sin embargo, ambos grupos se encuentran en el rango de valores normales, que es hasta de 0.75%. Este dato es sugestivo de daño genotóxico pero este resultado debe complementarse con otras pruebas para confirmar el daño genotóxico.

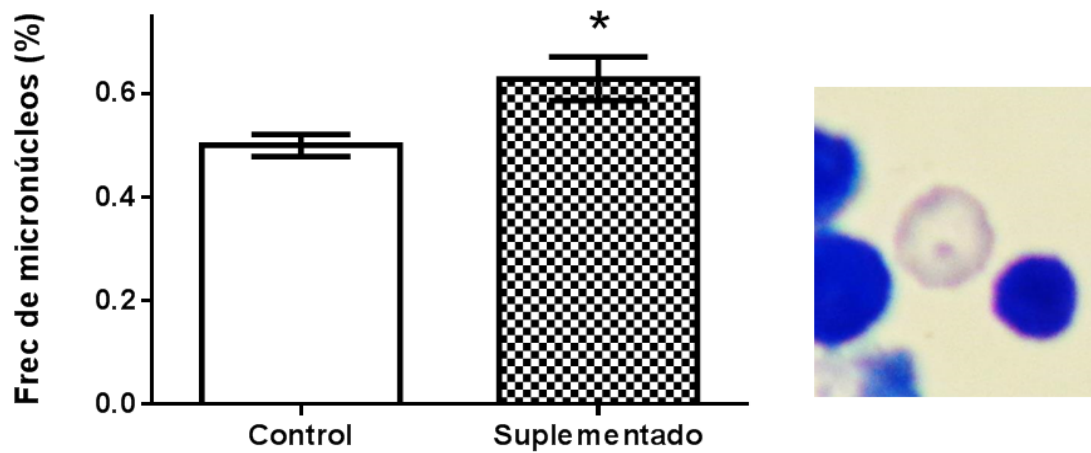


Fig. 24. Daño genotóxico en reticulocitos de médula ósea. El análisis representa la frecuencia de micronúcleos. Los datos son el promedio \pm SEM, $*p < 0.05$.

VII DISCUSIÓN

En este estudio, se encontró que la administración durante ocho semanas de alimento suplementado con biotina indujo cambios notables en la histomorfología hepática de los ratones de la cepa BALB/cAnN, entre los que podemos mencionar el incremento de células binucleadas (39%), nucleomegalia (66%), cambios moderados de dilatación de sinusoides y vascularización, así como leves cambios de conductos biliares. Estos cambios morfológicos encontrados en el hígado se suman a los previamente reportados en nuestro laboratorio en el páncreas (Lazo de la Vega *et al.*, 2013) y en el ovario (Baez-Saldaña *et al.*, 2009), así como reportes por otros autores en ratas (Paul *et al.*, 1973) y en modelos diabéticos (Sahin *et al.*, 2013, Sawamura *et al.*, 2015), lo que indica que la biotina en concentraciones farmacológicas afecta la morfología tisular.

El incremento de células binucleadas y nucleomegalia resulta de un estado poliploide. El papel de un incremento en la poliploidía se encuentra hasta el presente en debate. Por un lado, se ha reportado que las células poliplodes aumentan en algunos tipos de cáncer como el esofágico y el de colón (Gentic *et al.*, 2014), sin embargo, en el hígado la mayoría de los estudios señala que ésta hace que los hepatocitos conserven una notable capacidad para proliferar en respuesta a una lesión celular masiva, una exposición tóxica o infección viral (Gentic *et al.*, 2014) Nuestros resultados han encontrado que, a pesar del aumento en la poliploidía, los marcadores de daño hepático y estrés oxidante no se modificaron, lo que sugiere que los cambios nucleares que produce la suplementación con biotina podrían estar asociados con los efectos positivos de la poliploidía en el hígado. Será interesante en estudios futuros probar esta hipótesis en modelos de daño como la hepatectomía.

En estudios previos (Báez-Saldaña *et al.*, 2009) encontramos, en el mismo modelo experimental de ratones usado en este estudio, que la ingesta de aproximadamente 14 mg/kg de peso corporal durante 9 semanas produjo un decremento en el número de folículos primarios y de Graaf. Cambios en la morfología del ovario también se encontraron en ratas con la administración de una dosis única de biotina [50mg/kg] de

peso corporal vía intraperitoneal (Paul *et al.*, 1973). En otro estudio (Lazo de la Vega *et al.*, 2013) encontraron que se aumentó el tamaño de los islotes pancreáticos y la proporción de células alfa en el centro del islote. Tanto los cambios en los trabajos arriba descritos como en la presente tesis no tuvieron efectos adversos en la ganancia de peso corporal, la ingesta de alimento, la apariencia externa o la conducta de los animales. En contraste, estudios por Sawamura *et al* (2015) en ratas alimentadas por 6 semanas con una dieta conteniendo 10 g/kg de dieta (990 mg/kg de peso corporal) presentó cambios morfológicos en el diámetro de los tubos seminíferos pero estas concentraciones de biotina mostraron afectar la ganancia de peso, disminuir la ingesta de alimento y afectar negativamente el peso del hígado y de los riñones, por los que es posible que los cambios morfológicos del testículo resulten de efectos tóxicos de la biotina.

Otras investigaciones han encontrado que concentraciones farmacológicas de biotina revierte la histopatología producida por el estado diabético (Sahin *et al.*, 2013; Aldahmash *et al.*, 2015, 2016). En ratas con diabetes inducida por dos semanas de ingesta de una dieta alta en grasas y una inyección de estreptozotocina se encontró que la administración de 300 ug/kg de peso corporal durante 10 semanas disminuyó los daños producidos por la dieta y la estreptozotocina en el hígado, páncreas y riñón (Sahin *et al.*, 2013). En ratones albinos Suizos a los que se les generó diabetes con estreptozotocina, una dosis diaria de 15 mg/kg de peso corporal durante 12 días sucesivos decrementó el número de glomérulos distorcidos, el número de células inflamatorias y de macrófagos gigantes que se observaron en los ratones no tratados con la vitamina (Aldahmash *et al.*, 2015). En el hígado, estos mismos autores encontraron disminuciones en la dilatación de la vena porta, la infiltración de linfocitos y de grasa (Aldamash *et al.*, 2016). En ninguno de estos estudios se reportan los cambios morfológicos que encontramos en el hígado en este trabajo de tesis. Es interesante notar que en los animales con diabetes las concentraciones farmacológicas de biotina revierte los daños producidos por el estado diabético, en tanto que en animales no diabéticos los cambios se observan en la morfología típica.

Resulta relevante que a pesar de que encontramos modificaciones morfológicas en el hígado, no se observaron cambios significativos en los marcadores de daño hepático analizados (albumina, bilirrubina total e indirecta, gama glutamil transferasa, aspartato y alaninoamino transferasa, fosfatasa alcalina o urea), Estos resultados coinciden con los descritos por Sawamura (2015), en ratas normales, en los que dietas conteniendo hasta 1000 mg/kg de dieta no afectaron estos parámetros.

Las modificaciones morfológicas favorables que produjo la biotina en modelos murinos diabéticos, está asociado con la reducción de la estrés oxidante (Sahin *et al.*, 2013; Aldahmash *et al.*, 2015, 2016). En los estudios de Sahin *et al.*, (2013) las ratas cuya hiperglucemia se indujo con una dieta alta en grasas y estreptozotocina, se disminuyeron los niveles de malondialdehído en el suero, hígado y riñón. En ratones albinos Suizos (Aldahmash *et al.*, 2015, 2016) el tratamiento con biotina disminuyó la señal de acroleína, un marcador de daño oxidante. En contraste, nuestros estudios no encontraron cambios en la concentración de malondialdehído o otros indicadores de daño oxidante como el glutatión reducido y oxidado. Tampoco encontramos diferencias entre el grupo control y el suplementado con biotina en la actividad de la catalasa y la superóxido dismutasa. Diferencias entre los efectos de concentraciones farmacológicas de biotina entre el estado diabético y condiciones normales también se han encontrado en la expresión de genes (Dakshinamurti, 1994; Ferreira & Weiss 2007; Sugita *et al.*, 2008; Larrieta *et al.*, 2010 y Sahin *et al.*, 2013), modifican las curvas de tolerancia a la insulina y a la glucosa (Reddi *et al.*, 1988; Lazo de la Vega *et al.*, 2013), lo que indica que los efectos farmacológicos de la vitamina difieren dependiendo del estado metabólico.

El óxido nítrico tiene un papel muy importante en la vasodilatación y su disfunción está asociado con la estrés oxidante (Zhang, 2016). Estudios en células de línea celular leucémica de linfocitos T (Jurkat) reportaron que los efectos de la biotina son dependientes de la concentración del óxido nítrico (Rodríguez-Melendez & Zempleni, 2009). Sin embargo otros estudios en ratas que recibieron biotina durante ocho semanas, diluidas en el agua para su consumo (12 mg/kg de peso) encontraron que los efectos de la biotina son independientes de éste (Watanabe *et al.*, 2008). Los

resultados que se obtuvieron es este trabajo, no mostraron cambio en la concentración de óxido nítrico entre grupos, lo que sugiere que son otras acciones las están involucradas en la vasodilatación que se observó en los cortes de hígado.

Los mecanismos que participan en los cambios histomorfológicos que produce la biotina en concentraciones farmacológicas se desconocen. En las modificaciones causadas en el islote pancreático de nuestros estudios previos (Lazo de la Vega et al., 2013), los cambios en la arquitectura del islote estuvo asociada con una disminución del RNAm de la proteína de adhesión celular neuronal (Ncam), una proteína cuya expresión participa en el mantenimiento de las células alfa en la periferia del islote (Esni et al., 1999). Estudios en proceso en nuestro laboratorio se encuentran dilucidando los mecanismos que podrían estar participando en los efectos de concentraciones farmacológicas de biotina sobre la morfología del hígado.

La administración farmacológica de biotina se ha considerado que no produce efectos nocivos, ni en humanos, ni en animales de experimentación (Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes and its Panel on Folate, Other B Vitamins, and Choline and Sub comité on Upper Reference Levels of Nutrients Food and Nutrition board, Institute of Medicine 2000; Fiume, 2001). Pruebas de toxicidad para evaluar agentes mutagénicos (AMES) en bacterias (SRI-International, 1979; Hayes, 1984; Ronquillo et al., 2013) han encontrado que la biotina no tiene efectos tóxicos ni mutagénicos. Sin embargo, en *Tradescantia* (Trad-MCN) mostró que el efecto mutagénico se presentó en dosis de 250 mg/ml de biotina (Ma et al., 1984). En humanos no se han encontrado efectos adversos con administraciones en el rango de 0.25 a 100 mg de biotina, esto ha sido reportado en pacientes con errores innatos del metabolismo (Baumgarner, 1997), individuos normales (Singer & Goehas, 2006), pacientes diabéticos (Maebashi, 1993) y pacientes sometidos a hemodiálisis (Koutsikos, 1996). En ratas, dietas conteniendo hasta 1000 mg/kilogramo de dieta no mostraron cambios en marcadores de daño hepático y renal (Sawamura et al., 2015), pero la ingesta de una dieta con 10 g/kg de dieta (990 mg/kg de peso corporal) tuvo efectos dañinos (Sawamura et al., 2015).

Los resultados obtenidos en esta tesis encontraron que la dieta suplementada con biotina produjo un aumento en la formación de micronúcleos, aunado a los cambios en la morfología del hígado, lo cual indica que es necesario realizar estudios para determinar las repercusiones de las modificaciones producidas por la vitamina en concentraciones farmacológicas ya que esta se encuentra disponible en establecimientos comerciales en concentraciones dos o tres órdenes de magnitud por arriba de sus requerimientos diarios.

VIII CONCLUSIÓN

Estos datos demuestran por primera vez, que la suplementación con biotina afecta la morfología hepática en ratones sanos. Estos cambios incluyen el incremento de células binucleadas, nucleomegalia, dilatación de sinusoides, incremento moderado de vascularización y conductos biliares. Los cambios histológicos no se reflejaron en aumentos de marcadores de daño hepático, ni produjeron estrés oxidante, lo que sugiere que los cambios nucleares que produce la suplementación con biotina podrían estar asociados con efectos positivos de la poliploidía en el hígado. Por otro lado, en la médula ósea, se encontraron cambios sugerentes de genotoxicidad. En conjunto estos hallazgos indican que el estudio de los efectos tóxicos de la vitamina deben de considerar otras herramientas para determinar las repercusiones que pudiesen tener los cambios nucleares y estructurales que produce la vitamina.

IX PERSPECTIVAS

- Investigar los mecanismos moleculares que participan en los cambios estructurales y nucleares del tejido hepático.
- Realizar hepatectomía en los ratones suplementados con biotina para conocer si hay modificación en la poliploidía de los hepatocitos.
- Determinar si la poliploidía generada por la suplementación de la vitamina otorga protección o efectos perjudiciales en el hígado.
- Estudiar las repercusiones de la poliploidía generada con la suplementación con biotina en el ciclo y proliferación celular.
- Determinar la participación del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas (CDK) en el incremento de la dilatación de los sinusoides y el aumento de la vascularización.

REVIEW ARTICLE

Pharmacological Effects of Biotin in Animals

Leticia Riverón-Negrete¹ and Cristina Fernandez-Mejia^{2,*}

¹Unidad de Genética de la Nutrición, Instituto Nacional de Pediatría, Secretaría de Salud; ²Unidad de Genética de la Nutrición, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México/ Instituto Nacional de Pediatría

ARTICLE HISTORY

Received: January 22, 2016
Revised: July 01, 2016
Accepted: July 27, 2016

DOI:
10.2174/13895575166661609231326
11

Abstract: In recent decades, it was found that vitamins affect biological functions in ways other than their long-known functions; niacin is the best example of a water-soluble vitamin known to possess multiple actions. Biotin, also known as vitamin B7 or vitamin H, is a water-soluble B-complex vitamin that serves as a covalently-bound coenzyme of carboxylases. It is now well documented that biotin has actions other than participating in classical enzyme catalysis reactions. Several lines of evidence have demonstrated that pharmacological concentrations of biotin affect glucose and lipid metabolism, hypertension, reproduction, development, and immunity. The effect of biotin on these functions is related to its actions at the transcriptional, translational, and post-translational levels. The best-supported mechanism involved in the genetic effects of biotin is the soluble guanylate cyclase/protein kinase G (PKG) signaling cascade. Although there are commercially-available products containing pharmacological concentrations of biotin, the toxic effects of biotin have been poorly studied. This review summarizes the known actions and molecular mechanisms of pharmacological doses of biotin in animals and current information regarding biotin toxicity.

Keywords: Biotin toxicity, Biotin, Gene expression, Guanylate Cyclase, Histone Biotinylation, Pharmacological effects.

1. INTRODUCTION

In recent decades, it was discovered that vitamins affect biological functions in ways other than their classically-defined functions [1]. Niacin, also known as vitamin B3, illustrates the multiple actions of a water-soluble vitamin. Niacin is converted into nicotinamide adenine dinucleotides (NAD and NADP), which participate in redox functions; besides this classical role as a coenzyme, niacin is required for the (ADP)-ribose transfer reactions involved in deoxyribonucleic acid repair [2], calcium mobilization, and deacetylation reactions [3]. In addition, pharmacological concentrations of niacin effectively treat dyslipidemias and atherosclerosis [4]. The molecular mechanisms that participate in niacin's pharmacological effects are still a matter of debate; the most accepted mechanism is its binding to a G_i-coupled receptor. However, gene expression, direct enzymatic inhibition, and microRNA have also been suggested to participate in niacin's hypolipemic effect [4]. In the same manner as niacin, biotin modifies biological functions in addition to its classical role as a coenzyme. In

this article, we review several of biotin's actions, in particular those effects at pharmacological doses of biotin.

2. BIOTIN

Biotin is a vitamin that participates in intermediary metabolism as a covalently-bound coenzyme of carboxylases [1]. The adequate intake (AI) level of biotin is 30 µg/d for adults and pregnant women [5], 35 µg/d for lactating mothers, and 5 µg/d for infants (0-5 months) [5]. Primary nutritional biotin deficiency is uncommon; however, medical interventions, pregnancy, [6] and xenobiotics [7-9] may affect biotin levels.

The classic role of biotin is to participate in carboxylation reactions [10]. Five biotin-dependent carboxylases exist in mammals: pyruvate carboxylase, acetyl-CoA carboxylase-2, propionyl-CoA carboxylase, and β-methylcrotonyl-CoA carboxylase, which are located in the mitochondria, and acetyl-CoA carboxylase-1, which is located in the cytoplasm [10]. Pyruvate carboxylase catalyzes pyruvate carboxylation to oxalacetate, a step that is critically involved in tricarboxylic acid anaplerosis and gluconeogenesis [11]. Propionyl-CoA carboxylase participates in the catabolism of fatty acids of odd-numbered chain length and branched-chain amino acids [12]. The enzyme β-methylcrotonyl-CoA carboxylase participates in both isoprenoid metabolism and leucine catabolism [13]. Acetyl-CoA carboxylase catalyzes

*Address correspondence to this author at the Unidad de Genética de la Nutrición, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México/ Instituto Nacional de Pediatría, Av. del Iman #1, 4^o piso, Mexico City, CP 04530 Mexico; Tel: 5255 5606 35 58; Fax: 5255 56063489; E-mail: crisferm@biomedicas.unam.mx

the carboxylation of acetyl-CoA to malonyl-CoA; the two isoenzymes of acetyl-CoA carboxylase, 1 and 2 (or alpha and beta), are encoded by different genes [14]. Acetyl-CoA carboxylase-1 is abundantly expressed in the liver and adipose tissue; its action is critical in fatty acid synthesis [14]. Acetyl-CoA carboxylase-2 is located in the mitochondria, mostly in skeletal muscle and the heart; its catalytic action is involved in fatty acid catabolism [15] and it has been proposed to also function as a biotin reservoir [16, 17].

Active carboxylases are formed by the covalent linkage of the vitamin to the apoenzymes. Holocarboxylase synthetase catalyzes the vitamin attachment by two successive reactions: the synthesis of the intermediate biotinyl-5'-AMP, which then reacts with the epsilon group of a lysine, which is a highly conserved region in all carboxylases [10]. This biotinylated lysine is named biocytin [10].

Biotin can regulate the gene expression of the enzymes involved in its function as a cofactor and metabolism, such as carboxylases, holocarboxylase synthase, and the sodium-dependent multivitaminic transporter, which serves as a biotin transporter [18, 19]. This effect suggests that the vitamin has an endogenous function in gene regulation. Interestingly, this effect has also been observed with other proteins at pharmacological concentrations of biotin, unrelated to biotin's function as a cofactor [20, 21].

2.1. Pharmacological Effects of Biotin

At present, it is well accepted that biotin modifies gene expression and biological processes at pharmacological concentrations, which are about 30 to 650 times its daily requirement (30 µg). The actions of biotin on gene expression are produced at both the transcriptional and translational levels (reviewed in [1, 22-24]), with effects on a variety of biological processes, such as metabolism, reproduction, and development (reviewed in [1, 22-24]). The actions of pharmacological concentrations of biotin differ from those generated by biotin restriction [25]. Biotin analogs, such as biocytin, diaminobiotin, and desthiobiotin, do not function as carboxylase cofactors [25, 26] but do have biotin-like activities in terms of gene expression. Bisnorbiotin, a metabolite resulting from biotin catabolism, can also modify gene expression [25, 26].

Dakshinamurti *et al.* were the first to show that pharmacological concentrations of biotin affect proteins unrelated to the enzymes that participate in biotin metabolism [27]. In the 1960s, Dakshinamurti and Cheah-Tan found that an acute injection of biotin (1-2 mg/kg) augmented the activity of hepatic glucokinase in alloxane diabetic rats and in non-diabetic fasted rats; this effect was also observed in cultured rat hepatocytes [28]. Later, it was discovered that the action of biotin on glucokinase increased transcription [21]. These discoveries were the first to discern some of biotin's effects on gene expression.

DNA microarray studies have identified thousands of transcripts modified by pharmacological concentrations of biotin. In peripheral blood mononuclear cells, after supplementation with 2.15 mg of biotin for 21 days, Wiedmann *et al.* [29] found changes in the abundance of

genes. In the human hepatocellular carcinoma cell line HepG2, culturing in media containing pharmacological concentrations of biotin [10nM] increased 243 and decreased 861 mRNA transcripts [25]. This study also demonstrated that the transcripts modified by biotin restriction diverged from those modified by biotin supplementation [25].

Biotin also has actions at the post-transcriptional level. In the late 1980s, studies by the Stockert group [30] discovered that the protein abundance of the asialoglycoprotein receptor was diminished in biotin-deficient HepG2 cells. Addition of biotin [0.1 mM] or biocytin restored the protein levels of the asialoglycoprotein receptor, while mRNA abundance was not modified [30]. Proteomic studies found proteins whose abundance changed in response to pharmacological concentrations of biotin [10nM], including proteins involved in nervous system function, cell signaling, cytoskeleton homeostasis, and nuclear structure and transport [31]; the increased protein expression was not due to increased mRNA expression [31]. Pharmacological concentrations of biotin also influence post-translational changes, such as protein phosphorylation [32-34].

2.2. Molecular Mechanisms of Biotin's Effects on Gene Expression

Presently, the most widely accepted mechanism for the effects of biotin on gene expression is a soluble guanylate cyclase-signaling cascade [18, 20, 35, 36]. Other studies have proposed that histone biotinylation may participate in biotin's systemic effects [reviewed in [37]]; however, this issue remains controversial. In addition, the existence of a receptor was described in mouse liver plasma membranes [38]. The authors of this report suggested, but did not prove, that the receptor might be linked to the cGMP signaling pathway; however, no further studies have investigated this interesting observation.

2.2.1. Soluble Guanylate Cyclase-Signaling Cascade

To date, the soluble guanylate cyclase-signaling cascade is the best-supported mechanism involved in the effect of biotin on gene expression [18, 20, 35, 36]. The involvement of this pathway was found by several groups in different models, such as tissue homogenates, cell lines, primary cultures, and *in vivo* studies. The mechanism was observed in biotin depletion-repletion conditions [18-20], biotin supplementation conditions [28, 32-34], and in soluble guanylate cyclase homogenates [35, 39]. Pioneering studies by Vesely in 1982 [35] found that 1mM biotin, or its analog (+)-biotin-p-nitrophenyl ester, increased the activity of guanylate cyclase two- to three-fold in rat homogenates from liver, heart, kidney, cerebellum, and colon. Later, in 1984, the same group found that the biotin analogs azabiotin, bisnorazabiotin, carbobiotin, and isoazabiotin were also able to enhance guanylate cyclase activity in tissue homogenates [39]. The same year, studies by Spence and Kouldeka found that culturing isolated hepatocytes with biotin [10nM to 1mM, maximal response at 1 mM] increased cGMP levels [28]. In cultured cells, other studies, using blockers and inhibitors, identified that the cGMP/PKG signaling pathway mediates the transcription of carboxylases, holocarboxylase

synthetase, the sodium-dependent multivitaminic transporter [18, 19], the asialoglycoprotein receptor [20], and the insulin receptor [20] in response to 1 mM biotin. In pancreatic islets isolated from rats, biotin-induced glucokinase mRNA expression depended on guanylate cyclase [36]. *In vivo*, 8 weeks of dietary biotin supplementation (97.7 mg/kg diet) increased cGMP in hepatic and adipose tissues [32, 34].

Little information exists about the mechanisms by which biotin increases cGMP. Solorzano-Vargas *et al.* [18] demonstrated that holocarboxylase synthetase catalysis is required to activate guanylate cyclase; based on this observation, they proposed that biotinyl AMP, the intermediate compound of this enzyme, is involved in this effect (Fig. 1). Another report [40] suggested that biotin produces its actions on PKG via nitric oxide synthase; however, other investigations [41] have questioned the action of this compound in mediating biotin's actions [41] (Fig. 1). Studies in the Jurkat human lymphoma cell line found that 10nM biotin increased nitric oxide, the mRNA levels of endothelial and inducible nitric oxide synthases, and PKG activity [40]. The effects of biotin on nitric oxide concentrations were abrogated by the nitric oxide synthase inhibitor N-monomethyl-arginine. In contrast, *in vivo* studies showed that pretreatment with a nitric synthase inhibitor had no effect on the hypotensive action of biotin supplementation [150 mg biotin/kg diet], although pretreatment with a guanylate cyclase inhibitor abolished the hypotensive action [41]. Further investigation will be required to ascertain the part of nitric oxide production that functions as a mediator of biotin induction of soluble guanylate cyclase.

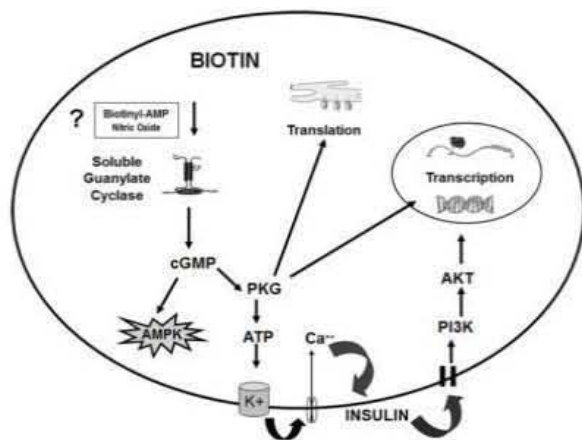


Fig. (1). Actions downstream of guanylate cyclase/PKG in biotin-mediated gene expression. The action of biotin on asialoglycoprotein protein translation and mRNA expression of carboxylases, holocarboxylase synthetase, and the sodium-dependent multivitaminic transporter involves cyclic guanylate cyclase and PKG activation. In pancreatic islets, pharmacological concentrations of biotin increase glucokinase mRNA by a mechanism that involves guanylate cyclase and PKG activation, which precedes an increase in ATP content. This promotes insulin release via ATP-sensitive potassium channels. Autocrine insulin, in turn, activates insulin receptor signaling via phosphoinositol-3-kinase (PI3K)/Akt. *In vivo* cGMP increases are associated with AMPK phosphorylation.

There is little information about the cascade of actions downstream of guanylate cyclase/PKG activation in biotin-mediated gene expression. In isolated pancreatic islets, treated with inhibitors of different signaling pathways, we discovered that, downstream of guanylate cyclase and PKG activation, biotin [1 mM] increased ATP content, which induces insulin secretion via ATP-sensitive potassium channels. In turn, insulin, in an autocrine manner, promotes PI3K/Akt signaling activation, which increases pancreatic glucokinase mRNA expression [36] (Fig. 1).

2.2.2. Protein Biotinylation

Studies by Zempleni *et al.* (reviewed in [37, 42]) have suggested that histone and protein biotinylation mediate biotin's actions on gene expression. Biotin has been found attached to histone proteins in a site-specific manner in several types of cells [37], which led investigators to suggest that biotin could act as a regulatory molecule for gene expression [43]. Histone biotinylation was found at lysine residues (K). Three sites were found in histone H3 (K4, K9, K18), and possible K23 [44, 45]. Two sites in histone H4: K8 and K12 [43, 46]. As well, evidence exist that K9, K13, K125, K127, and K129 in histone H2A are targets for biotinylation in trace amounts [47]. The studies supporting this view, relay on the *in vitro* biotinylation of synthetic peptides representing histone C- or N- terminal tails, and further immunoblotting with streptavidin. However, studies by Bailey *et al.* [48] and Healy *et al.* [49] have reservations about the role of histone biotinylation in the effects of biotin. Bailey *et al.* [48] demonstrated that streptavidin interacts with histones independently of biotin binding. In addition, these authors analyzed in cell lines biotin radiolabeled incorporation into biotinylated proteins, showing that radioactivity was detected on carboxylases and only very low biotin (<0.03%) was bound to histones in the nucleus. Same conclusion was obtained by Healy *et al.* [49], who tested a number of methods in HeLa cell line, named radiolabel biotin incorporation, histone Western blot analysis with avidin conjugates, anti-biotin, and anti-biotinylated histone peptide antibodies and mass spectrometry, finding that while biotin could be detected on carboxylases or histones biotinylated *in vitro*, biotin attachment on cell native histones could not be detected, while they were consistently able to found acetylation, methylation and phosphorylation in native histones with each of these methods. Furthermore, histone biotinylation was absent in chromatin from quiescent and proliferative cells [49]. Reconsidering their previous interpretations [37, 42], Zempleni *et al.* performed experiments addressing histone biotinylation concluding that biotinylation is a natural, albeit rare, histone modification [50]. Challenging these results, recent studies *in vivo* have found that histone isolated from nuclear fractions of epididymal fat pads contained detectable biotinylated histones, and their expression varied between wild type and mice with a dominant-negative mutation that disrupts endogenous NAD-dependent protein deacetylase (SIRT1) activity [17], yet these studies used streptavidin-HRP conjugate.

Interestingly, emerging evidence suggests that histone protein biotinylation is not the only mechanism for biotin's

effects [42]. A mass spectrometry screening study identified proteins other than histones that were modified by covalent binding of biotin; among them were members of the heat shock superfamily of proteins, including heat shock protein 72 (HSP72) [51].

2.3. Effects of Pharmacological Concentrations of Biotin on Glucose Metabolism

Numerous investigations [27, 28, 52, 53] have reported that acute administration of biotin positively affects the activity of enzymes that promote glucose utilization in the liver. Pharmacological concentrations of biotin increase hepatic glucokinase mRNA expression and activity [21, 27]. The activities of pyruvate kinase and phosphofructokinase-1 augmented after 24 h of acute doses of biotin (1 and 2 mg/kg body weight) in diabetic rats [52]; in contrast, studies in our laboratory found that in normal mice, eight weeks of a biotin-supplemented diet [97.7 mg of free biotin/kg diet; i.e., 13.5 mg/kg body weight] diminished the mRNA levels of pyruvate-kinase and phosphofructokinase-1 and had no effect on glucokinase mRNA expression [54]. Nonetheless, our studies did not investigate the activities of these enzymes. These diverging results concerning the response to biotin may be explained by the fact that mRNA levels are not necessarily reflected by enzyme activity; other explanations include variations in dose and administration mode (chronic vs. acute) or species differences, as found in other investigations [55-57].

In animal models of diabetes, biotin decreases liver expression of genes that regulate gluconeogenesis [58, 59], a pathway that synthesizes glucose and thus opposes its utilization. In streptozotocin-treated rats, the mRNA abundance of phosphoenolpyruvate carboxykinase was diminished 2 h after intraperitoneal (i.p.) injection of 1 mg biotin/kg body weight [59]. The decreasing effect of biotin on phosphoenolpyruvate carboxykinase expression was also observed in other gluconeogenic genes, such as glucose-6-phosphatase, and the transcription factors FoxO-1 and HNF-4-alpha and [58]. Notably, the negative effects of biotin on gluconeogenic genes, such as phosphoenolpyruvate carboxykinase or the transcription factor FoxO1, were not observed in fasted non-diabetic animals [54, 60]. These results indicate that the pharmacological effects of biotin can vary, depending on the metabolic status.

Biotin has positive actions on endocrine pancreatic function, gene expression, and insulin secretion [36, 61-63]. Several investigations by our group [63] and others [61, 62] consistently found that *in vitro* acute exposure to pharmacological doses of biotin increases glucose-stimulated insulin release. Our group found that biotin concentrations of 10 to 1000 nM increased mRNA levels and glucokinase activity in cultured pancreatic islets isolated from normal rats [63]; glucokinase regulates insulin release in response to variations in blood glucose levels. As described above, the mechanism by which biotin increases glucokinase mRNA levels involves cGMP/PKG signaling, which, by an unknown mechanism, increases intracellular ATP and thus elicits insulin secretion. Insulin, in an autocrine manner, activates PI3K/Akt signaling, which increases pancreatic

glucokinase mRNA expression [36]. Biotin also increased pancreatic glucokinase, but not insulin secretion, in the insulinoma RIN 1046-38 cell line [64]; however, the differences between that study and those previously described rely on the inability of this cell line to release insulin in response to glucose.

The positive effects of pharmacological concentrations of biotin *in vitro* were also observed *in vivo* [65]. In mice, biotin supplementation increased insulin secretion and the mRNA abundance of a number of transcription factors regulating insulin transcription and secretion (including Foxa2, Pdx1, and Hnf4a), glucokinase, insulin, Cacna1d, and acetyl-CoA carboxylase [65]. Biotin supplementation also enlarged islet size, but this effect was not related to insulin sensitivity or weight gain [65]. Unexpectedly, biotin supplementation modified islet architecture, increasing the percentage of islets with alpha-cells at the islet core; this effect was associated with decreased mRNA expression of Ncam1, an adhesion protein participating in islet architecture maintenance [65].

Other essential proteins involved in glucose metabolism, such as the insulin receptor [20] and the receptor transduction protein IRS-1 [33], are modified by biotin. In the human hepatoblastoma cell line HuH-7, biotin restriction decreases insulin receptor protein synthesis and repletion of biotin restored insulin receptor expression [20]. The rapid induction of insulin receptor protein synthesis without an increase in mRNA abundance supports that the effect of biotin is produced post-transcriptionally. The protein expression of IRS-1 is also modified in response to biotin [33]; in the liver, muscle, and kidney of rats with diabetes induced by streptozotocin and high-fat diet, 10 weeks of biotin supplementation, alone or in combination with chromium picolinate, increased the phosphorylated, active form of IRS-1 [33].

Consistent with the effects of biotin on glucose metabolism enzymes, the insulin receptor, and insulin secretion, pharmacological concentrations of biotin decreased hyperglycemia in some [66-69] but not all [70] studies. In a group of six patients with type 1 diabetes, treatment with 16 mg/day of biotin and the removal of insulin treatment for 1 week lowered blood glucose levels from 266±34 to 126±7 [66]. In other studies, the daily administration of biotin (40 µg/kg body weight; i.e., approximately 2-2.8 mg/individual weighting 50-70 kg) and insulin over 3 months to type 1 diabetic patients significantly decreased fasting blood sugar and glycosylated hemoglobin levels, compared to the group that received insulin plus placebo [69]. In 43 patients with type 2 diabetes, a decrease of about 45% in fasting blood glucose concentrations was observed after one month of treatment with oral doses of 9 mg biotin/day [68]. For 3 of 4 patients undergoing hemodialysis [67], 50 mg of biotin (intravenous (i.v.)) post-dialysis during 2 weeks and 2 months ameliorated glucose intolerance. However, studies at our laboratory [70] did not find significant differences between mildly hyperglycemic type-2 diabetic patients treated with 15 mg biotin/day during 28 days.

In rodent animal models of diabetes, biotin supplementation also decreased blood glucose levels. In KK mice, a genetic

model of diabetes with insulin resistance and mild hyperglycemia [71], administration of 2 and 4 mg of biotin/kg body weight for 10 weeks decreased post-prandial glucose concentrations and improved both glucose tolerance and insulin sensitivity [71]. In type 2 diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats, biotin ameliorated glucose tolerance [72]. In rats with diabetes induced by a high-fat diet and streptozotocin, biotin supplementation, alone (300 µg/kg body weight per day for 10 weeks) or in combination with chromium picolinate (80 µg/kg body weight), increased serum insulin levels [33]; however, other investigation found no effects of biotin (60 µg biotin/kg body weight) on glucose tolerance in either stroke-prone spontaneously hypertensive rats or non-diabetic rats [41]. The low biotin amount used in this study may explain for the disagreement with other studies.

2.4. Effects of Pharmacological Concentrations of Biotin on Lipid Metabolism

Investigations have shown that biotin possesses hyperlipidemic effects. In healthy humans, 0.9 mg/day biotin supplementation modified serum lipid levels [73]. In patients with hypercholesterolemia, daily administration of 5 mg of biotin for 4 weeks diminished serum cholesterol concentrations [74]. In both normal (n=15) and type 2 diabetic patients (n=18) with hypertriglyceridemia, supplementation with 5 mg of biotin three times per day for 28 days lowered serum triglyceride and very-low-density lipoproteins (VLDLs) levels [75]. In hypercholesterolemic type 2 diabetes mellitus patients, biotin, in combination with chromium picolinate (2 mg/600 µg daily for 90 days), diminished serum triglyceride levels and the LDL/HDL cholesterol ratio [76]. In 35 individuals with type 1 diabetes, daily administration of biotin (40 µg/kg body weight; i.e., approximately 2-2.8 mg/individual weighting 50-70 kg) and insulin over 3 months reduced the total cholesterol, VLDL, and plasma triglyceride levels, compared to the control group (n=35) treated with insulin plus placebo [69].

The hypotriglyceridemic actions of biotin observed in humans were also found in animal models. In normal mice, 8 weeks of a biotin-supplemented diet (13.5 mg/kg body weight) diminished serum triglyceride concentrations [54]. In rats with diabetes induced by streptozotocin and a high-fat diet, biotin (300 µg/kg body weight per day for 10 weeks), reduced blood triglyceride, total cholesterol, and non-esterified fatty acid levels [33].

The hypotriglyceridemic effects of pharmacological concentrations of biotin on lipemia are associated with diminished lipogenic gene expression in the liver and adipose tissues [54]. Studies in our laboratory revealed that biotin, in normal mice with eight weeks of biotin supplementation in the diet, decreased the mRNA abundance of the lipogenic transcription factor sterol regulatory element binding protein 1-c (SREBP-1c) in the liver and the mRNA abundance of proteins whose transcription is regulated by this factor, such as pyruvate kinase, acetyl-CoA carboxylase-1, and fatty acid synthase [54]. Similar negative effects on SREBP-1c, fatty acid synthase and acetyl-CoA carboxylase-1, were observed in streptozotocin-treated rats 2 h after an acute i.p. injection of 1 mg biotin/kg body weight [58].

In adipose tissue, dietary biotin supplementation [54] decreased the mRNA levels of SREBP1c, acetyl-CoA carboxylase-1, fatty acid synthase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, phosphofructokinase-1, and PPAR-gamma. In contrast, in the adipose tissue of rats with diabetes produced by streptozotocin and high-fat diet, 10 weeks of biotin administration increased the protein abundance of PPAR-gamma [33]. It is noteworthy that biotin analogues modify PPAR-gamma expression and adipogenesis in the 3T3-L1 cell line [77], suggesting that biotin participates in adipogenesis.

Studies in our laboratory investigated the signaling pathways and post-transcriptional actions by which pharmacological concentrations of biotin reduce lipogenesis [32, 34]; the results revealed that dietary biotin supplementation over 8 weeks augmented cGMP and active AMPK levels in the liver. In harmony with this effect, the abundance of the mature form of SREBP-1c diminished and the inactive phosphorylated form of acetyl-CoA carboxylase-1 increased. Similarly, in the adipose tissue, both the active form of AMPK protein and the inactive phosphorylated form of acetyl-CoA carboxylase-1 increased after biotin supplementation [32].

The pharmacological effects of biotin on lipid metabolism pathways, other than lipogenesis, are less explored. Pharmacological concentrations of the vitamin might affect fatty acid oxidation in adipose tissue, since the abundance of the active form of acetyl-CoA carboxylase-2 increased in response to dietary biotin supplementation [34]. Biotin supplementation did not observably affect lipolysis in epididymal adipose tissue from mice fed a biotin-supplemented diet over 8 weeks [34].

2.5. Effects of Pharmacological Concentrations of Biotin on Hypertension

Pharmacological concentrations of biotin have an antihypertensive effect in stroke-prone spontaneously hypertensive rats [41]. Eight weeks of biotin intake in water (approximately 1.2 mg/kg body weight) diminished coronary arterial thickening, reduced systolic blood pressure, and diminished the incidence of salt-induced stroke [41]. The anti-hypertensive effect of biotin was also produced 6-10h after a single i.p. dose of 0.5 or 5 mg of biotin [41]. Inhibition of soluble guanylate cyclase suppressed the hypotensive action, while inhibition of nitric oxide production had no effect on biotin action [41]. These results suggest that biotin decreased blood pressure via a nitric oxide-independent direct activation of soluble guanylate cyclase [41].

2.6. Effects of Pharmacological Concentrations of Biotin on Reproductive Functions

Biotin supplementation modifies reproductive features. The group of Simmins and Brooks [78, 79] reported that biotin supplementation in the diet (350 µg/kg diet) augmented the annual productivity of sows, returned the sows to estrus sooner, and resulted in earlier pregnancy than sows on control diets (32 µg/kg diet) [78-80]. Other studies indicated that biotin supplementation (330 µg biotin

added/kg feed) during gestation and lactation increased the number of pigs [81]; however, other studies that tested diets supplemented with either 440 µg d-biotin/kg throughout the sow reproductive cycle [82] or 550 µg/kg [83] during gestation and lactation did not find any beneficial effects. The discrepancy of the effects may be due to the total biotin availability present in the base diet; beneficial effects [78-80] were observed with sow diets based on wheat, a cereal with low biotin availability [84], while no effects [82, 83] were observed in corn-based diets, whose biotin availability is about 100%.

Biotin positively affected milk production. In cows, biotin (10-20 mg/day) augmented milk production [85-88]. First-lactation heifers needed fewer inseminations per pregnancy and took fewer days from calving to conception when biotin was added to their diet than controls of the same parity [87]. Also, 10 mg biotin/day/cow reduced the occurrences of retained placenta and endometritis puerperalis [88]. In support of the beneficial effects of biotin on milk production, two recent reviews [89, 90] evaluated the effectiveness of biotin supplementation on milk yield and concluded that biotin supplements increased milk production with no significant effects on the percentages of milk fat and protein.

In young broiler breeder hens (30-33 weeks of age), biotin supplementation in drinking water increased egg production and the fertility rate, but not hatchability or hatchling quality [91].

Biotin supplementation (10 nM) in human spermatozoa augmented motility and prolonged the survival of frozen-thawed semen samples [92], suggesting that the vitamin may have benefits in assisted reproduction [92]. In contrast, weaned rats fed a diet containing 1% biotin (10 g biotin/kg diet; 990 mg/kg body weight/day) for 6 weeks, had decreased total sperm counts and seminiferous tubule diameters [93] compared to pair-fed rats; however, the biotin-supplemented rats showed impaired body weight gain, decreased food intake, and negatively affected liver and kidney weights, and this magnitude of biotin intake is above the reported tolerable upper intake level of the vitamin [94], so it is plausible that the testis changes that resulted from the extremely high concentration of biotin are the result of systemic toxic effects.

In other studies, high amounts of biotin negatively affected female reproduction. Biotin excess reduces fertility in hide beetles (*Dermestes maculatus*) [95], flies [96], and mosquitoes [97]. In rats, an acute dose of biotin (10 mg/100 g body weight) in two subcutaneous injections, when given to a rat on days one and two of pregnancy, caused the resorption of fetuses and placentae, and biotin-treated pregnant rats failed to maintain normal levels of uterine weight, glycogen, protein, and hepatic protein, concomitant with the loss of pregnancy [98, 99]. Furthermore, atrophy of the corpus luteum and ovary stroma and leukocyte infiltration into the vaginal lumen were found in rats with acute i.p. treatment of 50 mg of biotin [100]. In contrast, a similar treatment did not affect the reproduction or incidence of fetuses with external malformations in ICR mice [101], indicating that mice are more resistant to biotin excess than

rats. Studies in our laboratory in BalbC mice fed a biotin-supplemented diet (97.7mg biotin/kg body weight/day) for 9 weeks [102] showed elevated serum estradiol concentrations without changes in progesterone concentrations, compared to the control group. Morphological analysis found a decrease in both Graafian and ovarian primary follicle numbers [102]. In contrast to the observations of Paul *et al.* [100], who found alterations of the atrophy of the corpora lutea and estrous cycle caused by acute biotin treatment in rats, our data did not reveal significant modifications in the estrous cycle or the number of corpora lutea in the ovary. In cows, biotin (10mg/day/cow) suppressed ovulation and estrous symptoms, and the cows showed low levels of progesterone on days 15, 21, and 45 after calving [88].

2.7. Effects of Pharmacological Concentrations of Biotin on Development

The effects of pharmacological concentrations of biotin on development are controversial [101, 103]. In pregnant mice receiving excessive amounts of biotin (50 mg), there was no increased incidence of fetuses with external malformations [101], but administration of moderately elevated levels of biotin (100 pmol) to early embryonic chick eyes affected retinal and lens structures [103]; the effects were restricted to embryos treated between Hamburger and Hamilton stages 14-17. Similar effects were found with the biotin analogue, biocytin, while avidin inhibited those effects. The mechanism is related to apoptosis without affecting proliferation. These results reveal, for the first time, that adequate biotin concentration and precise regulation of retinal cell death are involved in eye morphogenesis [103].

2.8. Effects of Pharmacological Concentrations of Biotin on Immune Functions and Inflammation

Several studies have found that biotin supplementation affects immune functions and cytokines expression (revised in [104]). In healthy donors, oral administration of 0.75 mg of biotin for 14 days decreased mitogen-stimulated peripheral blood mononuclear cell proliferation [105] and the secretion of interleukin-1beta and interleukin-2, compared to the levels found before supplementation [105]. In another study, in peripheral blood mononuclear cells isolated from healthy adults before and after supplementation with 1.95 mg biotin/d for 21 d, the interferon-gamma and interleukin-1beta mRNAs were 4.3 and 5.6 times more abundant, respectively, after treatment with biotin than at day 0, whereas interleukin-4 mRNA expression decreased after biotin supplementation [106]. Similar to observations in peripheral blood mononuclear cells, Jurkat cells exposed to 10 nM biotin had decreased IL-2 secretion into the culture media [107]. In agreement with studies by Wiedmann [106] that found increased IL-1b production of human peripheral blood after biotin supplementation, *in vivo* studies in mice found that biotin reduced ear swelling in nickel allergy through interleukin-1beta production [108]. In rats with hyperglycemia produced by streptozotocin and high-fat diet, the expression of the active form of NF-kB, a transcription factor involved in cellular responses to diverse inflammation stimuli, including free radicals, decreased in both liver and kidney [33]. Novel studies found that non-carboxylase

biotinylated proteins induce chemokine production [51]. These discoveries indicate that biotin has uses in the treatment of immune/inflammatory diseases; however, its efficacy remains to be proved in inflammatory conditions in humans.

2.9. Effects of Pharmacological Concentrations of Biotin on Foot Pad Dermatitis

Foot pad dermatitis is a common condition in poultry production and represents a welfare problem [109]. Some studies have shown that biotin supplementation protects against this condition [110-112], while others failed to prove this effect [113]. Turkey poult fed a commercial diet containing 250 µg of biotin/kg showed a 53% incidence of foot pad dermatitis, whereas foot pad dermatitis decreased to 5% when this diet was supplemented with 400 µg biotin/kg of diet [111]. Very high concentrations of biotin (2,000 µg/kg of diet) reduced the severity of foot pad lesions, compared to commercial diets containing 300 µg biotin/kg [112]. Turkeys fed 2,000 µg/kg of diet plus 47 mg Zn/kg of diet for 4 weeks had decreased development and severity of foot pad dermatitis on fresh dry litter (25% moisture), but not on 73% moisture litter [110]. Another report indicates that biotin supplementation (2,000 µg/kg of diet) above the normal recommendations for broilers (300 µg) reduces the severity of this condition, despite continuous exposure to wet litter [109]. Contrary to these findings, studies analyzing biotin supplementation (200, 800, and 1600 µg/kg) on macroscopic and histological features [113] found that the vitamin did not prevent dermatitis in growing turkeys [113].

2.10. Effects of Pharmacological Concentration of Biotin on the Cytochrome P4501 Subfamily

The effects of pharmacological concentrations of biotin on the expression and activity of the cytochrome P4501A subfamily have been explored. Rodriguez-Melendez *et al.* [114] found that, in Jurkat cells, the levels of CYP1B1 mRNA and the transcriptional activity of a CYP1B1 reporter gene, was greater in biotin-supplemented cells than in biotin-deficient cells [114]; unfortunately, this study did not analyze CYP1B1 expression at physiological concentrations of the vitamin. A study by Ronquillo *et al.* [115] found that Wistar rats treated with biotin (2 mg/kg body weight) for 1, 3, 5, or 7 days of treatment showed no effects on CYP1A activity, even when co-treated with CYP1A inducers; the CYP1A2 activity levels were not statistically significant. However, in mice, two months of biotin supplementation in the diet (16.6 mg/kg body weight/day) increased the activity of CYP1A2 [102]. These contrasting responses to biotin may be explained by variations in dose, administration, or responses to biotin between species, as demonstrated by other authors [56].

2.11. Adverse Effects of Pharmacological Concentrations of Biotin

Few studies have addressed biotin toxicity. In humans, no adverse effects were found for treatments in the range of 0.25 to 50 mg of biotin for up to 40 days, delivered either orally, intravenously or intramuscularly, [116]. Oral doses up

to 100 mg biotin/d to holocarboxylase synthetase- and biotinidase-deficient patients did not result in adverse effects [117]. Studies in diabetic patients found that 9 mg of biotin daily did not induce clinical aggravation or undesirable side effects over an extended period of 48 months [68]. No adverse effects were found with intravenous administration of 50 mg biotin three times per week for up to two months in patients undergoing hemodialysis [67]. Biotin doses 50- to 100-fold of the daily requirements were well tolerated for 1-2 years in patients suffering from diabetic peripheral neuropathy [118].

Given the ethical concerns in the study of biotin toxicity in humans, the studies addressing this issue have been addressed in classical tests, such as the Ames test [119-121], and testing in rodents [116, 122]. In the Ames test, 10 mg biotin in dimethyl sulfoxide/plate showed that biotin was not toxic or mutagenic [121]. In the RK bacterial test, biotin (1 mg/ml) showed no mutagenic effects [119]. In contrast, a Tradescantia-Micronucleous test revealed that biotin was indeed mutagenic, with a minimum effect dose of 244.3 mg/ml [120].

Biotin's oral and i.p. LD₅₀ acute toxicity values reported for rats are 354 and 29 mg/kg body weight, respectively [122]. For mice, biotin's intravenous LD₅₀ for mice is 1000 mg/kg body weight [122]. The reported LD₅₀ for repeated 10-day oral administration of biotin in rats was 350 mg/kg body weight, but those studies did not provide sufficient detail [116]. Sawamura *et al.* [94] found that 3-week-old Wistar rats fed diets of 800 mg biotin/kg (79.2 mg biotin/kg body weight/d) to 10,000 mg/kg (990 mg biotin/kg body weight/day) for 28 days had decreased food intake and body weight gain without changes in brain weight. Diarrhea was observed in rats fed a 5,000 mg biotin/kg diet (495 mg biotin/kg body weight/d) [94], one rat in four died with a 8,000 mg/kg diet (792 mg biotin/kg body weight/d), and two in four rats died with a 10,000 mg/kg diet [94]. Excess biotin did not affect the urinary excretion of other water-soluble vitamins [94]. In another study, a 1,000 mg biotin/kg diet (99 mg biotin/kg body weight/d) did not affect body weight or food intake in rats [93]; biochemical toxicity parameters, such as creatinine, blood urea nitrogen, alanine aminotransferase, and aspartate aminotransferase, were not affected by a 100 to 10,000 mg biotin /kg diet [93], although the 10,000 mg biotin/kg diet decreased body weight, food intake, and liver and kidney weight. In streptozotocin-treated diabetic rats, serum levels of urea, creatinine, aspartate aminotransferase, and alanine aminotransferase and liver and kidney levels of malondialdehyde decreased in biotin-supplemented rats, compared to diabetic controls [33].

Although biotin administration is considered safe [116], investigations to assess its toxicity need to be cautiously addressed in light of the fact that pharmacological concentrations of biotin have pleiotropic effects.

3. FINAL REMARKS

It is currently well established by hundred of reports that pharmacological concentrations of biotin modify gene expression and biological functions (Fig. 2). The signaling pathway, the GMP/PKG cascade, is currently the best-

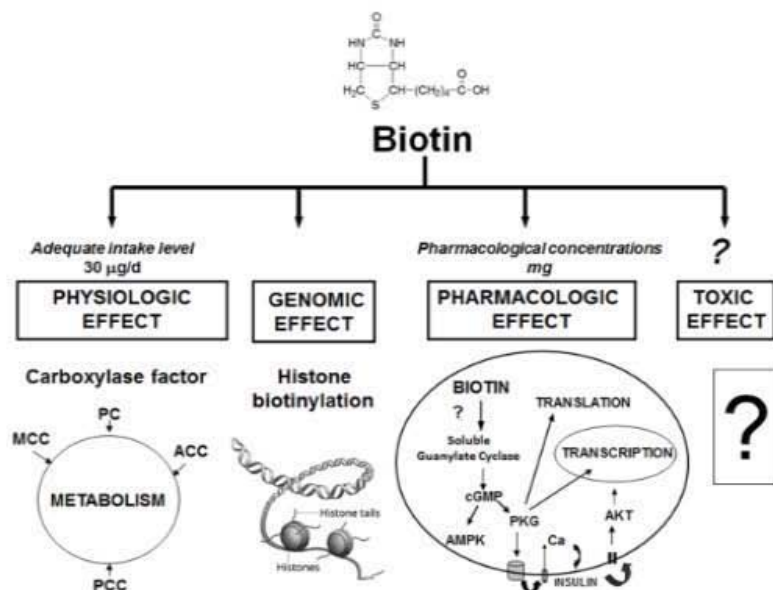


Fig. (2). Multiple actions of biotin. 1) The classical function of biotin is to act as a carboxyl carrier in carboxylation reactions. 2) At the genomic level, histone biotinylation is a natural, albeit rare, modification. 3) cGMP/PKG signaling is involved in transcription and translation. 4) Few studies have addressed the toxic effects of excess biotin.

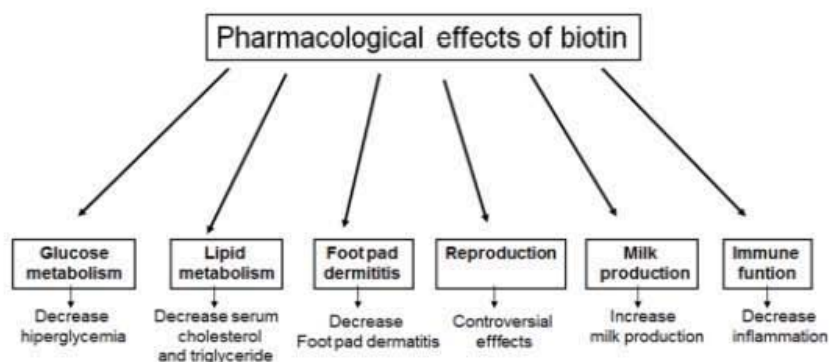


Fig. (3). Pharmacological effects of biotin. The effects of pharmacological concentrations of biotin have the potential to be used as a therapeutic strategy: the effects of biotin on glucose and lipid metabolism indicate its potential for preventing or managing diabetes and metabolic syndrome. The beneficial effects of biotin in milk production and foot pad dermatitis indicate that biotin can be useful in animal farming. Regarding its action on immune functions, the studies suggest that biotin might be used in the treatment of inflammatory disorders, although its efficacy in treating inflammatory conditions in humans remains to be proved. The effects on reproduction remain controversial.

supported mechanism to explain the effects of biotin on gene expression. The fact that this mechanism is able to regulate the gene expression of the enzymes involved in its function as a cofactor, depending on the availability of biotin [18, 19], suggest that biotin gene regulation is an endogenous function. Nevertheless, since pharmacological concentrations of biotin are unlikely to be attained in the diet, it opens the question whether its effects are achieved by binding to targets in a non-natural manner, as in the case of the receptor-mediated pharmacological effects of niacin. To date, this possibility has not been investigated; however, the report indicating the existence of a membrane receptor to biotin is an interesting observation that leaves this door open.

As reviewed in the present report, the effects of pharmacological concentrations of biotin have the potential

to be used as a therapeutic strategy: the effects of biotin on hypertension and glucose and lipid homeostasis indicate its potential for promoting vascular health and preventing or managing diabetes. The beneficial effects of biotin in milk production and foot pad dermatitis indicate that biotin can be useful in animal farming. Regarding its action on immune functions, the studies suggest that biotin might be used in the treatment of inflammatory disorders, although its efficacy in treating inflammatory conditions in humans remains to be proved (Fig. 3). Further studies to evaluate biotin toxicity and its actions on diverse biological functions, in the light of the effects of pharmacological concentrations of biotin to modify tissue structure and size, reproductive functions, and development, will be required to determine its use as a therapeutic agent.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest associated with this manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to I. Bt. Jonathan Alcántar Fernández for computer assistance and to M. en C. Betzabé Linares Ferrer for computer assistance. This work was supported by grants from CONACyT: 219787, from Fondos Federales 074/2013, and from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico: IN 210714 Universidad Nacional Autónoma de México.

REFERENCES

- Zempleni, J., Uptake, localization, and noncarboxylase roles of biotin. *Annu Rev Nutr* **2005**, *25*, 175-96.
- Kirkland, J. B., Niacin status, NAD distribution and ADP-ribose metabolism. *Curr Pharm Des* **2009**, *15* (1), 3-11.
- Fernandez-Mejia C, A. M. A., Ibarra González I, Fernandez-Lainez C. The Chemistry and Biochemistry of Niacin (B3). In *Foods and Nutritional Components*. Royal Society of Chemistry, K. C. L., Ed. Victor R. Preedy.: London, 2012; Vol. 1, pp 108-126.
- Al-Mohaisen, M. A.; Pun, S. C.; Frohlich, J. J., Niacin: from mechanisms of action to therapeutic uses. *Mini Rev Med Chem* **2010**, *10* (3), 204-17.
- Yates, A. A.; Schlicker, S. A.; Suitor, C. W., Dietary Reference Intakes: the new basis for recommendations for calcium and related nutrients, B vitamins, and choline. *J Am Diet Assoc* **1998**, *98* (6), 699-706.
- Mock, D. M.; Stadler, D. D.; Stratton, S. L.; Mock, N. L., Biotin status assessed longitudinally in pregnant women. *J Nutr* **1997**, *127* (5), 710-6.
- Subramanya, S. B.; Subramanian, V. S.; Kumar, J. S.; Hoiness, R.; Said, H. M., Inhibition of intestinal biotin absorption by chronic alcohol feeding: cellular and molecular mechanisms. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2011**, *300* (3), G494-501.
- Said, H. M.; Redha, R.; Nylander, W., Biotin transport in the human intestine: inhibition by anticonvulsant drugs. *Am J Clin Nutr* **1989**, *49* (1), 127-31.
- Sealey, W. M.; Teague, A. M.; Stratton, S. L.; Mock, D. M., Smoking accelerates biotin catabolism in women. *Am J Clin Nutr* **2004**, *80* (4), 932-5.
- Wolf, B., Disorders of biotin metabolism. In *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, Scriver, C. R.; Beaudet, A. L.; Sly, W. S.; Valle, D.; Childs, B.; Kinsler, K. W.; Vogelstein, B., Eds. McGraw-Hill: New York, 2001; Vol. 2, pp 3935-3962.
- Jitrapakdee, S.; St Maurice, M.; Rayment, I.; Cleland, W. W.; Wallace, J. C.; Attwood, P. V., Structure, mechanism and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem J* **2008**, *413* (3), 369-87.
- Browner, M. F.; Taroni, F.; Sztul, E.; Rosenberg, L. E., Sequence analysis, biogenesis, and mitochondrial import of the alpha-subunit of rat liver propionyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem* **1989**, *264* (21), 12680-5.
- McKean, A. L.; Ke, J.; Song, J.; Che, P.; Achenbach, S.; Nikolau, B. J.; Wurtele, E. S., Molecular characterization of the non-biotin-containing subunit of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem* **2000**, *275* (8), 5582-90.
- Abu-Elheiga, L.; Jayakumar, A.; Baldini, A.; Chirala, S. S.; Wakil, S. J., Human acetyl-CoA carboxylase: characterization, molecular cloning, and evidence for two isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, *92* (9), 4011-5.
- Choi, C. S.; Savage, D. B.; Abu-Elheiga, L.; Liu, Z. X.; Kim, S.; Kulkarni, A.; Distefano, A.; Hwang, Y. J.; Reznick, R. M.; Codella, R.; Zhang, D.; Clinc, G. W.; Wakil, S. J.; Shulman, G. I., Continuous fat oxidation in acetyl-CoA carboxylase 2 knockout mice increases total energy expenditure, reduces fat mass, and improves insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104* (42), 16480-5.
- Shriver, B. J.; Roman-Shriver, C.; Allred, J. B., Depletion and repletion of biotinyl enzymes in liver of biotin-deficient rats: evidence of a biotin storage system. *J Nutr* **1993**, *123* (6), 1140-9.
- Xu, C.; Cai, Y.; Fan, P.; Bai, B.; Chen, J.; Deng, H. B.; Che, C. M.; Xu, A.; Vanhoutte, P. M.; Wang, Y., Calorie Restriction Prevents Metabolic Aging Caused by Abnormal SIRT1 Function in Adipose Tissues. *Diabetes* **2015**, *64* (5), 1576-90.
- Solorzano-Vargas, R. S.; Pacheco-Alvarez, D.; Leon-Del-Rio, A., Holocarboxylase synthetase is an obligate participant in biotin-mediated regulation of its own expression and of biotin-dependent carboxylases mRNA levels in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, *99* (8), 5325-30.
- Pacheco-Alvarez, D.; Solorzano-Vargas, R. S.; Gonzalez-Noriega, A.; Michalak, C.; Zempleni, J.; Leon-Del-Rio, A., Biotin availability regulates expression of the sodium-dependent multivitamin transporter and the rate of biotin uptake in HepG2 cells. *Mol Genet Metab* **2005**, *85* (4), 301-7.
- De La Vega, L. A.; Steckert, R. J., Regulation of the insulin and asialoglycoprotein receptors via eGMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol Cell Physiol* **2000**, *279* (6), C2037-42.
- Chauhan, J.; Dakshinamurti, K., Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats. *J Biol Chem* **1991**, *266* (16), 10035-8.
- Rodriguez-Melendez, R.; Zempleni, J., Regulation of gene expression by biotin (review). *J Nutr Biochem* **2003**, *14* (12), 680-90.
- Fernandez-Mejia C, L.-d.-L.-V.-M., ML., Biological effects of pharmacological concentrations of biotin. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine* **2011**, *16* (1), 40-48.
- Dakshinamurti, K., Biotin--a regulator of gene expression. *J Nutr Biochem* **2005**, *16* (7), 419-23.
- Rodriguez-Melendez, R.; Griffin, J. B.; Zempleni, J., The expression of genes encoding ribosomal subunits and eukaryotic translation initiation factor 5A depends on biotin and bisnorbiotin in HepG2 cells. *J Nutr Biochem* **2006**, *17* (1), 23-30.
- Rodriguez-Melendez, R.; Lewis, B.; McMahon, R. J.; Zempleni, J., Diaminobiotin and desthiobiotin have biotin-like activities in Jurkat cells. *J Nutr* **2003**, *133* (5), 1259-64.
- Dakshinamurti, K.; Cheah-Tan, C., Biotin-mediated synthesis of hepatic glucokinase in the rat. *Arch Biochem Biophys* **1968**, *127* (1), 17-21.
- Spence, J. T.; Koudelka, A. P., Effects of biotin upon the intracellular level of cGMP and the activity of glucokinase in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem* **1984**, *259* (10), 6393-6.
- Wiedmann, S.; Rodriguez-Melendez, R.; Ortega-Cuellar, D.; Zempleni, J., Clusters of biotin-responsive genes in human peripheral blood mononuclear cells. *J Nutr Biochem* **2004**, *15* (7), 433-9.
- Collins, J. C.; Paietta, E.; Green, R.; Morell, A. G.; Steckert, R. J., Biotin-dependent expression of the asialoglycoprotein receptor in HepG2. *J Biol Chem* **1988**, *263* (23), 11280-3.
- Rodriguez-Melendez, R.; Griffin, J. B.; Sarath, G.; Zempleni, J., High-throughput immunoblotting identifies biotin-dependent signaling proteins in HepG2 hepatocarcinoma cells. *J Nutr* **2005**, *135* (7), 1659-66.
- Aguilera-Mendez, A.; Fernandez-Mejia, C., The hypotriglyceridemic effect of biotin supplementation involves increased levels of cGMP and AMPK activation. *Biofactors* **2012**, *38* (5), 387-94.
- Sahin, K.; Tuzcu, M.; Orhan, C.; Sahin, N.; Kucuk, O.; Ozercan, I. H.; Juturu, V.; Komorowski, J. R., Anti-diabetic activity of chromium picolinate and biotin in rats with type 2 diabetes induced by high-fat diet and streptozotocin. *Br J Nutr* **2013**, *110* (2), 197-205.
- Boone-Villa, D.; Aguilera-Mendez, A.; Miranda-Cervantes, A.; Fernandez-Mejia, C., Effects of Biotin Supplementation in the Diet on Adipose Tissue cGMP Concentrations, AMPK Activation, Lipolysis, and Serum-Free Fatty Acid Levels. *J Med Food* **2015**, *18* (10), 1150-1156.
- Vesely, D. L., Biotin enhances guanylate cyclase activity. *Science* **1982**, *216* (4552), 1329-30.

- [36] Vilches-Flores, A.; Tovar, A. R.; Marin-Hernandez, A.; Rojas-Ochoa, A.; Fernández-Mejía, C., Biotin increases glucokinase expression via soluble guanylate cyclase/protein kinase G, adenosine triphosphate production and autocrine action of insulin in pancreatic rat islets. *J Nutr Biochem* **2010**, *21* (7), 606-12.
- [37] Hassan, Y. I.; Zempleni, J., A novel, enigmatic histone modification: biotinylation of histones by holocarboxylase synthetase. *Nutr Rev* **2008**, *66* (12), 721-5.
- [38] Vesely, D. L.; Kemp, S. F.; Elders, M. J., Isolation of a biotin receptor from hepatic plasma membranes. *Biochem Biophys Res Commun* **1987**, *143* (3), 913-6.
- [39] Vesely, D. L.; Wormser, H. C.; Abramson, H. N., Biotin analogs activate guanylate cyclase. *Mol Cell Biochem* **1984**, *60* (2), 109-14.
- [40] Rodríguez-Melendez, R.; Zempleni, J., Nitric oxide signaling depends on biotin in Jurkat human lymphoma cells. *J Nutr* **2009**, *139* (3), 429-33.
- [41] Watanabe-Kamiyama, M.; Kamiyama, S.; Horiuchi, K.; Ohinata, K.; Shirakawa, H.; Furukawa, Y.; Komai, M., Antihypertensive effect of biotin in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Br J Nutr* **2008**, *99* (4), 756-63.
- [42] Zempleni, J.; Liu, D.; Camara, D. T.; Cordonier, E. L., Novel roles of holocarboxylase synthetase in gene regulation and intermediary metabolism. *Nutr Rev* **2014**, *72* (6), 369-76.
- [43] Pestinger, V.; Wijeratne, S. S.; Rodríguez-Melendez, R.; Zempleni, J., Novel histone biotinylation marks are enriched in repeat regions and participate in repression of transcriptionally competent genes. *J Nutr Biochem* **2011**, *22* (4), 328-33.
- [44] Kobza, K.; Camporeale, G.; Rueckert, B.; Kueh, A.; Griffin, J. B.; Sarath, G.; Zempleni, J., K4, K9 and K18 in human histone H3 are targets for biotinylation by biotinidase. *The FEBS journal* **2005**, *272* (16), 4249-59.
- [45] Kobza, K.; Sarath, G.; Zempleni, J., Prokaryotic BirA ligase biotinylates K4, K9, K18 and K23 in histone H3. *BMB reports* **2008**, *41* (4), 310-5.
- [46] Camporeale, G.; Shubert, E. E.; Sarath, G.; Cerny, R.; Zempleni, J., K8 and K12 are biotinylated in human histone H4. *European journal of biochemistry / FEBS* **2004**, *271* (11), 2257-63.
- [47] Camporeale, G.; Giordano, E.; Rendina, R.; Zempleni, J.; Eissenberg, J. C., Drosophila melanogaster holocarboxylase synthetase is a chromosomal protein required for normal histone biotinylation, gene transcription patterns, lifespan, and heat tolerance. *J Nutr* **2006**, *136* (11), 2735-42.
- [48] Bailey, L. M.; Ivanov, R. A.; Wallace, J. C.; Polyak, S. W., Artifacts detection of biotin on histones by streptavidin. *Anal Biochem* **2008**, *373* (1), 71-7.
- [49] Healy, S.; Perez-Cadahia, B.; Jia, D.; McDonald, M. K.; Davie, J. R.; Gravel, R. A., Biotin is not a natural histone modification. *Biochim Biophys Acta* **2009**, *1789* (11-12), 719-33.
- [50] Kuroishi, T.; Rios-Avila, L.; Pestinger, V.; Wijeratne, S. S.; Zempleni, J., Biotinylation is a natural, albeit rare, modification of human histones. *Mol Genet Metab* **2011**, *104* (4), 537-45.
- [51] Xue, J.; Zhou, J.; Zempleni, J., Holocarboxylase synthetase catalyzes biotinylation of heat shock protein 72, thereby inducing RANTES expression in HEK-293 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **2013**, *305* (12), C1240-5.
- [52] Dakshinamurti, K.; Tarrago-Litvak, L.; Hong, H. C., Biotin and glucose metabolism. *Can J Biochem* **1970**, *48* (4), 493-500.
- [53] Dakshinamurti, K.; Litvak, S., Biotin and protein synthesis in rat liver. *J Biol Chem* **1970**, *245* (21), 5600-5.
- [54] Larrieta, E.; Velasco, F.; Vital, P.; Lopez-Aceves, T.; Lazo-de-la-Vega-Monroy, M. L.; Rojas, A.; Fernández-Mejía, C., Pharmacological concentrations of biotin reduce serum triglycerides and the expression of lipogenic genes. *Eur J Pharmacol* **2010**, *644* (1-3), 263-8.
- [55] Rabin, B. S., Inhibition of experimentally induced autoimmunity in rats by biotin deficiency. *J Nutr* **1983**, *113* (11), 2316-22.
- [56] Watanabe, T.; Endo, A., Species and strain differences in teratogenic effects of biotin deficiency in rodents. *J Nutr* **1989**, *119* (2), 255-61.
- [57] Ureta, T.; Gonzalez, C.; Lillo, S.; Niemeyer, H., Comparative studies on glucose phosphorylating isoenzymes of vertebrates. I. The influence of fasting and the nature of the diet on liver glucokinase and hexokinases of rodents. *Comp Biochem Physiol B* **1971**, *40* (1), 71-80.
- [58] Sugita, Y.; Shirakawa, H.; Sugimoto, R.; Furukawa, Y.; Komai, M., Effect of biotin treatment on hepatic gene expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biosci Biotechnol Biochem* **2008**, *72* (5), 1290-8.
- [59] Dakshinamurti, K.; Li, W., Transcriptional regulation of liver phosphoenolpyruvate carboxylase by biotin in diabetic rats. *Mol Cell Biochem* **1994**, *132* (2), 127-32.
- [60] Ferreira, G.; Weiss, W. P., Effect of biotin on activity and gene expression of biotin-dependent carboxylases in the liver of dairy cows. *J Dairy Sci* **2007**, *90* (3), 1460-6.
- [61] Sone, H.; Ito, M.; Sugiyama, K.; Ohneda, M.; Maebashi, M.; Furukawa, Y., Biotin enhances glucose-stimulated insulin secretion in the isolated perfused pancreas of the rat. *J Nutr Biochem* **1999**, *10* (4), 237-43.
- [62] Sone, H.; Ito, M.; Shimizu, M.; Sasaki, Y.; Komai, M.; Furukawa, Y., Characteristics of the biotin enhancement of glucose-induced insulin release in pancreatic islets of the rat. *Biosci Biotechnol Biochem* **2000**, *64* (3), 550-4.
- [63] Romero-Navarro, G.; Cabrera-Valladares, G.; German, M. S.; Matschinsky, F. M.; Velazquez, A.; Wang, J.; Fernández-Mejía, C., Biotin regulation of pancreatic glucokinase and insulin in primary cultured rat islets and in biotin-deficient rats. *Endocrinology* **1999**, *140* (10), 4595-600.
- [64] Borboni, P.; Magnaterra, R.; Rabini, R. A.; Staffolani, R.; Porzio, O.; Sesti, G.; Fusco, A.; Mazzanti, L.; Lauro, R.; Marlier, L. N., Effect of biotin on glucokinase activity, mRNA expression and insulin release in cultured beta-cells. *Acta Diabetol* **1996**, *33* (2), 154-8.
- [65] Lazo de la Vega-Monroy, M. L.; Larrieta, E.; German, M. S.; Baez-Saldana, A.; Fernández-Mejía, C., Effects of biotin supplementation in the diet on insulin secretion, islet gene expression, glucose homeostasis and beta-cell proportion. *J Nutr Biochem* **2013**, *24* (1), 169-77.
- [66] Coggeshall, J. C.; Hegggers, J. P.; Robson, M. C.; Baker, H., Biotin Status and Plasma Glucose in Diabetics. *Ann N Y Acad Sci* **1985**, *447*, 389-392.
- [67] Koutsikos, D.; Fourtounas, C.; Kapetanaki, A.; Agroyannis, B.; Tzanatos, H.; Rammos, G.; Kopelias, I.; Bosiolis, B.; Bovoletti, O.; Darema, M.; Sallum, G., Oral glucose tolerance test after high-dose i.v. biotin administration in normoglycemic hemodialysis patients. *Ren Fail* **1996**, *18* (1), 131-7.
- [68] Maebashi, M.; Makino, Y.; Furukawa, Y.; Ohinata, K.; Kimura, S.; Sato, T., Therapeutic Evaluation of the Effect of Biotin on Hyperglycemia in Patients with Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus. *J Clin Biochem Nutr* **1993**, *14*, 211-218.
- [69] Hemmati, M.; Babaei, H.; Abdolsalchei, M., Survey of the effect of biotin on glycemic control and plasma lipid concentrations in type 1 diabetic patients in kermanshah in iran (2008-2009). *Oman Med J* **2013**, *28* (3), 195-8.
- [70] Baez-Saldana, A.; Zendejas-Ruiz, I.; Revilla-Monsalve, C.; Islas-Andrade, S.; Cardenas, A.; Rojas-Ochoa, A.; Vilches, A.; Fernández-Mejía, C., Effects of biotin on pyruvate carboxylase, acetyl-CoA carboxylase, propionyl-CoA carboxylase, and markers for glucose and lipid homeostasis in type 2 diabetic patients and nondiabetic subjects. *Am J Clin Nutr* **2004**, *79* (2), 238-43.
- [71] Reddi, A.; DeAngelis, B.; Frank, O.; Lasker, N.; Baker, H., Biotin supplementation improves glucose and insulin tolerances in genetically diabetic KK mice. *Life Sci* **1988**, *42* (13), 1323-30.
- [72] Zhang, H.; Osada, K.; Maebashi, M.; Ito, M.; Komai, M.; Furukawa, Y., 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)* **1996**, *42* (6), 517-26.
- [73] Marshall, M. W.; Kliman, P. G.; Washington, V. A.; Mackin, J. F.; Weinland, B. T., Effects of biotin on lipids and other constituents of plasma of healthy men and women. *Artery* **1980**, *7* (4), 330-51.
- [74] Dokusova, O. K.; Krivoruchenko, I. V., [The effect of biotin on the level of cholesterol in the blood of patients with atherosclerosis and essential hyperlipidemia]. *Kardiologia* **1972**, *12* (12), 113.
- [75] Revilla-Monsalve, C.; Zendejas-Ruiz, I.; Islas-Andrade, S.; Baez-Saldana, A.; Palomino-Garibay, M. A.; Hernandez-Quiroz, P. M.;

- Fernandez-Mejia, C., Biotin supplementation reduces plasma triacylglycerol and VLDL in type 2 diabetic patients and in nondiabetic subjects with hypertriglyceridemia. *Biomed Pharmacother* **2006**, *60* (4), 182-5.
- [76] Albarracin, C.; Fuqua, B.; Geohas, J.; Juturu, V.; Finch, M. R.; Komorowski, J. R., Combination of chromium and biotin improves coronary risk factors in hypercholesterolemic type 2 diabetes mellitus: a placebo-controlled, double-blind randomized clinical trial. *J Cardiometab Syndr* **2007**, *2* (2), 91-7.
- [77] Levert, K. L.; Waldrop, G. L.; Stephens, J. M., A biotin analog inhibits acetyl-CoA carboxylase activity and adipogenesis. *J Biol Chem* **2002**, *277* (19), 16347-50.
- [78] Simmins, P. H.; Brooks, P. H., Supplementary biotin for sows: effect on reproductive characteristics. *Vet Rec* **1983**, *112* (18), 425-9.
- [79] Brooks, P. H.; Smith, D. A.; Irwin, V. C., Biotin-supplementation of diets; the incidence of foot lesions, and the reproductive performance of sows. *Vet Rec* **1977**, *101* (3), 46-50.
- [80] Komegay, E. T., Biotin in swine nutrition. *Ann N Y Acad Sci* **1985**, *447*, 112-21.
- [81] Lewis, A. J.; Cromwell, G. L.; Pettigrew, J. E., Effects of supplemental biotin during gestation and lactation on reproductive performance of sows: a cooperative study. *J Anim Sci* **1991**, *69* (1), 207-14.
- [82] Watkins, K. L.; Southern, L. L.; Miller, J. E., Effect of dietary biotin supplementation on sow reproductive performance and soundness and pig growth and mortality. *J Anim Sci* **1991**, *69* (1), 201-6.
- [83] Hamilton, C. R.; Veum, T. L., Response of sows and litters to added dietary biotin in environmentally regulated facilities. *J Anim Sci* **1984**, *59* (1), 151-7.
- [84] Frigg, M.; Brubacher, G., Biotin deficiency in chicks fed a wheat-based diet. *Int J Vitam Nutr Res* **1976**, *46* (3), 314-21.
- [85] Zimmerly, C. A.; Weiss, W. P., Effects of supplemental dietary biotin on performance of Holstein cows during early lactation. *J Dairy Sci* **2001**, *84* (2), 498-506.
- [86] Majee, D. N.; Schwab, E. C.; Bertics, S. J.; Seymour, W. M.; Shaver, R. D., Lactation performance by dairy cows fed supplemental biotin and a B-vitamin blend. *J Dairy Sci* **2003**, *86* (6), 2106-12.
- [87] Bergsten, C.; Greenough, P. R.; Gay, J. M.; Seymour, W. M.; Gay, C. C., Effects of biotin supplementation on performance and claw lesions on a commercial dairy farm. *J Dairy Sci* **2003**, *86* (12), 3953-62.
- [88] Kinal, S.; Twardon, J.; Bednarski, M.; Pres, J.; Bodarski, R.; Slupczynska, M.; Ochota, M.; Dejneka, G. J., The influence of administration of biotin and zinc chelate (Zn-methionine) to cows in the first and second trimester of lactation on their health and productivity. *Pol J Vet Sci* **2011**, *14* (1), 103-10.
- [89] Lean, I. J.; Rabiee, A. R., Effect of feeding biotin on milk production and hoof health in lactating dairy cows: a quantitative assessment. *J Dairy Sci* **2011**, *94* (3), 1465-76.
- [90] Chen, B.; Wang, C.; Wang, Y. M.; Liu, J. X., Effect of biotin on milk performance of dairy cattle: A meta-analysis. *J Dairy Sci* **2012**, *95* (7), 3537-46.
- [91] Daryabari, H.; Akhlaghi, A.; Zamiri, M. J.; Mianji, G. R.; Pirsaraei, Z. A.; Deldar, H.; Eghbalian, A. N., Reproductive performance and oviductal expression of avidin and avidin-related protein-2 in young and old broiler breeder hens orally exposed to supplementary biotin. *Poult Sci* **2014**, *93* (9), 2289-95.
- [92] Kalthur, G.; Salian, S. R.; Keyvanifard, F.; Sreedharan, S.; Thomas, J. S.; Kumar, P.; Adiga, S. K., Supplementation of biotin to sperm preparation medium increases the motility and longevity in cryopreserved human spermatozoa. *J Assist Reprod Genet* **2012**, *29* (7), 631-5.
- [93] Sawamura, H.; Ikeda, C.; Shimada, R.; Yoshii, Y.; Watanabe, T., Dietary intake of high-dose biotin inhibits spermatogenesis in young rats. *Congenit Anom (Kyoto)* **2015**, *55* (1), 31-6.
- [94] Sawamura, H.; Fukuwatari, T.; Shibata, K., Effects of excess biotin administration on the growth and urinary excretion of water-soluble vitamins in young rats. *Biosci Biotechnol Biochem* **2007**, *71* (12), 2977-84.
- [95] Cohen, E.; Levinson, H. Z., Disrupted fertility of the hidebeetle *Dermestes maculatus* (Deg.) due to dietary overdosage of biotin. *Experientia* **1968**, *24* (4), 367-8.
- [96] Benschoter, C. A., Effect of dietary biotin on reproduction of the house fly. *J Econ Entomol* **1967**, *60* (5), 1326-8.
- [97] Pillai, M. K.; Medhukar, B. V., Effect of biotin on the fertility of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* (L.). *Naturwissenschaften* **1969**, *56* (4), 218-9.
- [98] Paul, P. K.; Duttagupta, P. N., The effect of an acute dose of biotin at the pre-implantation stage and its relation with female sex steroids in the rat. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **1975**, *21* (2), 89-101.
- [99] Paul, P. K.; Duttagupta, P. N., The effect of an acute dose of biotin at a post-implantation stage and its relation with female sex steroids in the rat. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **1976**, *22* (3), 181-6.
- [100] Paul, P. K.; Duttagupta, P. N.; Agarwal, H. C., Effects of an acute dose of biotin on the reproductive organs of the female rat. *Curr Sci* **1973**, *42* (6), 206-8.
- [101] Watanabe, T., Morphological and biochemical effects of excessive amounts of biotin on embryonic development in mice. *Experientia* **1966**, *52* (2), 149-54.
- [102] Baez-Saldana, A.; Camacho-Arroyo, I.; Espinosa-Aguirre, J. J.; Neri-Gomez, T.; Rojas-Ochoa, A.; Guerra-Araiza, C.; Larrieta, E.; Vital, P.; Diaz, G.; Chavira, R.; Fernandez-Mejia, C., Biotin deficiency and biotin excess: effects on the female reproductive system. *Steroids* **2009**, *74* (10-11), 863-9.
- [103] Valenciano, A. I.; Mayordomo, R.; de La Rosa, E. J.; Hallbook, F., Biotin decreases retinal apoptosis and induces eye malformations in the early chick embryo. *Neuroreport* **2002**, *13* (3), 297-9.
- [104] Kuroishi, T., Regulation of immunological and inflammatory functions by biotin. *Can J Physiol Pharmacol* **2015**, *26* (3), 1-6.
- [105] Zemleni, J.; Helm, R. M.; Mock, D. M., *In vivo* biotin supplementation at a pharmacologic dose decreases proliferation rates of human peripheral blood mononuclear cells and cytokine release. *J Nutr* **2001**, *131* (5), 1479-84.
- [106] Wiedmann, S.; Eudy, J. D.; Zemleni, J., Biotin supplementation increases expression of genes encoding interferon-gamma, interleukin-1beta, and 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase, and decreases expression of the gene encoding interleukin-4 in human peripheral blood mononuclear cells. *J Nutr* **2003**, *133* (3), 716-9.
- [107] Manthey, K. C.; Griffin, J. B.; Zemleni, J., Biotin supply affects expression of biotin transporters, biotinylation of carboxylases and metabolism of interleukin-2 in Jurkat cells. *J Nutr* **2002**, *132* (5), 887-92.
- [108] Kuroishi, T.; Kinbara, M.; Sato, N.; Tanaka, Y.; Nagai, Y.; Iwakura, Y.; Endo, Y.; Sugawara, S., Biotin status affects nickel allergy via regulation of interleukin-1beta production in mice. *J Nutr* **2009**, *139* (5), 1031-6.
- [109] Abd El-Wahab, A.; Radko, D.; Kamphues, J., High dietary levels of biotin and zinc to improve health of foot pads in broilers exposed experimentally to litter with critical moisture content. *Poult Sci* **2013**, *92* (7), 1774-82.
- [110] Youssef, I. M.; Beineke, A.; Rohn, K.; Kamphues, J., Influences of increased levels of biotin, zinc or mannan-oligosaccharides in the diet on foot pad dermatitis in growing turkeys housed on dry and wet litter. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* **2012**.
- [111] Marušič, W. L., E. A. Ogrinz, M. Brand, and M. Mitrović. 1970. Induction, prevention and therapy of biotin deficiency in turkey poults on semi-purified and commercial type rations. *Poult. Sci.* **1970** *49*, 412-421.
- [112] Buda, S., Effects of biotin on the skin of turkey foot pads. *World Poult* **2000**, *16*, 47-48.
- [113] Mayne, R. K.; Else, R. W.; Hocking, P. M., High dietary concentrations of biotin did not prevent foot pad dermatitis in growing turkeys and external scores were poor indicators of histopathological lesions. *Br Poult Sci* **2007**, *48* (3), 291-8.
- [114] Rodriguez-Melendez, R.; Griffin, J. B.; Zemleni, J., Biotin supplementation increases expression of the cytochrome P450 1B1 gene in Jurkat cells, increasing the occurrence of single-stranded DNA breaks. *J Nutr* **2004**, *134* (9), 2222-8.
- [115] Ronquillo-Sanchez, M. D.; Camacho-Carranza, R.; Fernandez-Mejia, C.; Hernandez-Ojeda, S.; Elinos-Baez, M.; Espinosa-Aguirre, J. J., Modulation of the rat hepatic cytochrome P4501A

- subfamily using biotin supplementation. *Biomed Res Int* **2013**, 627907.
- [116] Fiume, M. Z., Final report on the safety assessment of biotin. *Int J Toxicol* **2001**, 20 Suppl 4, 1-12.
- [117] Baumgartner, E. R.; Suormala, T., Multiple carboxylase deficiency: inherited and acquired disorders of biotin metabolism. *Int J Vitam Nutr Res* **1997**, 67 (5), 377-84.
- [118] Koutsikos, D.; Agroyannis, B.; Tzanatos-Exarchou, H., Biotin for diabetic peripheral neuropathy. *Biomed Pharmacother* **1990**, 44(10), 511-4.
- [119] Hayes, S.; Gordon, A.; Sadowski, I.; Hayes, C., RK bacterial test for independently measuring chemical toxicity and mutagenicity: short-term forward selection assay. *Mutat Res* **1984**, 130 (2), 97-106.
- [120] Ma, T. H.; Harris, M. M.; Anderson, V. A.; Ahmed, I.; Mohammad, K.; Bare, J. L.; Lin, G., Tradescantia-Micronucleus (Trad-MCN) tests on 140 health-related agents. *Mutat Res* **1984**, 138 (2-3), 157-67.
- [121] SRI-International, Microbial mutagenesis testing of substances compound report:F76-041, D-Biotin. NTIS Report No. PB89-169072. 1979.
- [122] Bonjour, J., Biotin. In *Handbook of Vitamins: Nutritional, Biochemical and Clinical Aspects*, Machlin, L., Ed. Marcel Dekker: New York, 1991; p 403.

Research Article

Dietary Biotin Supplementation Modifies Hepatic Morphology without Changes in Liver Toxicity Markers

Leticia Riverón-Negrete,¹ Gloria Sicilia-Argumedo,¹ Carolina Álvarez-Delgado,^{1,2} Elvia Coballase-Urrutia,³ Jonathan Alcántar-Fernández,¹ and Cristina Fernandez-Mejia¹

¹Unidad de Genética de la Nutrición, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Pediatría, Avenida del Imán 1, 4th Floor, Colonia Insurgentes Cuicuilco, 04530 Mexico City, Mexico

²Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Carretera Ensenada-Tijuana No. 3918, Zona Playitas, 22860, Ensenada, BC, Mexico

³Laboratorio de Neurociencias, Instituto Nacional de Pediatría, Avenida del Imán 1, 3rd Floor, Colonia Insurgentes Cuicuilco, 04530 Mexico City, Mexico

Correspondence should be addressed to Cristina Fernandez-Mejia; crisfern@biomedicas.unam.mx

Received 7 October 2016; Revised 28 November 2016; Accepted 30 November 2016

Academic Editor: Marija Mostarica-Stojković

Copyright © 2016 Leticia Riverón-Negrete et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Pharmacological concentrations of biotin have pleiotropic effects. Several reports have documented that biotin supplementation decreases hyperglycemia. We have shown that a biotin-supplemented diet increased insulin secretion and the mRNA abundance of proteins regulating insulin transcription and secretion. We also found enlarged pancreatic islets and modified islet morphology. Other studies have shown that pharmacological concentrations of biotin modify tissue structure. Although biotin administration is considered safe, little attention has been given to its effect on tissue structure. In this study, we investigated the effect of biotin supplementation on hepatic morphology and liver toxicity markers. Male BALB/cAnN Hsd mice were fed a control or a biotin-supplemented diet for 8 weeks. Versus the control mice, biotin-supplemented mice had an altered portal triad with dilated sinusoids, increased vascularity, and bile conducts. Furthermore, we observed an increased proportion of nucleomegaly and binucleated hepatocytes. In spite of the liver morphological changes, no differences were observed in the serum liver damage indicators, oxidative stress markers, or antioxidant enzymes. Our data demonstrate for the first time that biotin supplementation affects liver morphology in normal mice, and that these modifications are not paralleled with damage markers.

1. Introduction

The physiological role of the vitamin biotin (also named B7) is to participate as a coenzyme of carboxylases [1]. The adequate intake (AI) level of biotin is 30 $\mu\text{g}/\text{d}$ for adults [2]. It has been well documented that biotin affects gene expression and systemic functions at pharmacological levels, which are approximately 30 to 650 times its daily requirement [3].

Pharmacological doses of biotin have hypolipidemic [4–8] and hypoglycemic effects [7, 9–12] and reduce diabetes complications [11–13] in both animal models and humans. These effects are associated with changes in gene and protein expression [12, 14–18] in key metabolic organs, such as the liver and the pancreatic islets.

In previous studies in our laboratory, normal mice fed a biotin-supplemented diet for 8 weeks demonstrated increased insulin secretion and higher levels of mRNAs involved in the control of insulin transcription and secretion compared with mice fed a biotin-sufficient diet [15]. Interestingly, biotin supplementation induced an increase in islet size and modified its typical architecture of alpha-cells at the periphery and beta-cells at the core [15].

Other studies have shown that pharmacological doses of biotin modify tissue morphology. Our research group previously demonstrated that treatment with pharmacological concentrations of biotin decreases the number of primary and Graafian follicles in female mice [19]. Consistent with this effect of biotin on reproductive structures, acute biotin

treatment induced atrophy in the corpora lutea of female rats [20]. In male rats, biotin supplementation for 6 weeks decreased total sperm counts as well as the diameter of the seminiferous tubes [21]. In animal models of diabetes, biotin supplementation ameliorated the histopathological morphology in the liver [12, 22], kidney [23], and pancreas [12].

Because of biotin's effects on glucose and lipid metabolism, supplements and medications containing pharmacological amounts of the vitamin are commercially available [8, 24]. Although biotin supplementation is considered safe [25], little attention has been paid to its effect on tissue structure. In this study we investigated the effects of biotin supplementation on hepatic morphology and liver toxicity markers.

2. Materials and Methods

2.1. Animal Model and Experimental Design. All interventions were approved by the Ethical Committee for Experimentation of the Biomedical Research Institute of the National Autonomous University of Mexico. At weaning three-week-old male Balb/cAnN mice were fed one of the following diets: biotin-control (TD-01362) or biotin-supplemented diet (TD-02458) containing 1.76 mg and 97.70 mg of free biotin/kg diet, respectively (Harlan Teklad, Madison WI, USA) as described previously [15–18, 26]. A third group of mice received the control diet but were treated with a single dose of carbon tetrachloride (CCl₄, 2 ml/kg body weight) to induce liver damage. Food consumption and body weight were measured through the experiment. After 8 weeks, the mice were deprived of food for 12 h and anesthetized as described in [15–18], and the blood and liver were extracted. The mice were killed via cervical dislocation.

2.2. Analysis of Serum Aspartate Aminotransferase, Alanine Aminotransferase, Gamma-Glutamyltransferase, Alkaline Phosphatase, Total and Direct Bilirubin, Albumin, and Urea. Blood samples were collected and centrifuged at 1600 ×g and 4°C for 10 min. Sera were stored at –20°C until used. Hemolyzed samples were discarded to avoid interference with the assays. The compounds were quantified by colorimetric assays (Spinreact, Sant Esteve de Bas, Spain) according to the manufacturer's protocol and were expressed as U/L.

2.3. Lipid Peroxidation. Lipid peroxidation was quantified in liver homogenates by assaying malondialdehyde using the thiobarbituric acid by method [27]. Briefly, liver homogenates were incubated with thiobarbituric acid, heated by boiling for 45 min, and kept in ice for 15 min, followed by a centrifugation at 3000 ×g for 10 min, twice. The supernatant was read at 532 nm. The malondialdehyde levels were reported in μmol/mg of protein.

2.4. Glutathione Content. Immediately after the mice were sacrificed, liver samples were washed in a saline isotonic solution to eliminate remnant blood, homogenized in 5%

ice-cold metaphosphoric acid (1/20 w/v) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), and centrifuged at 12000 rpm at 4°C for 15 min. The supernatant was collected and kept on ice. Glutathione was quantified spectrophotometrically at 405 nm with the HT Glutathione Assay Kit (Trevigen, St. Louis, MO, USA) according to the manufacturer's recommendations. The concentration of reduced glutathione (GSH) was calculated using a GSH standard curve. Oxidized glutathione contents were determined by subtracting the amount of GSH from the level of total glutathione.

2.5. Superoxide Dismutase Activity. Approximately 100 mg of liver was homogenized with a glass potter homogenizer in an ice-cold saline isotonic solution. Tissue extracts were centrifuged at 12500 ×g for 30 min at 4°C to remove insoluble material, and the protein concentration was measured using a Bio-Rad protein assay following the manufacturer's instructions. Super oxide dismutase activity was quantified in liver homogenates with a commercial kit based on xanthine oxidase and a color agent according to the protocol provided by the manufacturer (Sigma Aldrich, San Louis, MO, USA).

2.6. Catalase Activity. Catalase activity was measured according to Góth, 1991 [28], with slight modifications. The liver was homogenized in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.00). Ten μg of total protein was incubated for 30 sec. in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0, and 12 mM of hydrogen peroxide). The reaction was stopped by addition of 32.4 mM ammonium molybdate. Reactions were read at 405 nm, and the specific activity was calculated.

2.7. Histological Analysis. The livers were dissected and fixed in 10% neutral formalin, dehydrated in ascending grades of alcohol, and embedded in paraffin wax. Consecutive 5 μm thick sections were cut, mounted on glass slides, and stained with hematoxylin and eosin.

Two slides were prepared for each mouse. These contained three sections of each liver. Ten field areas for each section were randomly selected and examined for histological changes (25x) under light microscope. The random field areas were scored as follows: normal appearance (—), minimal cellular disruption in less than 1% of field area, mild cellular disruption of 1%–30% of field area, moderate cellular disruption of 31%–60% of field area, severe cell disruption of 61%–90% of field area, and very severe cellular disruption of 91%–100% of field area [29].

To assess binucleated hepatocytes and nucleomegaly, three field areas of six sections were taken from 9 mice in each group. These were analyzed at 40x in an Olympus BX51 microscope. The analyses were performed simultaneously by two persons who were blinded to the group identity.

2.8. Nitric Oxide Concentration. Liver homogenates were prepared as described above and were treated with proteinase K [10 mg/ml] to remove interfering proteins. Quantification was performed with a commercial kit (*Thermo Scientific, Rockford, ILL, USA*) for the indirect determination of nitrites

TABLE 1: Effect of eight weeks of biotin supplementation on serum liver damage indicators.

Enzyme/metabolite	Units	Control	Biotin-supplemented
Aspartate aminotransferase	[U/L]	163 ± 11.0	196 ± 8.60*
Alanine aminotransferase	[U/L]	32.9 ± 3.29	30.2 ± 2.40
Gamma-glutamyltransferase	[U/L]	2.77 ± 0.38	2.48 ± 0.50
Alkaline phosphatase	[U/L]	164 ± 11.0	196 ± 8.63
Total bilirubin	[μmol/L]	0.30 ± 0.040	0.22 ± 0.029
Indirect bilirubin	[μmol/L]	0.29 ± 0.071	0.22 ± 0.020
Albumin	[mg/dL]	3.28 ± 0.26	2.57 ± 0.24
Urea	[mg/dL]	52.3 ± 1.21	50.7 ± 1.89

Values are mean ± SEM. $n = 7-10$. * $p < 0.050$.

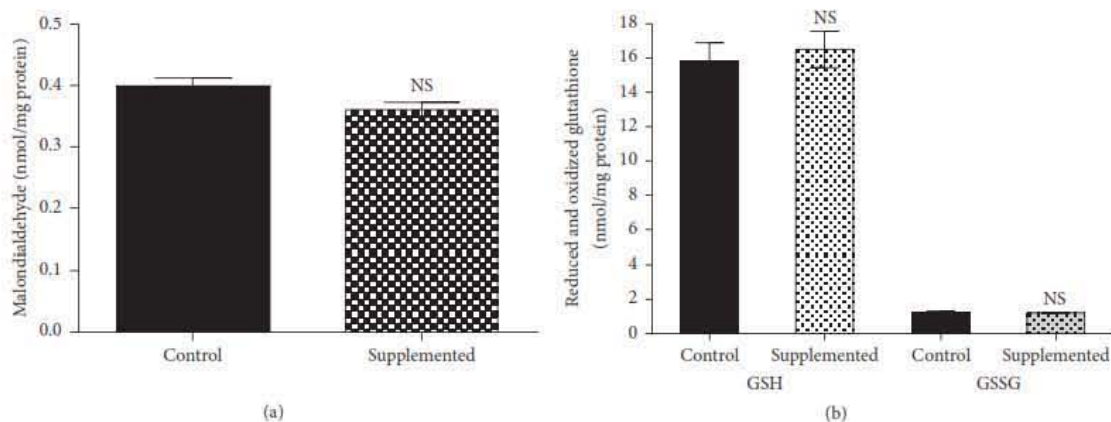


FIGURE 1: Effect of biotin supplementation on liver malondialdehyde and reduced and oxidized glutathione in mice fed a biotin-supplemented diet for 8 weeks. (a) Malondialdehyde concentrations. Values represent the mean ± SEM of 5 mice from each group. (b) Reduced and oxidized glutathione. Black bars: control group; patterned bars: biotin-supplemented group. Values represent the mean ± SEM of 8 mice from each group. All measurements were performed in triplicate. ^{NS} $p > 0.050$.

and nitrates in biological samples using nitrate reductase and the Griess reagent that absorbs visible light at 540 nm.

2.9. Statistical Analysis. Statistical analyses were performed using the Statview statistical analysis program and Graph-Pad Prism 6.0 software (Berkeley, CA, USA). All data are presented as the mean ± SEM; n is the number of evaluated subjects. Statistical significance was assessed by Student's t -test or 1-way ANOVA. p values less than 0.050 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Effect of Biotin Supplementation on Serum Liver Damage Indicators. We studied how biotin supplementation influenced liver enzyme tests (Table 1). The data show increased aspartate aminotransferase (AST) levels in the biotin-supplemented group ($p < 0.050$); however, the values were in the normal range (55.0–352 U/L) [30]. No differences were seen between the control and the supplemented group in gamma-glutamyltransferase (GGT), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), total and direct

bilirubin, albumin, and urea. As expected, all parameters were significantly ($p < 0.050$) affected in the carbon tetrachloride group compared with both the control and supplemented groups: AST = 95.4 ± 23.6 U/L; GGT = 9.91 ± 0.78 , ALP = 223 ± 7.60 U/L; ALT = 833 ± 13.2 ; bilirubin 1.22 ± 0.28 [μmol/L]; indirect bilirubin 1.02 ± 0.18 [μmol/L]; albumin 4.86 ± 0.34 [g/dL]; urea 108 ± 8.33 [mg/dL].

3.2. Effects of Biotin Supplementation on Oxidative Stress Markers and Antioxidant Enzymes Activities. We also evaluated the effects of biotin supplementation on lipid peroxidation and oxidized and reduced glutathione. Eight weeks of biotin supplementation did not modify malondialdehyde concentrations versus the control group (Figure 1(a); control = 0.40 ± 0.016 ; supplemented = 0.36 ± 0.015 nmol/mg protein). In the carbon tetrachloride group, the levels were significantly increased ($p < 0.050$) compared with the control and supplemented groups (CCl_4 = 0.51 ± 0.020 nmol/mg protein).

Glutathione is a major antioxidant that protects tissues from free radical injury. The analysis of glutathione concentrations (Figure 1(b)) showed that the levels of the reduced

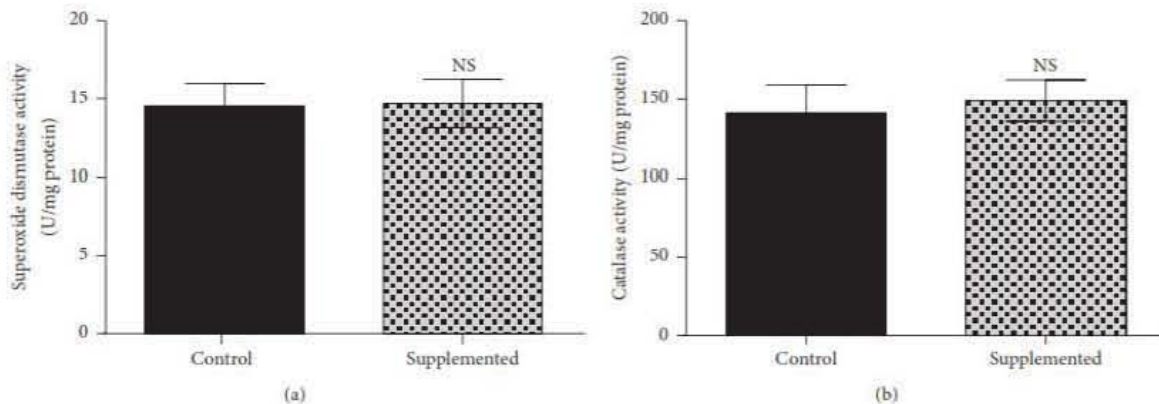


FIGURE 2: Effect of biotin supplementation on superoxide dismutase and catalase activity in mice fed a biotin-supplemented diet for 8 weeks. (a) Liver superoxide dismutase activity. Values represent the mean \pm SEM of 5 mice from each group. (b) Liver catalase activity. Black bars: control group; patterned bars: biotin-supplemented group. Values represent the mean \pm SEM of 9 mice from each group. All measurements were performed in triplicate. ^{NS} $p > 0.050$.

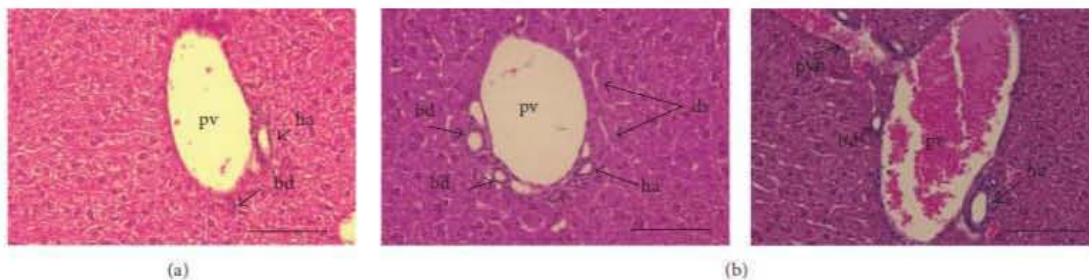


FIGURE 3: Effect of biotin supplementation on liver morphology in mice fed a biotin-supplemented diet for 8 weeks. Paraffin sections stained by hematoxylin and eosin. (a) Control group's representative image showing a normal portal triad. (b) Supplemented group. Left panel: representative image, showing an altered triad with dilated sinusoids and increased number of bile ducts. Right panel: enlarged portal vein with adjacent portal vein branch. pv: portal vein; ha: hepatic artery; bd: bile duct; ds: dilated sinusoids; pvb: portal vein branch. Scale bar represents 100 μ m.

and the oxidized forms did not significantly differ between the control and supplemented group (reduced glutathione: control = 15.9 ± 1.06 ; supplemented = 16.6 ± 1.06 nmol/mg protein; oxidized glutathione, control = 1.25 ± 0.079 ; supplemented 1.22 ± 0.030 nmol/mg protein; in the carbon tetrachloride control group, values were increased ($p < 0.050$) compared with the control and supplemented groups (reduced glutathione = 10.0 ± 0.75 nmol/mg protein; oxidized glutathione = 7.52 ± 1.20 nmol/mg protein); the oxidative stress index was calculated using the ratio between reduced glutathione/oxidized glutathione). The oxidative stress index for both groups was indicative of no oxidative stress (12.7 ± 0.90 and 13.6 ± 0.90 , respectively; $p > 0.050$). In contrast, the stress index for the carbon tetrachloride was significantly different ($p < 0.050$) compared to the control and the supplemented groups (carbon tetrachloride = 1.33 ± 0.31).

Liver superoxide dismutase activity (Figure 2(a)) showed no significant differences between the biotin-supplemented group and the control group: control = 14.8 ± 1.45 ; supplemented = 15.0 ± 1.48 U/mg protein. Increased enzyme

activity was found in the carbon tetrachloride positive control values (25.4 ± 1.86 U/mg protein; $p < 0.050$ compared with the control and the supplemented groups). Catalase activity (Figure 2(b)) did not significantly differ between the control and supplemented group, control = 144 ± 18.1 ; supplemented = 151 ± 13.5 U/mg protein. The carbon tetrachloride positive control values showed increased catalase activity (286 ± 30.1 U/mg protein, $p < 0.050$ compared with the control and supplemented groups).

3.3. Effect of Biotin Supplementation on Liver Morphology.

Despite the fact that biotin supplementation had no effect on liver toxicity markers, histological analysis showed noticeable differences between groups. Light microscopy observations of livers from control mice showed a normal morphology with adjacent normal sized sinusoids radiating from the central veins toward the periphery of the liver lobules and a normal portal triad (Figure 3(a)). In the supplemented mice, we observed an altered portal triad. Morphological evaluation revealed moderate dilated sinusoids, moderate

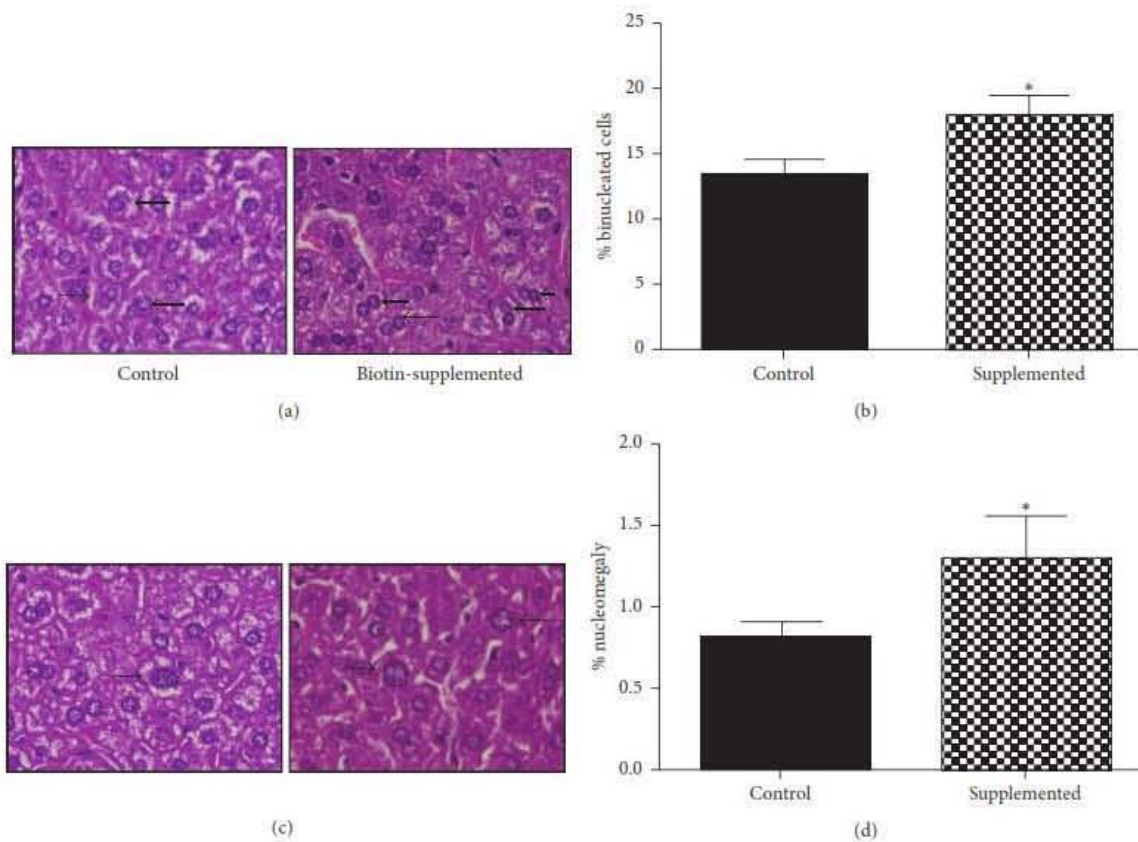


FIGURE 4: Effect of biotin supplementation on binucleated hepatocytes and nucleomegaly in mice fed a biotin-supplemented diet for 8 weeks. (a) Hematoxylin and eosin representative image of hepatocytes from control and biotin-supplemented group (right) showing mono and binucleated hepatocytes. (b) Quantification of binucleated hepatocytes per field. (c) Hematoxylin and eosin images of hepatocytes from control and biotin-supplemented group (right) showing nuclei <12 and >12 μm . (d) Nuclei quantification >12 μm per field. Black bars: control group; patterned bars: biotin-supplemented group. Values represent the mean \pm SEM of 9 mice per group. * $p < 0.050$ compared to the control group.

increased vascularity, and mild increased number of bile conduits (Figure 3(b)).

Changes were also observed in the hepatocyte nuclei. Compared to the mice fed a control diet, the biotin-supplemented group showed a 39% increase in the number of binucleated hepatocytes (control = 13.2 ± 1.29 ; supplemented = $18.7 \pm 1.50\%$) (Figures 4(a) and 4(b)). In addition, the number of hepatocytes with nucleomegaly (nuclei >12 μm) was increased: control = 0.81 ± 0.11 ; supplemented = $1.30 \pm 0.28\%$ (Figures 4(c) and 4(d)).

3.4. Effects of Biotin Supplementation on Nitric Oxide Levels. The increased vascularization observed in histology prompted us to determine nitric oxide concentrations because nitric oxide has been proposed to participate in the biotin transduction signaling pathway cGMP/PKG [31]. However, no differences were found in nitric oxide concentration between the control and the supplemented group (Figure 5): control = 24.5 ± 0.55 ; supplemented = 25.6 ± 1.50 . Carbon tetrachloride levels were increased: $64.3 \pm$

7.17 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ tissue; $p < 0.050$, compared with the control and supplemented groups.

4. Discussion

In this study, we found that eight weeks of dietary biotin supplementation induced noticeable changes in liver morphology in normal mice and that these modifications were not paralleled with liver damage markers. The biotin-supplemented mice had a higher percentage of dilated sinusoids, vascularity, and bile ducts compared with the controls. We also found an increased number of binucleated hepatocytes (about 39%) and hepatocytes with nucleomegaly (66%) in the biotin-supplemented mice compared with the controls. These results together with previous results in pancreatic islets [15] and ovaries [19] and the observations by other groups [12, 21–23] indicate that pharmacological concentrations of biotin modify tissue structure.

Binucleated hepatocytes and nucleomegaly are the result of polyploidy [32]. At present, the role of increased polyploidy

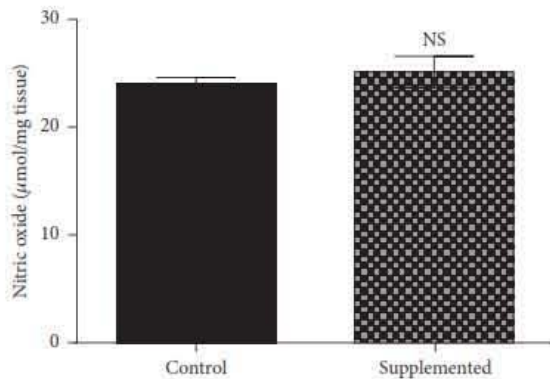


FIGURE 5: Effect of biotin supplementation on nitric oxide concentrations in mice fed a biotin-supplemented diet for 8 weeks. Values represent the mean \pm SEM of 9 mice from each group. Measurements were performed in triplicate. Black bars: control group; patterned bars: biotin-supplemented group. ^{NS} $p > 0.050$.

in the liver is still under debate [33, 34]. Polyploid cells are generated in some types of cancer such as esophageal and colon cancers [32]; however, in the liver, most of the studies suggest that this mechanism renders the cells more resistant to injury and enhances the liver's functional capacity [32, 34]. Our findings show that, despite increased polyploidy, serum damage indicators, oxidative stress markers, and antioxidant enzymes were not affected by biotin supplementation, suggesting that the hepatocyte nuclear changes produced by the vitamin might be related to the positive effects associated with liver polyploidy. However, further studies will be required to test this hypothesis.

In previous studies, we observed that normal mice fed a biotin-supplemented diet (approximately 13.5 mg/kg body weight) showed increased pancreatic islet size as well as increased alpha-cells at the islet center compared with the controls [15]. However, these structural changes did not have adverse effects on islet function. Our prior studies [19] in the same mouse model showed changes in response to biotin in the female reproductive tract, with decreased Graafian and ovarian primary follicles. Neither our prior studies [15, 19] nor this work (data not shown) identified unfavorable effects of biotin supplementation on body weight, food consumption, external appearance, or behavior.

Changes on ovary histology were also observed by Paul et al. [20] in response to acute intraperitoneal treatment of 50 mg/kg body weight of biotin [20]. Consistent with our experiments, they found that biotin did not affect normal body weight gain [20]; however, in contrast with our observations [19], they found estrus cycle irregularities. Sawamura et al. [21], found that rats fed a diet containing 10 g biotin/kg diet for 6 weeks (990 mg/kg body weight) presented diminished total sperm counts and seminiferous tubule diameters compared to pair-fed rats. However, the biotin-supplemented group showed reduced food intake, impaired body weight gain, and decreased kidney and liver weights. It is possible that the histological modifications might result from biotin toxic effects because the magnitude

of biotin intake is above the reported tolerable upper intake level found by the same investigators [35].

Other investigations found that biotin supplementation modified the histopathological features produced in the diabetic state [12, 22, 23]. In rats with diabetes induced by 2 weeks of high-fat diet (HFD) and a single dose of streptozotocin that were then fed a HFD supplemented with biotin (300 µg/kg body weight per d) over 10 weeks, studies by Sahin et al. [12] noted that the histopathological changes in the liver, kidney, and pancreas of diabetic rats were reverted with biotin supplementation. Male Swiss albino mice with streptozotocin-induced diabetes treated daily by oral gavage with 15 mg/kg of biotin for 12 successive days had improved kidney and liver damage associated with the diabetic state [22, 23]. In the kidney, biotin supplementation decreased the number of distorted glomeruli, inflammatory cells, and giant macrophages [23]. In the liver, biotin caused reductions in dilated portal vein, leukocytic infiltration, and fatty degeneration [22]. It is interesting to note that while in diabetic models the effect of biotin reverses altered tissue structure produced by the pathological diabetic state, in normal animals the changes are observed on the typical morphology. None of the previous works showed the liver histology changes shown in the present report.

Despite the effects of biotin on liver morphology, our data did not find changes on liver damage indicators such as albumin, total and direct bilirubin, gamma-glutamyltransferase, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, or urea. These results agree with studies in normal rats showing that diets containing up to 1,000 mg/kg diet did not affect these parameters [21]. These data indicate that pharmacological concentrations of biotin do not affect classic liver damage tests. However, we cannot rule out the possibility that the histological changes observed here might affect liver physiology in other ways.

The reversion of altered tissue structure induced by biotin in diabetic animal models is associated with reduced oxidative stress [12, 22, 23]. In rats with diabetes induced by a high-fat diet and streptozotocin, serum, liver, and kidney malondialdehyde levels were decreased in biotin-treated animals [12]. Additionally, the protein expression of the active form of NF- κ B—a transcription factor involved in cellular responses to diverse inflammation stimuli including free radicals—diminished in both, liver and kidney [12]. In Swiss albino diabetic mice, biotin treatment decreased the immune-reaction response toward acrolein immunohistochemical-signal—an indicator of oxidative damage [22, 23]. However, in our study, biotin supplementation had no effect on liver malondialdehyde levels or other oxidative stress markers such as reduced and oxidized glutathione. In agreement with this, no statistical significant differences were observed on the antioxidant activity of superoxide dismutase and catalase. The difference in biotin effects between normal and pathological states has also been observed in gene expression [12, 14, 17, 36, 37] and insulin and glucose tolerance [15, 38], indicating that the pharmacological effects of biotin can vary depending on the metabolic status.

Nitric oxide has an important role in vasodilatation [39]. Studies in Jurkat cells have found that the effects of biotin

are dependent of nitric oxide concentrations [31]. However, other studies in rats receiving eight weeks of biotin in water (approximately 1.2 mg/kg body weight) indicate that biotin effects are independent of nitric oxide [40]. Our data did not find changes in the concentration of nitric oxide suggesting that other mechanisms are involved in the vasodilatation changes observed here.

The mechanisms involved in biotin-induced histological changes are largely unknown. In pancreatic islets, we found that the changes produced by biotin supplementation on islet architecture might be related to diminished expression of the neural cell adhesion protein *Ncam1*, whose decreased expression produces changes in islet morphology and generates an increased number of alpha-cells at the interior of the islet [41]. Current studies in our laboratory are focused on the molecular mechanisms responsible for the morphological changes observed in the liver in response to biotin supplementation.

Biotin products with pharmacological concentrations of biotin are commercially available. Biotin administration is considered harmless in humans and rodents [25]. Toxicity tests such as the Ames test [42–44] in bacteria found that biotin was neither toxic nor mutagenic. Nonetheless, a *Tradescantia*-micronucleus bioassay showed mutagenic effects with a minimum effective dose of approximately 250 mg/ml [45]. In humans, no adverse effects were found with administration of 0.25 to 100 mg biotin. A lack of adverse effects has been reported in patients with inborn errors of biotin metabolism [46], normal individuals [24], diabetic patients [10, 13], and patients undergoing hemodialysis [11]. Rats fed diets containing up to 1,000 mg/kg diet did not show liver damage [21]. Although pharmacological concentrations of biotin are considered safe, further investigations are required to determine the effects of the tissue structure changes observed in this study.

5. Conclusion

Our data shows for the first time that biotin supplementation affects liver morphology in normal mice and that these modifications are not paralleled with changes in classical liver damage indicators and oxidative stress markers. These results indicate that biotin toxicity studies need to be addressed with different tools because the pharmacological concentrations of biotin affect tissue morphology and have nuclei effects.

Competing Interests

The authors declare that there are no competing interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

Dr. Rodolfo Rodríguez-Jurado, Dr. Rosa María Viguera-Villaseñor of Laboratorio Biología de la Reproducción, and M en C Gerardo Barragán-Mejía of Laboratorio Neurociencias acknowledge Instituto Nacional de Pediatría Departamento de Patología, for histology facilities. The authors are grateful to Dr. Maria Eugenia Gonsebatt Bonaparte,

Dr. José Pedraza Chaverri, and Dr. Javier Espinosa Aguirre for valuable discussions throughout these studies, and to M. en C. Betzabé Linares Ferrer for computer assistance. This work is supported by research grant from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, 219787-M and 99294-M, and Fondos Federales 074/2013. M. en C. Leticia Riverón-Negrete is a doctoral student from the Doctorado en Ciencias Biológicas at Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Jonathan Alcántar-Fernández is a doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, and was the recipient of Fellowship 384151 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México.

References

- [1] P. S. Harper, "C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, D. Valle (eds.), B. Childs, K. W. Kinzler, B. Vogelstein (associate eds.): molecular and metabolic bases of inherited disease, 8th edition," *Human Genetics*, vol. 110, no. 2, pp. 205–206, 2002.
- [2] A. A. Yates, S. A. Schlicker, and C. W. Sutor, "Dietary Reference Intakes: the new basis for recommendations for calcium and related nutrients, B vitamins, and choline," *Journal of the American Dietetic Association*, vol. 98, no. 6, pp. 699–706, 1998.
- [3] C. Fernandez-Mejia and M.-L. Lazo-de-la-Vega-Monroy, "Biological effects of pharmacological concentrations of biotin," *Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 16, no. 1, pp. 40–48, 2011.
- [4] C. Revilla-Monsalve, I. Zendejas-Ruiz, S. Islas-Andrade et al., "Biotin supplementation reduces plasma triacylglycerol and VLDL in type 2 diabetic patients and in nondiabetic subjects with hypertriglyceridemia," *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 60, no. 4, pp. 182–185, 2006.
- [5] O. K. Dokusova and I. V. Krivoruchenko, "The effect of biotin on the level of cholesterol in the blood of patients with atherosclerosis and essential hyperlipidemia," *Kardiologia*, vol. 12, no. 12, p. 113, 1972.
- [6] M. W. Marshall, P. G. Kliman, V. A. Washington, J. F. Mackin, and B. T. Weinland, "Effects of biotin on lipids and other constituents of plasma of healthy men and women," *Artery*, vol. 7, no. 4, pp. 330–351, 1980.
- [7] M. Hemmati, H. Babaei, and M. Abdolsalehi, "Survey of the effect of biotin on glycemic control and plasma lipid concentrations in type 1 diabetic patients in Kermanshah in Iran (2008-2009)," *Oman Medical Journal*, vol. 28, no. 3, pp. 195–198, 2013.
- [8] C. Albarracín, B. Fuqua, J. Geohas, M. Finch, and J. Komorowski, "Improvement in glycemic control, lipids and insulin sensitivity with the combination of chromium picolinate and biotin in type 2 diabetes mellitus," *Diabetes Care*, vol. 54, article A428, 2005.
- [9] J. C. Coggeshall, J. P. Heggors, M. C. Robson, and H. Baker, "Biotin status and plasma glucose in diabetics," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 447, pp. 389–392, 1985.
- [10] M. Maebashi, Y. Makino, Y. Furukawa, K. Ohinata, S. Kimura, and T. Sato, "Therapeutic evaluation of the effect of biotin on hyperglycemia in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus," *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, vol. 14, no. 3, pp. 211–218, 1993.
- [11] D. Koutsikos, C. Fourtounas, A. Kapetanaki et al., "Oral glucose tolerance test after high-dose i.v. biotin administration in

- normoglycemic hemodialysis patients," *Renal Failure*, vol. 18, no. 1, pp. 131–137, 1996.
- [12] K. Sahin, M. Tuzcu, C. Orhan et al., "Anti-diabetic activity of chromium picolinate and biotin in rats with type 2 diabetes induced by high-fat diet and streptozotocin," *British Journal of Nutrition*, vol. 110, no. 2, pp. 197–205, 2013.
- [13] D. Koutsikos, B. Agroyannis, and H. Tzanatos-Exarchou, "Biotin for diabetic peripheral neuropathy," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 44, no. 10, pp. 511–514, 1990.
- [14] Y. Sugita, H. Shirakawa, R. Sugimoto, Y. Furukawa, and M. Komai, "Effect of biotin treatment on hepatic gene expression in streptozotocin-induced diabetic rats," *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, vol. 72, no. 5, pp. 1290–1298, 2008.
- [15] M. L. Lazo de la Vega-Monroy, E. Larrieta, M. S. German, A. Baez-Saldana, and C. Fernandez-Mejia, "Effects of biotin supplementation in the diet on insulin secretion, islet gene expression, glucose homeostasis and beta-cell proportion," *Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 24, no. 1, pp. 169–177, 2013.
- [16] A. Aguilera-Méndez and C. Fernández-Mejía, "The hypotriglyceridemic effect of biotin supplementation involves increased levels of cGMP and AMPK activation," *BioFactors*, vol. 38, no. 5, pp. 387–394, 2012.
- [17] E. Larrieta, F. Velasco, P. Vital et al., "Pharmacological concentrations of biotin reduce serum triglycerides and the expression of lipogenic genes," *European Journal of Pharmacology*, vol. 644, no. 1-3, pp. 263–268, 2010.
- [18] D. Boone-Villa, A. Aguilera-Méndez, A. Miranda-Cervantes, and C. Fernandez-Mejia, "Effects of biotin supplementation in the diet on adipose tissue cGMP concentrations, AMPK activation, lipolysis, and serum-free fatty acid levels," *Journal of Medicinal Food*, vol. 18, no. 10, pp. 1150–1156, 2015.
- [19] A. Báez-Saldaña, I. Camacho-Arroyo, J. J. Espinosa-Aguirre et al., "Biotin deficiency and biotin excess: effects on the female reproductive system," *Steroids*, vol. 74, no. 10-11, pp. 863–869, 2009.
- [20] P. K. Paul, P. N. Duttgupta, and H. C. Agarwal, "Effects of an acute dose of biotin on the reproductive organs of the female rat," *Current Science*, vol. 42, no. 6, pp. 206–208, 1973.
- [21] H. Sawamura, C. Ikeda, R. Shimada, Y. Yoshii, and T. Watanabe, "Dietary intake of high-dose biotin inhibits spermatogenesis in young rats," *Congenital Anomalies*, vol. 55, no. 1, pp. 31–36, 2015.
- [22] B. A. Aldahmash, D. M. El-Nagar, and K. E. Ibrahim, "Attenuation of hepatotoxicity and oxidative stress in diabetes STZ-induced type 1 by biotin in Swiss albino mice," *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 23, no. 2, pp. 311–317, 2016.
- [23] B. A. Aldahmash, D. M. El-Nagar, K. E. Ibrahim, and M. S. Metwaly, "Biotin amelioration of nephrotoxicity in streptozotocin-induced diabetic mice," *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 22, no. 5, pp. 564–569, 2015.
- [24] G. M. Singer and J. Geohas, "The effect of chromium picolinate and biotin supplementation on glycemic control in poorly controlled patients with type 2 diabetes mellitus: a placebo-controlled, double-blinded, randomized trial," *Diabetes Technology and Therapeutics*, vol. 8, no. 6, pp. 636–643, 2006.
- [25] M. Z. Fiume, "Final report on the safety assessment of Biotin," *International Journal of Toxicology*, vol. 20, supplement 4, pp. 1–12, 2001.
- [26] A. Báez-Saldaña and E. Ortega, "Biotin deficiency blocks thymocyte maturation, accelerates thymus involution, and decreases nose-rump length in mice," *Journal of Nutrition*, vol. 134, no. 8, pp. 1970–1977, 2004.
- [27] H. H. Draper and M. Hadley, "Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation," *Methods in Enzymology*, vol. 186, pp. 421–431, 1990.
- [28] L. Góth, "A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range," *Clinica Chimica Acta*, vol. 196, no. 2-3, pp. 143–151, 1991.
- [29] S. A. Mansour and A. H. Mossa, "Adverse effects of lactational exposure to chlorpyrifos in suckling rats," *Human and Experimental Toxicology*, vol. 29, no. 2, pp. 77–92, 2010.
- [30] C. R. Laboratories, BALB/c Nude Mouse Biochemistry, 2012, http://www.criver.com/files/pdfs/rms/balbc-nude/rm_rm_r_balbc-nude_mouse_clinical_pathology_data.aspx.
- [31] R. Rodriguez-Melendez and J. Zempleni, "Nitric oxide signaling depends on biotin in Jurkat human lymphoma cells," *Journal of Nutrition*, vol. 139, no. 3, pp. 429–433, 2009.
- [32] G. Gentric and C. Desdouets, "Polyploidization in liver tissue," *The American Journal of Pathology*, vol. 184, no. 2, pp. 322–331, 2014.
- [33] G. Gentric and C. Desdouets, "Liver polyploidy: Dr Jekyll or Mr Hide?" *Oncotarget*, vol. 6, no. 11, pp. 8430–8431, 2015.
- [34] A. W. Duncan, "Aneuploidy, polyploidy and ploidy reversal in the liver," *Seminars in Cell and Developmental Biology*, vol. 24, no. 4, pp. 347–356, 2013.
- [35] H. Sawamura, T. Fukuwatari, and K. Shibata, "Effects of excess biotin administration on the growth and urinary excretion of water-soluble vitamins in young rats," *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, vol. 71, no. 12, pp. 2977–2984, 2007.
- [36] G. Ferreira and W. P. Weiss, "Effect of biotin on activity and gene expression of biotin-dependent carboxylases in the liver of dairy cows," *Journal of Dairy Science*, vol. 90, no. 3, pp. 1460–1466, 2007.
- [37] K. Dakshinamurti and W. Li, "Transcriptional regulation of liver phosphoenolpyruvate carboxykinase by biotin in diabetic rats," *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 132, no. 2, pp. 127–132, 1994.
- [38] A. Reddi, B. DeAngelis, O. Frank, N. Lasker, and H. Baker, "Biotin supplementation improves glucose and insulin tolerances in genetically diabetic KK mice," *Life Sciences*, vol. 42, no. 13, pp. 1323–1330, 1988.
- [39] V. Bhandari, R. Choo-Wing, S. P. Chapoval et al., "Essential role of nitric oxide in VEGF-induced, asthma-like angiogenic, inflammatory, mucus, and physiologic responses in the lung," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, no. 29, pp. 11021–11026, 2006.
- [40] M. Watanabe-Kamiyama, S. Kamiyama, K. Horiuchi et al., "Antihypertensive effect of biotin in stroke-prone spontaneously hypertensive rats," *British Journal of Nutrition*, vol. 99, no. 4, pp. 756–763, 2008.
- [41] F. Esni, I.-B. Täljedal, A.-K. Perl, H. Cremer, G. Christofori, and H. Semb, "Neural cell adhesion molecule (N-CAM) is required for cell: type segregation and normal ultrastructure in pancreatic islets," *Journal of Cell Biology*, vol. 144, no. 2, pp. 325–337, 1999.
- [42] S. Hayes, A. Gordon, I. Sadowski, and C. Hayes, "RK bacterial test for independently measuring chemical toxicity and mutagenicity: Short-term forward selection assay," *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, vol. 130, no. 2, pp. 97–106, 1984.
- [43] SRI-International, "Microbial mutagenesis testing of substances compound report: F76-041, D-Biotin," NTIS Report PB89-169072, 1979.

- [44] M. D. Ronquillo-Sánchez, R. Camacho-Carranza, C. Fernandez-Mejia, S. Hernández-Ojeda, M. Elinos-Baez, and J. J. Espinosa-Aguirre, "Modulation of the rat hepatic cytochrome P4501A subfamily using biotin supplementation," *BioMed Research International*, vol. 2013, Article ID 627907, 9 pages, 2013.
- [45] T.-H. Ma, M. M. Harris, V. A. Anderson et al., "Tradescantia-micronucleus (Trad-MCN) tests on 140 health-related agents," *Mutation Research/Genetic Toxicology*, vol. 138, no. 2-3, pp. 157-167, 1984.
- [46] E. R. Baumgartner and T. Suormala, "Multiple carboxylase deficiency: inherited and acquired disorders of biotin metabolism," *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, vol. 67, no. 5, pp. 377-384, 1997.

X REFERENCIAS

Abu-Elheiga L, Jayakumar A, Baldini A, Chirala SS, Wakil SJ. Human acetyl-CoA carboxylase: characterization, molecular cloning, and evidence for two isoforms. *Proc Natl Acad Sci*. 1995; 92: 4011–4015.

Aguilera-Mendez A & Fernandez-Mejia C . The Hypotriglyceridemic Effect Of Biotin supplementation Involves Increased Levels Of Cgmp And Ampk Activation. *Biofactors*. 2012; 38: 387-94.

Albarracin C, Fuqua B, Geohas J, Finch M & Komorowski J. Improvement in glycemic control, lipids and insulin sensitivity with the combination of chromium picolinate and biotin in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes care*.2005; 54 - 428.

Albarracin C, Fuqua B, Evans JL & Goldfine ID. Chromium picolinate and biotin combination improves glucose metabolism in treated, uncontrolled overweight to obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res*. 2007; 24: 41-5.

Aldahmash BA, El-Nagar DM, Ibrahim KE, Metwaly MS. Biotin amelioration of nephrotoxicity in streptozotocin-induced diabetic mice. *Saudi J Biol Sci*. 2015; 22(5):564-569.

Aldahmash BA, El-Nagar DM, Ibrahim KE. Attenuation of hepatotoxicity and oxidative stress in diabetes STZ-induced type 1 by biotin in Swiss albino mice. *Saudi J Biol Sci*. 2016; 23(2):311-317.

Baez-Saldaña A, Zendejas-Ruiz I, Revilla-Monsalve C, Islas-Andrade S, Cardenas A, Rojas-Ochoa A, Vilches A, Fernandez-Mejia C. Effects of biotin on pyruvate carboxylase, acetyl-CoA carboxylase, propionyl-CoA carboxylase, and markers for glucose and lipid homeostasis in type 2 diabetic patients and nondiabetic subjects. *Am J Clin Nutr*. 2004; 79:238-43.

Baez-Saldaña A, Camacho-Arroyo I, Espinosa-Aguirre JJ, Neri-Gomez T, Rojas Ochoa A, Guerra-Araiza C, Larrieta E, Vital P, Diaz G, Chavira R, Fernandez-Mejia C. Biotin deficiency and biotin excess: effects on the female reproductive system. *Steroids*. 2009; 74:863-9.

Baialardo, AG. Síndrome Cardio-hepático ¿Qué debemos saber cómo cardiólogos?. *Insuf Card*. 2015;10 (2): 66-77.

Balamurugan k, Ortiz A & Said HM. Biotin uptake by human intestinal and liver epithelial cells: role of the SMVT system. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003; 285: G73–G77.

Bandrés MF & Arribas AE. Aspectos fundamentales del Citocromo P450. Colección Docencia Universitaria. 2015; 177 p.

Bergsten C, Greenough PR, Gay JM, Seymour WM, Gay CC. Effects of biotin supplementation on performance and claw lesions on a commercial dairy farm. *J Dairy Sci*. 2003; 86 (12): 3953-62.

Bonjour J. Biotin. In: Machlin L, editor. Handbook of Vitamins: Nutritional, Biochemical and Clinical Aspects. New York: Marcel Dekker. 1991; 403 p.

Borboni P, Magnaterra R, Rabini RA, Staffolani R, Porzio O, Sesti G, Fusco A, Mazzanti L, Lauro R, Marlier LN. Effect of biotin on glucokinase activity, mRNA expression and insulin release in cultured beta-cells. *Acta Diabetol*. 1996; 33:154-8.

Browner MF, Taroni F, Sztul E, Rosenberg LE. Sequence analysis, biogenesis, and mitochondrial import of the α -subunit of rat liver propionyl CoA carboxylase. *J Biol Chem*. 1989; 21:12685-12689.

Celton-Morizur S, Grégory M, Dominique C & Chantal D. Polyploidy and liver proliferation: Central role of insulin signaling. *Cell Cycle*. 2010; 9: 3, 460-466.

Chakarov S, Petkova R, Russev GCh. DNA repair systems. *BioDiscovery* 13: 2; DOI: 10.7750/BioDiscovery.2014.13.2

Choi CS, Savage DB, Abu-Elheiga L, Liu ZX, Kim S *et al.* Continuous fat oxidation in Acetyl-CoA carboxylase 2 mutant mice increases total energy expenditure, reduces fat mass and improves insulin sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007;104 16480–16485.

Coggeshall JC, Heggors JP, Robson, MC, Baker H. Biotin Status and Plasma Glucose in Diabetics. *Ann N Y Acad Sci.* 1985; 447: 389-392.

Coleman RA, Lee, DP. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog Lipid Res.* 2004; 43 (2), 134-176.

Concepción OM, Díaz RP. Volumen nuclear de hepatocitos de hígados sometidos a un factor estimulante humoral en ratones isogénicos línea IOR. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas.* 2013; 32(1):83-92.

Corrales LC y Muñoz AM. Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas.* 2012; 10: 135 – 250.

Dakshinamurti, K, Chauhan J. *Biotin. Vitam Horm.* 1989; 45: 337-84.

Dakshinamurti K, Li W. Transcriptional regulation of liver phosphoenolpyruvate carboxykinase by biotin in diabetic rats. *Mol Cell Biochem.* 1994; 132(2):127-32.

Desmont MB. Liver function: test selection and interpretation of results. *Clin Lab Med.* 2002; 22: 377-390.

Dokusova OK, Krivoruchenko IV. The effect of biotin on the level of cholesterol in the blood of patients with atherosclerosis and essential hyperlipidemia. *Kardiologija.* 1972; 12:113.

Dufour DR, Lott JA, Nolte FS, Gretch DR, Koff RS y Seeff LB. Diagnosis and monitoring of hepatic injury I. Performance characteristics of laboratory tests. *Clin Chem.* 2000; 46 (12):2027-49.

Esni F I.-B, T"aljedal A.-K, Perl H, Cremer G, Christofori, and Semb H. "Neural cell adhesion molecule (N-CAM) is required for cell: type segregation and normal ultrastructure in pancreatic islets," *Journal of Cell Biology*. 1999; 144 (2): 325– 337.

Ezzi L, Belhadj IS, Haouas Z, Sakly A, Grissa I, Chakroun S, Kerkeni E, Hassine M, Mehdi M, Cheikh HB. Histopathological and genotoxic effects of chlorpyrifos in rats. *Environ Sci Pollut Res*. 2016; 23: 4859–4867.

Ferreira G, Weiss WP. Effect of biotin on activity and gene expression of biotin-dependent carboxylases in the liver of dairy cows. *J Dairy Sci*. 2007; 90 (3): 1460-6.

Fiume, MZ. Final report on the safety assessment of biotin. *Int J Toxicol 20 Suppl*. 2001; 4:1-12.

Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. National Academy Press, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, Washington, DC. 1998; 374-389 pp

Fridovich I. Superoxide dismutases. In: *Advances in Enzymology* (Meister, A, ed. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, USA 1974; 35-97.

Fuhr JP, He H, Goldfarb N, Nash DB. Use of chromium picolinate and biotin in the management of type 2 diabetes: an economic analysis. *Dis Manag*. 2005; 8:265-75.

Gentic G, Desdouets Ch, Celton-Monizur S. Hepatocytes Polyploidization and Cell Cycle Control in Liver Physiopathology. *International J of Hepatology*. 2012; Vol 2012, Article ID 282430, 8 pages doi:10.1155/2012/282430.

Geohas J, Daly A, Juturu V, Finch M, Komorowski JR. Chromium picolinate and biotin combination reduces atherogenic index of plasma in patients with type 2 diabetes mellitus: a placebo-controlled, double-blinded, randomized clinical trial. *Am J Med Sci*. 2007; 333:145-53.

Giannini EG, Testa R, Savarino V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *CMAJ*. 2002; 172: 367-379.

Góth, L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinics Chimica*. 1991; 196: 143-152.

Hayes S, Gordon A, Sadowski I, Hayes CRK. Bacterial test for independently measuring chemical toxicity and mutagenicity: short-term forward selection assay. *Mutat Res*. 1984; 130:97-106.

Heddle J, Cimino M, Hayashi M, Romagna F, Shelby M, Tucker J, Mc Gregor J. Micronucleic as and index of cytogetic damage: past, present and future. *Environ Mol Mutag*. 1991; 18: 277- 29.

Hemmati M, Babaei H and Abdolsalehei M. Survey of the Effect of Biotin on Glycemic Control and Plasma Lipid Concentrations in Type 1 Diabetic Patients in Kermanshah in Iran (2008-2009). *Oman Medical Journal*. 2013; 28, 3:195-198.

Johnston DE. Special considerations in interpreting liver function tests. *Am Fam Physician*. 1999; 59: 2223-2230.

Jitrapakdee S, Maurice M, Rayment I, Cleland WW, Wallace JC, Attwood PV. Structure, mechanism and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem J*. 2008; 413:369–387.

Kirkland D, Pfuher S, Tweats D, Aardema M, Corvi R, Darroudif F, *et al* . How to reduce false positive results when undertaking in vitro genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: Report of an ECVAM Workshop. *Mutation Research*. 2007; 628: 31-55.

Kishi M, Horiguchi Y, Watanabe S, Hayashi M. Validation of the mouse peripheral blood micronucleus assay using acridine orange supravital staining with urethane. *Mutat Res*. 1992; 278, 205-208.

Koutsikos D, Fourtounas C, Kapetanaki A, Agroyannis B, Tzanatos H, Rammos G, Kopelias I, Bosiolis B, Bovoleti O, Darema M, Sallum G. Oral glucose tolerance test after

high-dose i.v. biotin administration in normoglycemic hemodialysis patients. *Ren Fail.* 1996; 18(1):131-7.

Larrieta E, Velasco F, Vital P, Lopez-Aceves T, Lazo-de-la-Vega-Monroy ML, Rojas A, Fernandez-Mejia C. Pharmacological concentrations of biotin reduce serum triglycerides and the expression of lipogenic genes. *Eur J Pharmacol.* 2010; 644:263-8.

Lazo de la Vega-Monroy ML, Larrieta E, German MS, Baez-Saldana A & Fernandez-Mejia C. Effects of biotin supplementation in the diet on insulin secretion, islet gene expression, glucose homeostasis and beta-cell proportion *J Nutr Biochem.* 2013; 24. 169-77.

Lee JJ, Moon YA, Ha JH, Yon DJ, Ahn YH, Kim KS. Cloning of human acetyl-CoA carboxylase beta promoter and its regulation by muscle regulatory factors. *J Biol Chem.* 2001; 276:2576–2585.

Lippincott W and W. Gastrointestinal care. In: *Nursing Procedures and Protocols.* 2003; 412-466 pp.

Lorenti AS. Células progenitoras hepáticas. *MEDICINA (Buenos Aires).* 2001; 61: 614-620.

Ma TH, Harris MM, Anderson VA, Ahmed I, Ohammad K, Bare JL, *et al.* Tradescantia-Micronucleus (Trad-MCN) tests on 140 health-related agents. *Mutat Res.* 198; 138:157-67.

Maebashi M, Makino Y, Furukawa Y, Ohinata K, Kimura S, Takao S. Therapeutic evaluation of the effect of biotin on hyperglycemia in patients with Non-Insulin Diabetes Mellitus. *J Clin Biochem Nutr.* 1993; 14:211-18.

Marshall MW, Smith BP, Lehmann RP. Dietary response of two genetically different lines of inbred rats: lipids in serum and liver. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1969; 131(4):1271-7.

Marshall MW, Haubrich M, Washington VA, Chang MW, Young CW, Wheeler MA. Biotin status and lipid metabolism in adult obese hypercholesterolemic inbred rats. *Nutr Metab.* 1976; 20(1):41-61.

Marshall MW, Kliman PG, Washington VA, Mackin JF, Weinland BT. Effects of biotin on lipids and other constituents of plasma of healthy men and women. *Artery.* 1980; 7:330-5.

Mates JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology.* 2000; 153: 83–104.

McKean AL, Ke J, Song J, Che P, Achenbach S, Nikolau BJ, Wurtele ES. 2000. Molecular characterization of the non-biotin-containing subunit of 3-methylcrotonyl CoA carboxylase. *J Biol Chem* 275: 5582–5590.

Mock DM. Biotin. In: Ziegler EE, Filer LJ Jr, editors. Present Knowledge in Nutrition. 7th ed. Washington, DC: ILSI Nutrition Foundation. 1996; pp. 220–235.

Nguyen P, Leray V, Diez M, Serisier S, Le Bloc'h J, Siliart B, Dumon H. Liver lipid metabolism. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 2008; 92(3): 272-283.

Pacheco-Alvarez D, Solorzano-Vargas RS, Del Río AL. Biotin in metabolism and its relationship to human disease. *Arch Med Res.* 2002; 33, 439–447.

Paul PK, Duttagupta PN, Agarwal HC. Effects of an acute dose of biotin on the reproductive organs of the female rat. *Curr Sci.* 1973; 42 (6), 206-8.

Paul PK & Duttagupta PN. The effect of an acute dose of biotin at a postimplantation stage and its relation with female sex steroids in the rat *J Nutr Sci Vitaminol.* 1976; 22: 181-6.

Pérez L, Bequer L, Gómez T, González O, Heredia D y Molina O. Actividad de la gamma glutamil transferasa sérica: distribución estadística, variaciones según edad y sexo e intervalos de referencia en villa Clara. *Acta Bioclínica.* 2013; 3(6): 122-143.

Reddi A, De Angelis B, Frank O, Lasker N, Baker H. Biotin supplementation improves glucose and insulin tolerances in genetically diabetic KK mice. *Life Sci.* 1988; 42: 1323-30.

Revilla-Monsalve C, Zendejas-Ruiz I, Islas-Andrade S, Báez-Saldaña A, Palomino-Garibay MA, Hernández-Quiróz PM, Fernandez-Mejia C. Biotin supplementation reduces plasma triacylglycerol and VLDL in type 2 diabetic patients and in nondiabetic subjects with hypertriglyceridemia. *Biomed Pharmacother.* 2006; 60 (4):182-5.

Riverón-Negrete L y Fernández Mejía C. Pharmacological Effects of Biotin in Animals. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry.* 2017; 17(6): 529-540.

Rodríguez-Melendez R. Importance of biotin metabolism, *Rev Invest Clin.* 2000; 52(2):194-9.

Rodríguez-Melendez R y Zemleni J. Nitric oxide signaling depends on biotin in Jurkat human lymphoma cells. *J Nutr.* 2009; 139(3):429-33.

Romero-Navarro G, Cabrera-Valladares G, German MS, Matschinsky FM, Velazquez A, Wang J, Fernandez-Mejia C. Biotin regulation of pancreatic glucokinase and insulin in primary cultured rat islets and in biotin-deficient rats. *Endocrinology.* 1999; 140:4595-600.

Ronquillo-Sánchez MD, Camacho-Carranza R, Fernandez-Mejia C, Hernández-Ojeda S, Elinos-Baez M, and Espinosa-Aguirre JJ. Modulation of the Rat Hepatic Cytochrome P4501A Subfamily Using Biotin Supplementation, *BioMed Research International.* 2013; 627907.

Sahin K, Tuzcu M, Orhan C, Sahin N, Kucuk O, Ozercan IH, *et al.* Anti-diabetic activity of chromium picolinate and biotin in rats with type 2 diabetes induced by high-fat diet and streptozotocin. *Br J Nutr.* 2013; 110(2):197-205.

Said HM, Rose R, Seetharam B. Intestinal absorption of water-soluble vitamins: cellular and molecular aspects. In: Barrett KE, Donowitz M. *Gastrointestinal transport: molecular physiology.* San Diego (CA): Academic Press. 2000; 35–76.

Said HM. Biotin: Biochemical, physiological and clinical Aspects in Water Soluble Vitamins. Clinical Research and Future Applications Ed Stanger, London UK. 2012; 1-20.

Sawamura H, Ikeda C, Shimada R, Yoshii Y, Watanabe T. Dietary intake of high-dose biotin inhibits spermatogenesis in young rats. *Congenit Anom (Kyoto)*. 2015; 55 (1), 31-6.

Shriver BJ, Roman-Shriver C, Allred JB. Depletion and repletion of biotinyl enzymes in liver of biotin-deficient rats: Evidence of a biotin storage system. *J Nutr*. 1993;123:1140–1149.

Singal AK, Jampana SC, Weinman SA. Antioxidants as therapeutic agents for liver disease. *Liver Internat*. 2011; 31: 1432-1448.

Singer GM and Geohas J. The effect of chromium picolinate and biotin supplementation on glycemic control in poorly controlled patients with type 2 diabetes mellitus: a placebocontrolled, double-blinded, randomized trial. *Diabetes Technology and Therapeutics*. 2006; 8 (6):636–643.

Simmins PH & Brooks PH. Supplementary biotin for sows: effect on reproductive characteristics. *Vet Rec*. 1983; 112: 425-9.

Singer GM, Geohas J. The effect of chromium picolinate and biotin supplementation on glycemic control in poorly controlled patients with type 2 diabetes mellitus: a placebo-controlled, double-blinded, randomized trial. *Diabetes Technol Ther*. 2009; 8:636-43.

Soto-Bernardini, MC y Ravetos-Vorst, H. Papel del estrés oxidativo en la esquizofrenia. *Acta Méd. Costarric*. 2008; 50 (4): 197-202.

SRI-International. Microbial mutagenesis testing of substances compound report:F76-041, D- Biotin. 1979; NTIS Report No. PB89-169072.

Steigerwal H, Bohele H. On the influence of biotin upon the intermediated metabolism in: Internat Sympos on drugs affecting lipid metab, June 2-4; 1960. Milan, Italy: 484-486.

Sugita Y, Shirakawa H, Sugimoto R, Furukawa Y, Komai M. Effect of biotin treatment on hepatic gene expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2008; 72:1290-8.

Vilches-Flores A, Tovar AR, Marin-Hernández A, Rojas-Ochoa A y Fernández-Mejía C. Biotin increases glucokinase expression via soluble guanylate cyclase/ protein Kinase G, adenosine triphosphate production and autocrine action of insulin in pancreatic rat islets. *J Nutr Biochem.* 2010; 21(7):606-12.

Vital P, Larrieta E, Rojas-Ochoa A, Vilches A, Zaldivar M, El-Hafidi M, Fernández-Mejía C. 2006. XXVI Congreso de Bioquímica, Guanajuato, México.

Wahnschaffe U, Bitsch A, Kielhorn J, Mangelsdorf I. Mutagenicity testing with transgenic mice. Part I: Comparison with the mouse bone marrow micronucleus test. *Journal of Carcinogenesis.* 2005; 4:3.

Watanabe-Kamiyama M, Kamiyama S, Horiuchi K, Ohinata K, Shirakawa H, Furukawa Y, Komai M. Antihypertensive effect of biotin in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *British Journal of Nutrition.* 2008; 99, 756–763.

Yoshikawa H, Tajiri Y, Sako Y, Hashimoto T, Umeda F, Nawata H. Effects of biotin on glucotoxicity or lipotoxicity in rat pancreatic islets. *Metabolism.* 2002; 51:163-8.

Zempleni J, McCormick DB, Mock DM. Identification of biotin sulfone, bisnorbiotin methyl ketone, and tetranorbiotin-1-sulfoxide in human urine. *Am J Clin Nutr.* 1997; 65:508–511.

Zempleni, J. Uptake localization and noncarboxylase roles of biotin. *Annu Rev Nutr.* 2005; 25, 175-96.

Zhang H, Osada K, Maebashi M, Ito M, Komai M, Furukawa Y. High biotin diet improves the impaired glucose tolerance of long-term spontaneously hyperglycemic rats with non-insulindependent diabetes mellitus. *J Nutr Sci Vitaminol.* 1996; 42: 517- 26.

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*. 1997; 43(3): 271-280.

Zhang YH. Neuronal nitric oxide synthase in hypertension – an update. *Clinical Hypertension*. 2016; 22:20.

Zúñiga G, Torres O, Ramírez MP, Ramos A, Fanti E, Portilla E, García D, Cantú JM, Gallegos MP, Sánchez J. Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 35 mammalian species. *Mutat Res*. 1996; 369:123-127.