

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS MOLECULARES A TRAVÉS  
DE LOS CUALES LA BIOTINA INCREMENTA LA EXPRESIÓN  
DE LA GLUCOCINASA PANCREÁTICA**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE  
**DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA

**BIOL. ALONSO ANTONIO VILCHES FLORES**

DIRECTORA DE TESIS: DRA. CRISTINA FERNÁNDEZ MEJÍA

MÉXICO, D.F. AGOSTO, 2009

UNIDAD DE GENÉTICA DE LA NUTRICIÓN  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA.  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS**

**Estudio de los mecanismos moleculares a través de los cuales  
la biotina incrementa la expresión de la glucocinasa  
pancreática**

Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biomédicas

Presenta

Biol. Alonso Antonio Vilches Flores

Directora de tesis: Dra. Cristina Fernández Mejía

México, D.F. Agosto, 2009

Esta tesis fue desarrollada bajo la tutoría de la Dra. Cristina Fernández Mejía, Investigadora titular C del Instituto de Investigaciones Biomédicas. La mayoría de los experimentos se realizaron en la Unidad de Genética de la Nutrición, del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y del Instituto Nacional de Pediatría.

Este trabajo fue apoyado por beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) número 169971, y por donativos de CONACYT 44266-M y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM, IN201901 y IX229004.

## **CON DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS:**

A mi amada esposa, novia y mejor-amiga Isela Vela, quien me acompañó y apoyo incondicionalmente a lo largo de esta aventura y en muchas otras que nos esperan. Esta tesis también es tuya y para ti. I love you, Dading!

A mis padres, Luz y Julio, por darme la vida y los genes para llegar hasta el límite en cada meta. Con todo mi amor y cariño.

A la Dra. Cristina Fernández, por su total apoyo, guía, consejos y conocimiento que hicieron de esta tesis un proyecto muy especial. Muchas gracias por aceptarme como su alumno de Doctorado por todos estos años. Con todo mi agradecimiento y reconocimiento por siempre.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, de la Unidad y del INP, que hicieron conmigo la parte divertida del doctorado, entre comidas, experimentos y seminarios. Que las risas nunca falten: Maria Luisa, Teresita, Alberto, Jose Luís, Nayelli, Memo, Paty, Ethel, Marco, Alan, Sara, Elena, Paz, Lilian, Daniel, Ana, Carlette, Miriam, Saúl, Zazil, Ángeles, Matías, Tere, Marthita, Cinthia, Isabel, y al Dr. Antonio Velazquez.

A mis maestros y guías académicas que me aconsejaron y enseñaron a lo largo del doctorado: Dr. Armando Tovar, Dr. Marco Cerbón, Dra. Martha Pérez, Dra. Sumiko Morimoto, Dr. Rafael Moreno, Dra. Maria Eugenia Torres, Dr. Ignacio Camacho, Dra. Cristina Revilla, Dra. Ana Polanco, Dra. Armida Báez, Dra. Lourdes Basurto, Dr. Marcelino Hernández, y el Dr. Silvestre Frenk. Y sin dejar de lado también a mis amigos académicos que me apoyaron en diversos laboratorios: Lilia, Guillermo, Iván, Berenice (de Nutrición); Elvia, Bert, Edna, Horacio, Sandra y Miriam (INP); Tamara, Victor y Siraam (IFC).

A mis amigos y compañeros de Iztacala, quienes vieron un reflejo de este trabajo: Martha, Irma, José, Eduardo, Martín, Toño, Anita, Ricardo, Marthita, Raquel y Jaime. Y a mis colegas de carrera Natalia, Tere, Rafa, Adrian, Cinthia Alita, Isabel, Carmen, Miriam, Cesar, Jorge y Yuri.

Y también va a quienes estuvieron indirectamente involucrados en el largo proceso: Leo, Ana, Adrian y Julio; a mi abuela Gloria, mi abuelo Jesús, Betito, mis tías, tíos y primos; A mis suegros por su total apoyo; a mis queridos amigos de la AOFM (Oscar, Lalo, Quique y familias); y del exHJC (Mau, Mayte, Lalo, Susana, Jorge, Andrea, Mario, Norma, Miguel, Fabiola, Dino, Morex, Freddy, Alex, Klaus, Ives, Daniel y un largo ETC). Muchas gracias por sus porras.

*Con estas y otras muchas exhortaciones, anunciaba las buenas nuevas al pueblo. Lucas 3:18*

*Here's where the fun begins! Han Solo.*

## INDICE

Resumen .....	4
Abstract .....	5
Agradecimientos especiales .....	6
Abreviaturas frecuentes .....	7
1. Introducción. ....	8
1.1 Biotina. ....	8
1.2 Funciones de la biotina como grupo prostético. ....	9
1.3. La biotina como modulador de la expresión genética. ....	11
1.3.1. Efectos de la biotina sobre la transcripción. ....	11
1.3.2. Efectos de la biotina sobre la traducción. ....	12
1.4. Mecanismos de acción de la biotina sobre la expresión génica. ...	13
1.4.1. La biotilación de histonas. ....	13
1.4.2. La cascada de señalización del GMP cíclico. ....	16
1.5. Efecto de la biotina sobre el metabolismo de los carbohidratos ...	18
1.6. Importancia de la glucocinasa en el metabolismo de los carbohidratos. ....	18
1.6.1 Características bioquímicas y moleculares de la glucocinasa. ...	20
1.6.2 Regulación de la expresión de la glucocinasa. ....	22
1.6.3 Efecto de la biotina sobre la actividad y expresión de la glucocinasa. ....	24
1.6.4 El papel de la insulina como modulador autocrino de expresión genética en el islote. ....	25
2. Planteamiento del problema. ....	26
2.1. Hipótesis .....	26
3. Objetivos. ....	28
3.1. Objetivo general. ....	28
3.2. Objetivos particulares. ....	28
4. Material y métodos. ....	29

4.1. Aislamiento y cultivo de islotes pancreáticos de Langerhans .....	29
4.2. Tratamientos e inhibidores. ....	29
4.3. Expresión de la glucocinasa pancreática por RT-PCR en tiempo real.	30
4.4. Determinación de ATP intracelular. ....	32
4.5. Determinación de insulina. ....	33
4.6. Determinación de la actividad específica de la glucocinasa .....	33
4.7. Análisis estadístico .....	34
5. Resultados. ....	35
5.1. Incremento de la abundancia del mRNA de la glucocinasa pancreática con biotina y el GMPc. ....	35
5.2. La vía de señalización del GMPc participa en el efecto de la biotina sobre la expresión de la glucocinasa pancreática. ....	38
5.3. El efecto de la biotina sobre la expresión de la glucocinasa pancreática requiere de la secreción de insulina. ....	39
5.4. La biotina modifica el contenido de ATP en los islotes vía PKG. ..	41
5.5. La biotina afecta la expresión de la glucocinasa pancreática a través de la acción autocrina de la insulina. ....	43
5.6. Efecto de la biotina sobre la actividad específica de la glucocinasa .	47
6. Discusión. ....	48
7. Conclusiones. ....	55
8. Referencias. ....	56
9. Anexo .....	67

## RESUMEN

La biotina tiene importantes efectos sobre la expresión de genes, además de su papel como grupo prostético de las carboxilasas. Sin embargo, los mecanismos moleculares a través de los cuales la biotina ejerce estos efectos han sido poco explorados. Existen evidencias de que la administración de dosis farmacológicas de biotina incrementa tanto la expresión como la actividad de la glucocinasa pancreática. En este trabajo se estudian los mecanismos a través de los cuales la biotina realiza este efecto. Islotes pancreáticos de ratas Wistar fueron tratados con biotina o 8-Br-GMPc, en presencia o ausencia de diferentes tipos de inhibidores. La abundancia del mRNA de glucocinasa y del rRNA 18s fue analizada por RT-PCR en tiempo real. El contenido de ATP fue cuantificado por fluorimetría; y el de insulina por ELISA. El tratamiento con biotina incrementa la abundancia del mRNA de la glucocinasa aproximadamente al doble después de 2 horas; el efecto se sostuvo hasta las 24 horas. La inhibición de la señalización por guanilato ciclasa soluble o de la proteína cinasa G (PKG) bloqueó el efecto inductor de la biotina. La cascada de eventos posteriores a la PKG en la transcripción genética mediada por la biotina no se conoce. Encontramos que la inhibición de la secreción de insulina con diazóxido o nifedipina atenúa el aumento en el mRNA de la glucocinasa inducido por la biotina. El tratamiento con la vitamina incrementó el contenido de ATP en el islote (control:  $4.68 \pm 0.28$ ; con biotina:  $6.62 \pm 0.26$  pmol/islet/30min). Al inhibir la actividad de la PKG no se observa el efecto de la biotina sobre el contenido de ATP. Con anticuerpos anti-insulina e inhibidores de la vía de señalización de la insulina por fosfoinositol-3-cinasa (PI3K) /Akt también se bloquea el aumento en la expresión de la glucocinasa inducido por la vitamina. Los islotes tratados con 8-Br-GMPc presentan los mismos efectos de la biotina. Concluimos que el aumento en la abundancia de mRNA de glucocinasa inducido por biotina involucra la activación de la guanilato ciclasa soluble y PKG, que provoca a un incremento en el contenido de ATP, y a la secreción de insulina mediada por los canales de potasio sensibles a ATP. De manera autocrina, la insulina activa la vía de señalización de PI3K/Akt. Estos resultados ofrecen nuevas perspectivas sobre los mecanismos que participan en la expresión genética mediada por la biotina.

## ABSTRACT

Biotin has important effects on gene expression besides its role as a carboxylase prosthetic group. However, the molecular mechanisms through which biotin exerts these effects are largely unknown. There are evidences that pharmacological dosis of biotin increases pancreatic glucokinase expression and activity. In this work we explored the mechanisms underlying this effect. Pancreatic islets from Wistar rats were treated with biotin or 8-Br-cGMP, in the presence or absence of different types of inhibitors. Glucokinase mRNA and 18s rRNA abundance were determined by Real-Time PCR. ATP content was analyzed by fluorometry, and insulin by ELISA. Biotin treatment increased glucokinase mRNA abundance approximately 1-fold after 2 h; the effect was sustained up to 24h. Inhibition of soluble guanylate cyclase or protein kinase G (PKG) signaling suppressed biotin-induced glucokinase expression. The cascade of events downstream of PKG in biotin-mediated gene transcription is not known. We found that inhibition of insulin secretion with diazoxide or nifedipine prevented biotin-stimulated glucokinase mRNA increase. Biotin treatment increased islet ATP content. (Control:  $4.68 \pm 0.28$ ; biotin treated:  $6.62 \pm 0.26$  pmol/islet/30min). Inhibition of PKG activity suppressed the effects of biotin on ATP content. Insulin-antibodies or inhibitors of phosphoinositol-3-kinase (PI3K)/Akt insulin signaling pathway prevented biotin-induced glucokinase expression. Islet-treated with 8-Br-cGMP showed the same effects than biotin. We propose that the induction of pancreatic glucokinase mRNA by biotin involves guanylate cyclase and PKG activation, which leads to an increase in ATP content. This induces insulin secretion via ATP-sensitive potassium channels. Autocrine insulin, in turn, activates PI3K/Akt signaling. These results offer new insights on the pathways that participate in biotin-mediated gene expression.



## **AGRADECIMIENTOS ESPECIALES**

Al M. en C. Alberto Rojas Ochoa, de la Unidad de Genética de la Nutrición, del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y del Instituto Nacional de Pediatría: por su asesoría y facilidades otorgadas para el aislamiento y cultivo de islotes pancreáticos, así como en diversas técnicas de biología molecular.

A la Dra. Martha Pérez Armendariz, del Departamento de Medicina Experimental, de la Facultad de Medicina de la UNAM: por sus constantes comentarios y sugerencias al desarrollo de este proyecto y en la revisión del artículo publicado.

Al Dr. Marco Antonio Cerbón, de la Facultad de Química de la UNAM, y al Dr. Armando Tovar del Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán: por su constante apoyo, comentarios y sugerencias al desarrollo de este proyecto como parte de mi comité tutorial.

Al M. en C. Álvaro Marín Hernández, del Departamento de Bioquímica, del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez: por su asesoría y facilidades otorgadas para la determinación de ATP intracelular.

A la Dra. Sumiko Morimoto, del Departamento de Biología de la Reproducción, del Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán: por su asesoría y adiestramiento en la determinación de insulina secretada por islotes.

A la Dra. Carmen Beltrán, del Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Mitocondrial, del Instituto de Biotecnología de la UNAM: por su asesoría y adiestramiento en la determinación del contenido de GMPc intracelular.

Al Dr. Eulises Díaz, del Departamento de Biología de la Reproducción, del Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán: por proporcionarnos una alícuota de su suero anti-insulina, obtenido en conejos inmunizados en su laboratorio.

## ABREVIATURAS FRECUENTES

GK: glucocinasa

ATP: adenosin trifosfato

GMPc: guanosín monofosfato cíclico

PKG: proteína cinasa dependiente de GMPc

PKB: proteína cinasa B

AMPc: adenosín monofosfato cíclico

mRNA: ácido ribonucleico mensajero

rRNA: ácido ribonucleico ribosomal

DNA: ácido desoxiribonucleico

cDNA: DNA copia de cadena sencilla

K: lisina

PBS: solución amortiguadora de fosfatos

ODQ: 1-H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3- $\alpha$ ]quinoxalin-1one

Rp-cGMPS: Rp-8[4-clorophenylthio]-guanosine-3'5'-cyclic monophosphorothioate

PI3K: fosfoinositol-3-cinasa

iAkt: inhibidor de la Akt (1-L-6-hydroxymethyl-chiro-inositol-2-[(R)-2-O-methyl-3-O-octadecylcarbonate])

BSA: Albúmina de suero bovino

DEPC: Di-etil pirocarbonato

RT: Reverso-trascricpción

Ct: umbral de ciclos (cycle threshold)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)

NADPH<sup>H+</sup>: Fosfato de nicotin-adenin dinucleótido reducido

G6PDH: glucosa-6 fosfato deshidrogenasa

## 1. INTRODUCCION

El conocimiento de los mecanismos de acción de las vitaminas ha permitido un avance sustancial en la comprensión de la regulación de diversas funciones biológicas. El estudio de las acciones genéticas y mecanismos moleculares de las vitaminas liposolubles es actualmente el más extenso y profundo (Carlberg, 1999; Balmer, 2002; Chistakos, 2003; Tully, 1994). Las funciones de las vitaminas A y D como moduladores de la expresión genética son las más conocidas, desde su función como precursoras de ligandos que se unen a receptores nucleares hasta sus efectos genómicos. En contraste, el conocimiento que se tiene acerca de las vitaminas hidrosolubles como moduladores genéticos es escaso, aunque cada vez son más las evidencias que demuestran sus efectos en la regulación de la expresión de genes. (Combs, 1994; Brandsch, 1994).

### 1.1 Biotina.

La biotina (vitamina H) es una vitamina hidrosoluble del complejo B que participa como grupo prostético de las enzimas carboxilasas, las cuales intervienen en importantes vías metabólicas como la gluconeogénesis, la síntesis de lípidos y el catabolismo de algunos aminoácidos (Achuta, 1972). La biotina está formada por un anillo ureído que contiene un enlace con azufre y una cadena lateral de ácido valérico. Es una vitamina de 244.3 g/mol, soluble en agua (0.02% w/v), etanol (0.08% w/v) y álcalis diluidos.

La biotina no puede ser sintetizada por los organismos eucariontes, lo que hace necesario su consumo en la dieta, el cual oscila entre 75 y 200 µg diarios. La biotina se encuentra en varios alimentos, tales como las nueces, la yema de huevo, el hígado, la levadura, entre otros, generalmente unida a una lisina formando biocitina (Dakshinamurti y Chauhan, 1994). Para su absorción se requiere romper este enlace por acción de la biotinidasa pancreática (Hymes, 1996). La biotina libre es entonces absorbida por los enterocitos de la porción distal del duodeno y proximal del yeyuno, y posteriormente pasa al torrente sanguíneo. La concentración fisiológica de biotina en mamíferos es de 10 nM

(Rodríguez-Melendez y Zemleni, 2003). La entrada a la célula se lleva a cabo por un transportador múltiple de vitaminas dependiente de sodio (SMVT) que reconoce principalmente la porción del ácido valérico de la biotina (Cohen, 1982). SMVT es una proteína de 634 aminoácidos, con 12 dominios transmembranales, y cuyos extremos amino y carboxilo se encuentran hacia el interior de la célula. La biotina y el ácido pantoténico se introducen a la célula junto con sodio, en un simportador electroneutro a favor de un gradiente de concentración (Chatterjee, 1999). Existen evidencias que sugieren la presencia de otros tipos de transportadores en la membrana de diferentes tipos celulares (Manthey, 2002).

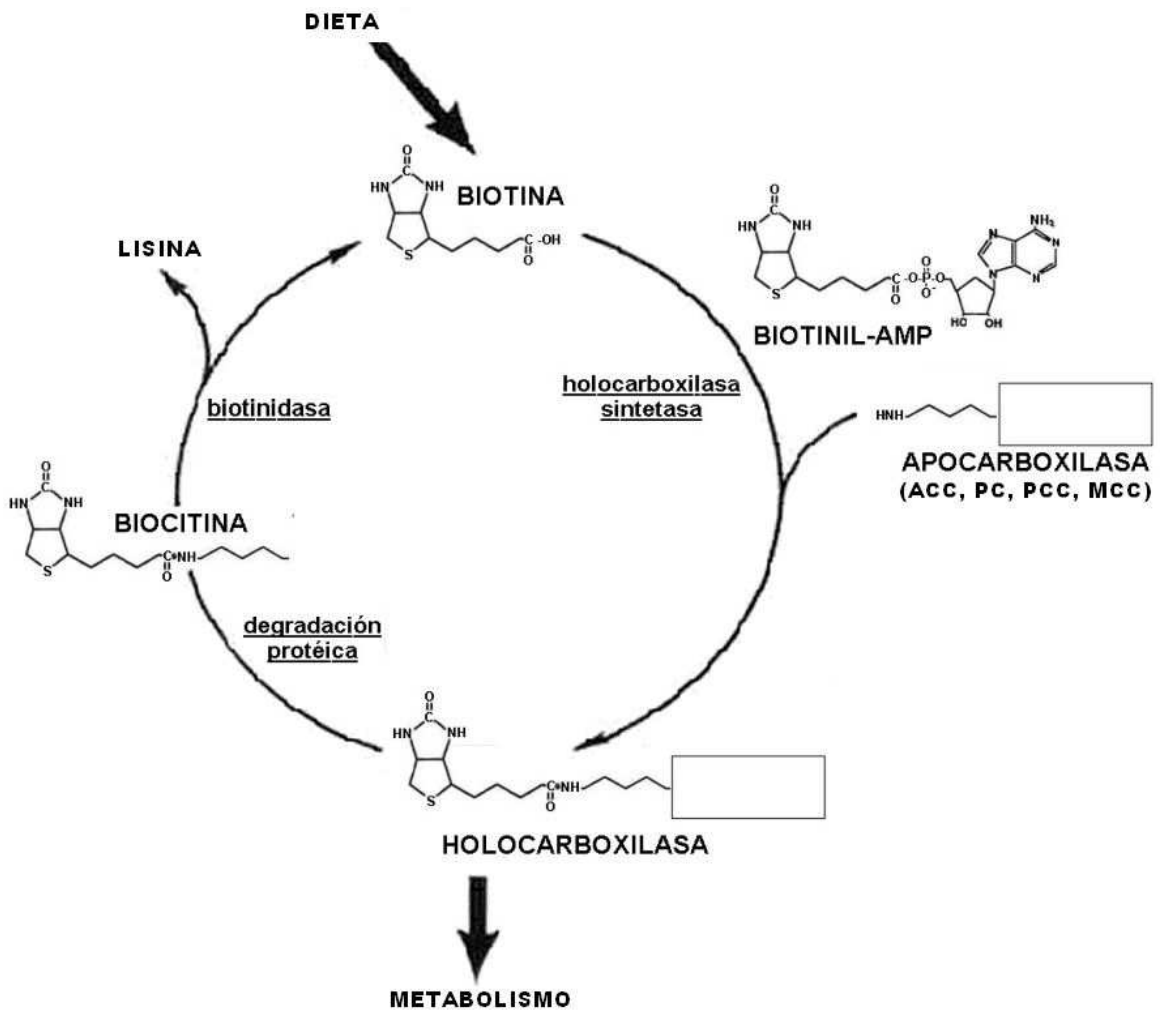
## **1.2. Funciones de la biotina como grupo prostético.**

La biotina se une como grupo prostético a las enzimas carboxilasas para que éstas realicen sus reacciones de carboxilación: 1) acetil-CoA carboxilasa (E.C. 6.4.1.2), tanto la isoforma citosólica como la mitocondrial, 2) propionil-CoA carboxilasa (E.C. 6.4.1.3), 3) piruvato carboxilasa (E.C. 6.4.1.1), 4) 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa (E.C.6.4.1.4) (Chapman, 1999). Estas enzimas participan dentro de las vías metabólicas de la gluconeogénesis, la biosíntesis de ácidos grasos y el catabolismo de aminoácidos.

Las carboxilasas se sintetizan como apoenzimas sin actividad. La unión covalente de la unión de la biotina es catalizada por la holocarboxilasa sintetasa (E.C. 6.3.4.10), tanto en el citosol y en la mitocondria, en dos etapas: primero, la biotina es activada por el ATP, formándose el intermediario biotinil-5'-adenilato. Segundo, se forma un enlace covalente entre el grupo carboxilo de la cadena de ácido valérico de la biotina y el grupo  $\epsilon$ -amino de una lisina específica localizada dentro de una secuencia Met-Lys-Met altamente conservada en todas las apocarboxilasas (Lamhonwah, 1987).

La reacción que realiza entonces la holocarboxilasa es la formación de un intermediario carboxifosfato, en presencia de  $\text{HCO}_3^-$  y de ATP, seguido de la transcarboxilación del  $\text{CO}_2$  acarreado por la biotina hacia el sustrato específico de cada carboxilasa (Jitrapakdee, 2003).

La biotina permanece unida a la carboxilasa hasta que es degradada proteolíticamente en el sistema autofágico lisosomal, liberando residuos de biotina unida a la lisina (biocitina). Este enlace se rompe por acción de la biotinidasa (E.C. 3.5.1.12), liberando a la biotina para ser reutilizada nuevamente en nuevas carboxilasas, o bien puede ser degradada a otros catabolitos y ser excretada, como la bisnorbiotina y la biotina sulfóxido (Wang, 1997). (Figura 1).



**Figura 1.** Ciclo de la biotina como grupo prostético de las enzimas carboxilasas.

### **1.3. La biotina como modulador de la expresión genética.**

Además de su acción como grupo prostético de las carboxilasas, existen cada vez más evidencias que indican que la biotina interviene en otras funciones biológicas. Se ha encontrado que la biotina afecta la diferenciación tisular, el desarrollo embrionario y el crecimiento celular (Bhullar, 1985; Watanabe, 1990; 1996; Zempleni, 2001), la maduración de linfocitos (Baez-Saldaña, 1998; 2004), la diferenciación de los túbulos seminíferos y la espermatogénesis (Paulose, 1989), el metabolismo de los carbohidratos y lípidos (Vilches-Flores, 2005), y la expresión de genes, tanto a nivel transcripcional como en la traducción (Dakshinamurti y Chauhan, 1994).

Este efecto dual de la biotina es similar al efecto de otras vitaminas, como la vitamina A y D, quienes son capaces de intervenir directamente en el metabolismo y afectar la expresión de los genes (Balmer, 2002; Chistakos, 2003). En el caso de la vitamina A, ésta es capaz de intervenir como retinal en procesos de visión y a su vez, al ser transformada en ácido retinoico, actúa como reguladora de la expresión génica. En contraste, se conoce poco acerca de las vitaminas hidrosolubles como moduladores genéticos, sin embargo, los ejemplos de sus efectos sobre la expresión de genes se han incrementado recientemente.

#### **1.3.1. Efectos de la biotina sobre la transcripción.**

La biotina modifica la expresión genética tanto al nivel de la transcripción como de la traducción (Fernandez-Mejia C, 2005; Vilches-Flores, 2005; Dakshinamurti, 2005). Múltiples estudios han encontrado que esta vitamina modifica la abundancia del mRNA de diversos genes. Recientemente, con la ayuda de la tecnología de microarreglos se ha revelado que la expresión de miles de genes es afectada por la biotina (Wiedmann, 2004; Camporeale, 2006; Rodriguez-Melendez, 2006). En un estudio en humanos se encontró que en células mononucleadas de sangre periférica, la administración de biotina (2.15 mg al día durante 21 días) promovió positivamente la expresión de 139 genes, mientras que disminuyó la de otros 131 (Wiedmann, 2004). En la línea celular

HepG2 se ha reportado que la biotina modifica la expresión de más de 1800 genes (Rodríguez-Melendez, 2006).

Entre los genes cuya expresión está regulada por la biotina se encuentran algunas de las enzimas que requieren de la vitamina como grupo prostético y sustrato, como son piruvato carboxilasa, acetil-CoA carboxilasa 1 y propionil-CoA carboxilasa, y la holocarboxilasa sintetasa (Rodríguez-Melendez, 2001; Solorzano-Vargas, 2002). En los mamíferos, la biotina favorece la expresión de enzimas y hormonas que participan en el metabolismo de carbohidratos, como la glucocinasa hepática y pancreática (Chauhan, 1991; Romero-Navarro, 1999), y la insulina (Romero-Navarro, 1999); en contraste, la biotina disminuye la expresión de la fosfoenolpiruvato carboxilasa hepática sin afectar a la isoenzima renal (Dakshinamurti y Li, 1994). La expresión de varios factores transcripcionales como PDX-1 (Yoshikawa, 2002), NF- $\kappa$ B (Rodríguez-Melendez, 2004), SP1 y SP3 (Griffin, 2003) y de oncogenes como N-myc, c-myc, N-ras y raf (Scheerger, 2003) también es afectada por la biotina. En la línea celular Jurkat derivada de linfocitos se ha observado que la presencia de biotina en el medio afecta la expresión de la interleucina 2 y el receptor de interleucina 2 (Manthey 2002; Rodríguez-Melendez, 2003). Recientemente se ha reportado en células HepG2 que la biotina afecta la expresión de genes que codifican para las subunidades ribosomales y del factor 5<sup>a</sup> de inicio de la traducción en eucariontes (Rodríguez-Melendez, 2006).

### **1.3.2. Efectos de la biotina sobre la traducción.**

La biotina también afecta la expresión de genes al nivel post-transcripcional. Stocker y cols., reportaron que en la línea celular HepG2, la biotina modifica la expresión del receptor para asialoglicoproteínas, un sistema hepático de captación de glicoproteínas sin ácido siálico, circulantes en sangre (Collins, 1988; Stockert, 1990, 1992, 1997; De la Vega, 1999), y la expresión del receptor de la insulina (De la Vega, 2000). La vitamina modifica la traducción del receptor para asialoglicoproteínas a través de una vía que requiere de GMP cíclico (GMPc) y de la proteína cinasa G (PKG), lo cual induce a un aumento en la fosforilación y activación de la subunidad  $\alpha$ -COP, una proteína coatomérica

de 140 kDa asociada al complejo de traducción COP-I, en la región *trans* de la membrana del Golgi. COP-I es una proteína de siete subunidades que esta involucrada con el tráfico de vesículas y en los mecanismos de traducción (Serafini, 1991). La subunidad  $\alpha$ -COP fosforilada se une a elementos *cis* localizados en un fragmento de 187 nucleótidos de la región no traducida 5' del mRNA del receptor, repercutiendo de manera positiva sobre la traducción de esta proteína.

#### **1.4. Mecanismos de acción de la biotina sobre la expresión génica**

Si bien el efecto de la biotina sobre la expresión de genes se encuentra ampliamente demostrado, se sabe poco de los mecanismos moleculares mediante los cuales se produce su acción. Se han descrito dos diferentes mecanismos: a) la biotinilación de histonas y b) la cascada de señalización del GMPc.

##### **1.4.1. La biotinilación de histonas.**

La regulación de la expresión genética a nivel de la estructura de la cromatina está determinada por las propiedades fisicoquímicas que presenten las histonas. Estas proteínas básicas que rodean al ADN pueden ser modificadas por procesos de acetilación covalente, metilación, fosforilación, ubiquitinación, poli ADP-ribosilación y biotinilación, de grupos  $\epsilon$ -amino (en lisinas), grupos guanidino (argininas), grupos carboxilos (glutamato) y grupos hidroxilos (serinas) (Kothapalli, 2005).

Las primeras observaciones que demostraron la presencia de biotina en el núcleo, mostraban a la vitamina unida de manera reversible a una proteína no identificada de 60 kD (Dakshinamurti, 1963a y 1963b). Esto sugería la posibilidad de que la biotina tuviera efectos sobre regulación génica por un mecanismo similar al utilizado por las vitaminas A y D.

En años más recientes se describió la presencia de biotina en el núcleo, asociada a las histonas en forma de biotinilación. La primera evidencia se

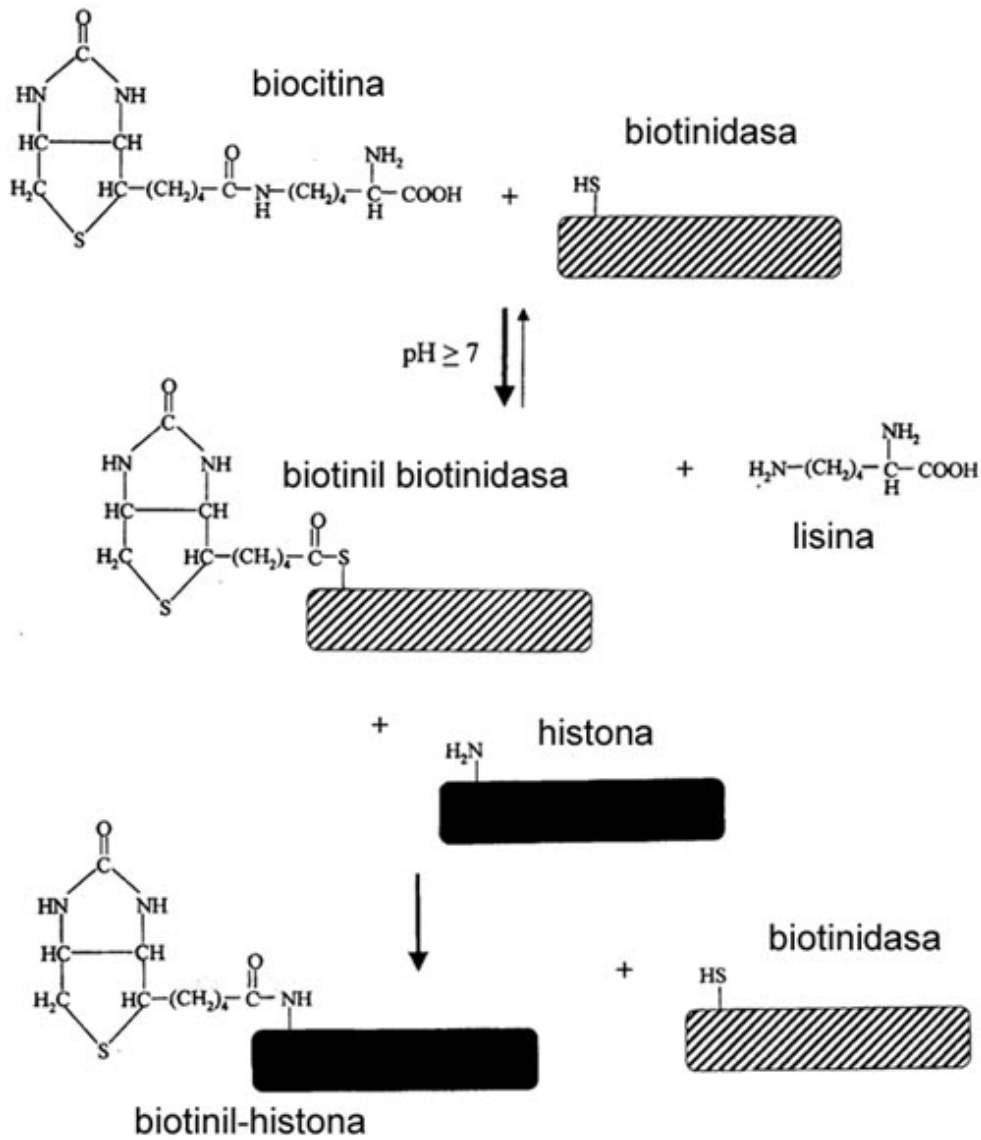


observó en la proliferación de células de linfoma humano, donde se identificaron biotinilaciones en diferentes residuos de lisina localizados en las histonas H2A, H3 y H4 (Stanley, 2001). Estos cambios epigenéticos provocan alteraciones en la estructura de la cromatina, los cuales resultan en los efectos que se observan de la biotina sobre la expresión genética, la reparación del DNA y el control de la proliferación (Stanley, 2001; Peters, 2002; Kothapalli, 2005; Narang, 2004).

La presencia en el núcleo de dos enzimas claves en el metabolismo de la biotina, la biotinidasa y la holocarboxilasa sintetasa (Hymes, 1999; Stanley, 2001), así como su demostrada capacidad de biotinar histonas, apoyan igualmente esta hipótesis. Se ha observado que a un pH cercano a 7, la biotinidasa transforma un residuo de biocitina, biotina- $\epsilon$ -lisina, en un intermediario biotinil-tioéster, y con éste, se transloca al núcleo (Hymes, 1995; Stanley, 2001; Crisp, 2004). La biotinil biotinidasa transfiere entonces la biotina al grupo  $\epsilon$ -amino de las lisinas localizadas en la posición K9, K13 y K129 en la histona H2A; K4, K9 y K18 en la histona H3; y en K8 y K12 de la histona H4 (Kothapalli, 2005) (Figura 2). Narang y cols. (2004), encontraron que la holocarboxilasa sintetasa se encuentra dentro del núcleo asociada con la cromatina y con la lámina nuclear, y que durante la mitosis se distribuye en estructuras con forma de anillo. En adición, los fibroblastos de pacientes con deficiencia de la enzima presentan menos histonas biotiniladas que los fibroblastos de individuos no deficientes. En los pacientes que presentan defectos en las funciones de la biotina se observan alteraciones importantes en el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas, y su tratamiento requiere de la ingesta diaria de dosis farmacológicas de biotina (Wolf, 2001).

Se ha observado que en la proliferación de linfocitos polimorfonucleares, la cantidad de histonas biotiniladas se incrementa (Zempleni, 2001), al igual que durante el ciclo celular (Stanley, 2001) y en respuesta por el daño producido al DNA por luz ultravioleta (Peters, 2002). Estas funciones sugieren que la biotinilación de histonas podría estar ligada en la reparación y/o replicación del DNA. Sin embargo, existen controversias en este mecanismo. Bailey y cols. (2008) reportaron que la estreptoavidina, la cual se emplea para detectar las

histonas biotiniladas, puede unirse a estas proteínas sin la presencia de la vitamina. Utilizando biotina marcada radioactivamente, encontraron que solo las carboxilasas estaban unidas covalentemente a la biotina y que las histonas tan sólo representaban el 0.03% del total de las proteínas biotiniladas.



**Figura 2.** Biotinilación de histonas por acción de la biotinidasa. Modificado de Hymes & Wolf, 1999.

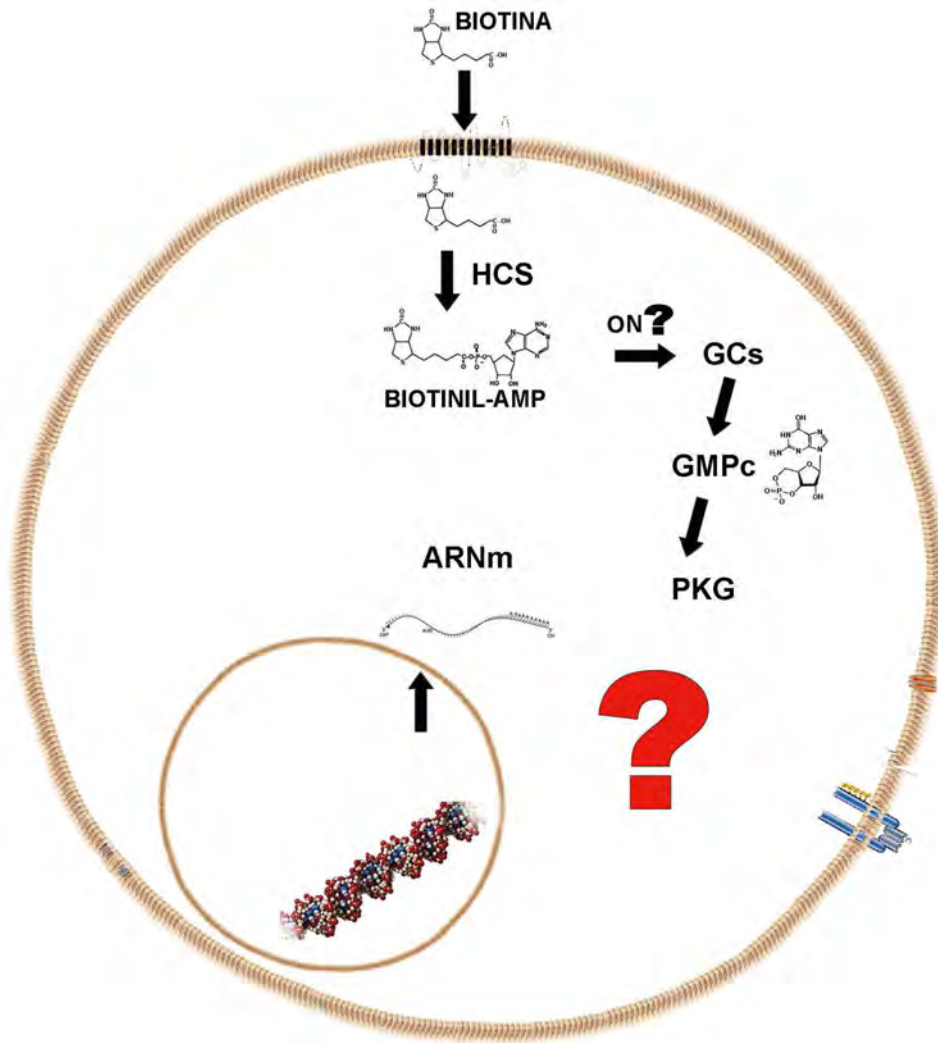
#### **1.4.2. La cascada de señalización del GMP cíclico.**

Un denominador común encontrado en la expresión de la glucocinasa hepática y el receptor para asialoglicoproteínas, inducidos por biotina, es el incremento en el contenido celular de GMPc a través de un aumento en la actividad de la guanilato ciclasa soluble (Vesely, 1982).

La guanilato ciclasa soluble es una proteína citosólica conformada por dos subunidades,  $\alpha$  y  $\beta$ , de 76 y 80 kDa respectivamente. Hasta la fecha se han descrito 3 isoformas de cada subunidad que conservan una alta homología entre ellas, y su mayor expresión se encuentra en aquellas células que requieren de una mayor entrada y movilización de calcio (Denninger, 1999). La subunidad  $\beta$  contiene en la posición His105 un grupo hemo rodeado de residuos de cisteína, el cual al interactuar con el óxido nítrico o con el monóxido de carbono cambia de un enlace penta-coordinado a uno hexa-coordinado, lo que provoca un cambio de conformación entre las dos subunidades. El sitio catalítico se encuentra estructurado por los extremos carboxilo-terminal de ambas subunidades, y la síntesis de GMPc se realiza en presencia de  $Mg^{2+}$  (Wedel, 1995).

La conversión catalítica de la biotina a biotinil-AMP, realizada por la actividad de la holocarboxilasa sintetasa, aumenta la actividad de la guanilato ciclasa soluble por un mecanismo aún desconocido (Solorzano-Vargas, 2002). El GMPc generado activa a la proteína cinasa G (PKG) (Spence, 1984; De la Vega, 1999), sin embargo, se desconocen los mecanismos que participan en expresión de genes más allá de la participación de la PKG (Figura 3). Un reporte reciente sugiere que en esta vía de señalización interviene la síntesis de óxido nítrico (Rodríguez-Melendez, 2009), pero no demuestra el efecto directo de la biotina sobre la producción de óxido nítrico.

Hasta el momento no se existen evidencias de que los dos mecanismos de acción de la biotina sean excluyentes, de modo que podrían ocurrir simultáneamente.



**Figura 3.** Mecanismo de acción de la biotina sobre la expresión genética a través de la vía Guanilato ciclasa soluble / PKG.

### **1.5. Efecto de la biotina sobre el metabolismo de los carbohidratos.**

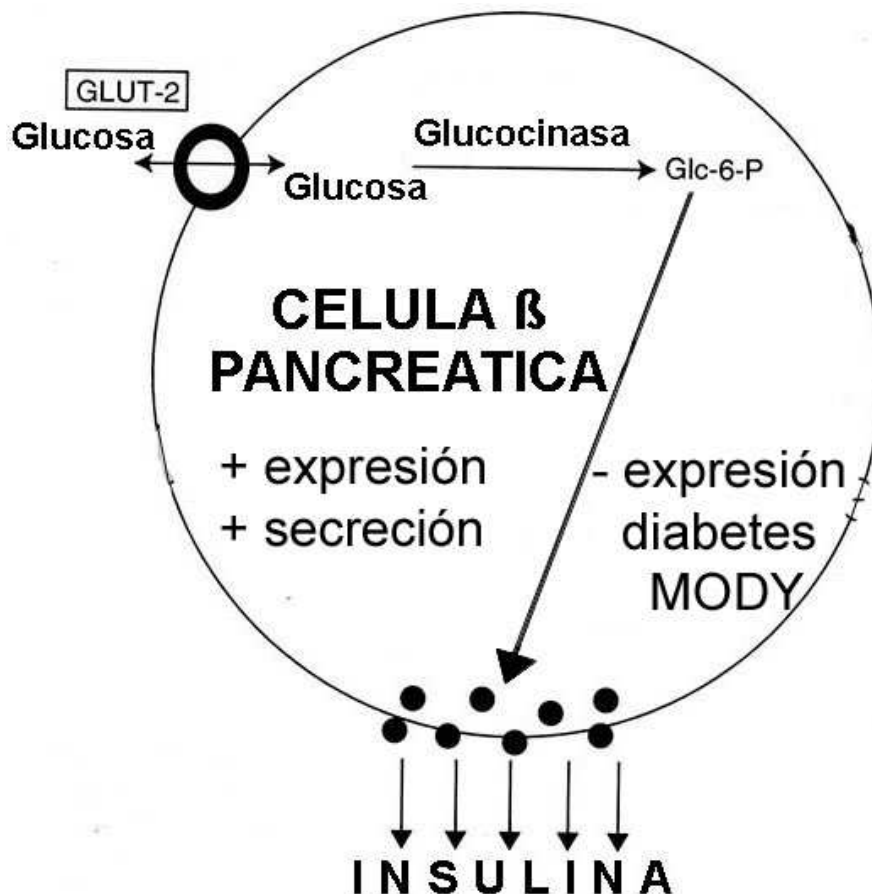
Diversos estudios han encontrado que la biotina participa en la regulación del metabolismo de los carbohidratos. Este efecto de la vitamina es de particular interés médico en el tratamiento de enfermedades como la diabetes mellitus. Se ha reportado que la administración de dosis farmacológicas de biotina disminuye la hiperglucemia y mejora el cuadro clínico, tanto en modelos animales como en pacientes con diabetes tipo I y II (Coggeshall, 1985; Maebashi, 1993; Reddi, 1988; Zhang, 1997; Koustikos, 1966; Albarracin, 2005; Singer, 2006). Este efecto concuerda con la acción de la biotina sobre la expresión de genes que favorecen la captación y el catabolismo de la glucosa, como el gen de la insulina (Romero-Navarro, 1999), la glucocinasa hepática y la pancreática (Spence, 1984; Romero, 1999) y la traducción del receptor de la insulina (De la Vega, 1999). También se ha reportado que la biotina aumenta la secreción de la insulina (Romero-Navarro, 1999; Sone 1999; 2000).

### **1.6. Importancia de la glucocinasa en el metabolismo de los carbohidratos.**

Resulta interesante el hecho de que la biotina afecta la expresión y actividad de la glucocinasa, considerando el importante papel que tiene esta enzima en el metabolismo de los carbohidratos. En el hígado, la glucocinasa es un elemento crítico en la captación de glucosa postprandial y en su almacenamiento como glucógeno. En las células  $\beta$  del páncreas la glucocinasa tiene una función esencial en el mecanismo que permite la secreción de insulina en respuesta a la cantidad de glucosa sanguínea (Meglasson, 1996). El complejo mecanismo de secreción inicia con la actividad de la glucocinasa pancreática, la cual actúa como un marcapasos.

Diversos estudios en ratones transgénicos han encontrado que el aumento en la actividad de la glucocinasa pancreática produce un incremento en la secreción de la insulina, lo que repercute en la disminución de niveles de glucosa en sangre (Matschinsky, 1996, Glaser, 1998). Así también, cuando la actividad de la glucocinasa se encuentra disminuida, la secreción de insulina es

menor y se presenta hiperglucemia. Mutaciones que modifican la actividad de la glucocinasa son causantes de enfermedades con defectos en la homeostasis de la glucosa como la diabetes MODY-2 (Velho, 1992) o la hiperinsulinemia-hipoglucemia persistente de la infancia (PHHI-GK). Pacientes con mutaciones que afectan la actividad de la glucocinasa de manera negativa presentan deficiencias en la secreción de insulina en respuesta a la glucosa (Ferre, 1996; Velho, 1992). En tanto que pacientes con mutaciones que producen mayor actividad de la enzima presentan un aumento de la secreción de insulina e hipoglucemia (Glaser, 1998). Por lo tanto, la glucocinasa tiene un papel primordial en el control de los niveles de la glucosa en sangre. (Figura 4).



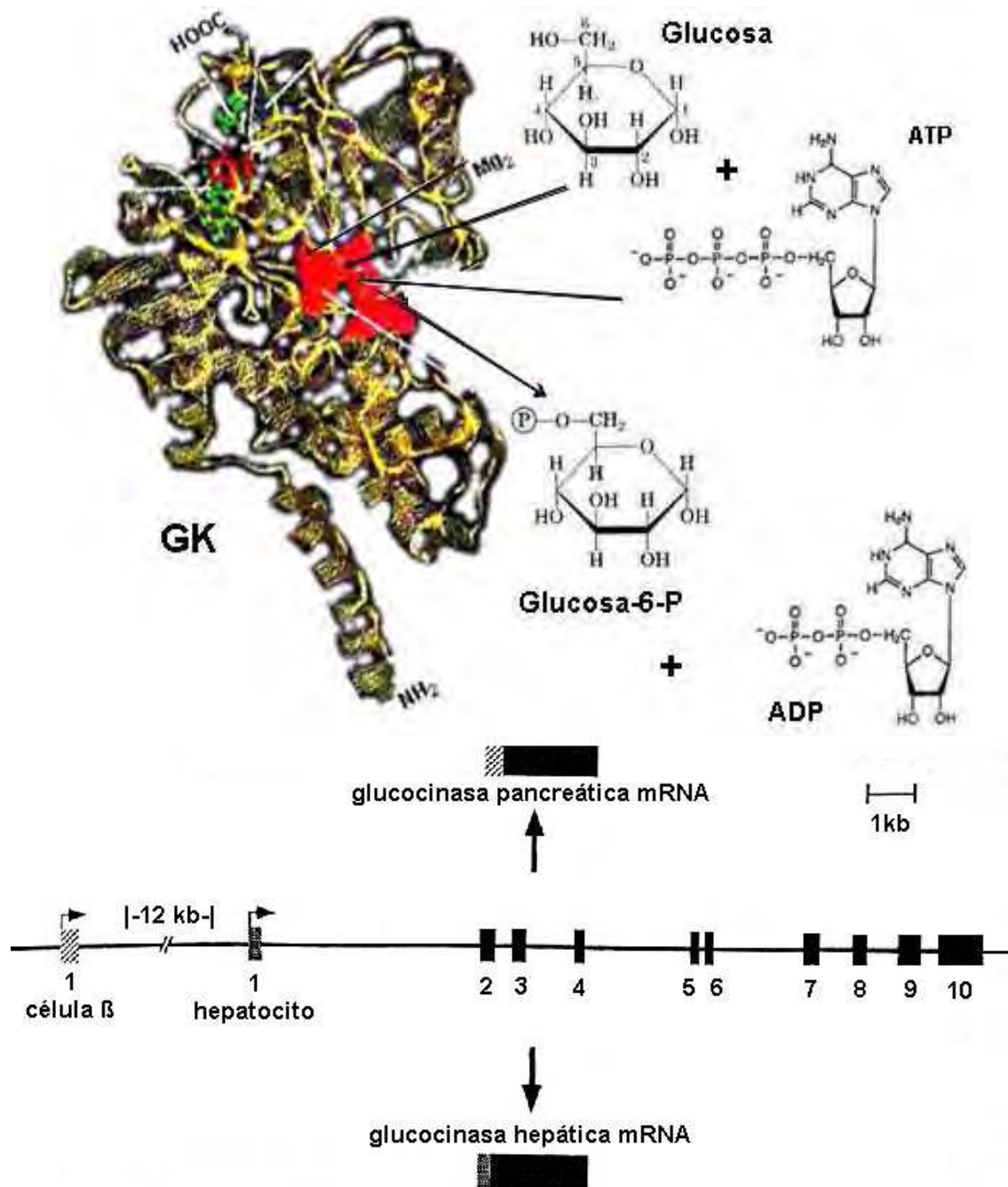
**Figura 4.** Papel de la glucocinasa pancreática como sensor de glucosa en la célula  $\beta$  pancreática.

### 1.6.1 Características bioquímicas y moleculares de la glucocinasa.

La glucocinasa o hexocinasa IV (ATP:D-hexosa 6-fosfotransferasa EC 2.7.1.1) es una enzima tejido específica presente en los hepatocitos, en las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos, en cerebro, y en células neuroendócrinas del intestino

(Matschinsky, 1996). Es una enzima monomérica de 50 kDa que se diferencia de otras hexocinasas por su baja afinidad a la glucosa ( $K_{0.5}$  glucosa 8 mM), por su actividad enzimática que presenta una cinética sigmoideal no cooperativa, con un coeficiente de Hill de 1.7, y un punto de inflexión en su curva a 4 mM, además de que no es inhibida por su producto glucosa-6-fosfato. En las células  $\beta$  pancreáticas representa el 0.005 % del total de proteína posible, y es regulada alostéricamente por la subunidad  $\beta$  de la propionil CoA carboxilasa (61 kDa) (Shiraishi, 2001).

Las isoenzimas de la glucocinasa se encuentran codificadas por un único gen. Éste presenta dos diferentes promotores separados entre sí por más de 12 kilobases (Magnuson, 1992; Glaser, 1998). El primer promotor determina la expresión de la glucocinasa en las células  $\beta$  pancreáticas y en neuronas, mientras que el segundo determina a la isoenzima hepática. Así mismo, cada promotor está asociado a un primer exón diferente para cada glucocinasa, dando como consecuencia una diferencia entre proteínas de 15 aminoácidos en el extremo amino terminal (Matschinsky, 1998). Estas diferencias implican que tanto la síntesis como la actividad de la glucocinasa se encuentra regulada de manera diferente en el hígado y en las células  $\beta$  pancreáticas (Figura 5).



Magnuson. Diabetes 1990. 39: 523

**Figura 5.** Representación estructural de la glucocinasa pancreática, indicado en rojo su sitio catalítico. El gen de la glucocinasa presenta dos promotores y dos primeros exones diferentes para cada isoenzima. Modificado de Magnuson, 1990.

### 1.6.2. Regulación de la expresión de la glucocinasa.



La expresión de la glucocinasa se encuentra regulada por diversas hormonas, nutrientes y fármacos que pueden modificar la expresión de la enzima (tabla 1). Se han encontrado diferencias entre la regulación de la isoenzima hepática y la pancreática; por ejemplo, mientras el glucagon, a través de la activación de la vía de señalización del AMPc, disminuye la expresión de la glucocinasa hepática (Iynedjian, 1989), en el páncreas endocrino este segundo mensajero tiene un efecto positivo sobre la transcripción y la actividad de la glucocinasa (Fernandez-Mejía, 2001). En la Tabla 1 se muestran los diferentes compuestos descritos que tienen efectos sobre la actividad y expresión de la glucocinasa; entre ellos se encuentra la vitamina biotina.

**Tabla 1.** Regulación de la expresión y actividad de la glucocinasa hepática y pancreática en mamíferos.

	HIGADO		CELULAS BETA	
	Efecto	Cita	Efecto	Cita
Insulina	↑ actividad ↑ síntesis mRNA	Ilyedjian, 1989.	↑ síntesis mRNA	Leibiger, 2001
Glucagon (cAMP)	↓ actividad ↓ síntesis mRNA	Ilyedjian, 1989.	↑ actividad ↑ niveles mRNA ↑ actividad del promotor	Fernandez- Mejía, 2001
Prolactina	Sin efecto descrito		↑ actividad ↑ niveles mRNA	Weinhaus, 2007
Obestatina	Sin efecto descrito		↑ niveles mRNA	Granata, 2008
Hormona Tiroidea	↑ actividad ↑ niveles mRNA	Narkewicz, 1990	Sin efecto en actividad ↓ niveles mRNA	Fernandez- Mejía, 1992
Glucocorticoides	↑ actividad ↑ niveles mRNA	Sibrowski, 1984	↑ actividad ↑ niveles mRNA	Fernandez- Mejía, 1992
Thiazolidinediona	↑ actividad ↑ niveles mRNA	Kim, 2004	↑ actividad ↑ niveles mRNA	Kim, 2002
IGF-1	Sin efecto descrito		↑ actividad ↑ niveles mRNA ↑ actividad del promotor	Yoshida, 2007
Diclorvos $\text{Cl}_2\text{CCHOPO}(\text{OCH}_3)_2$	↓ actividad ↑ niveles mRNA	Romero- Navarro, 2006	Sin efecto	Romero- Navarro, 2006
GLP-1	Sin efecto descrito		↑ niveles mRNA	Liu, 2004
Glibenclamida	↑ niveles mRNA	Tiedge, 1995	↑ niveles mRNA	Hinata, 1994
Metformina	↑ niveles mRNA	Fulgencio, 2001	Sin efecto descrito	
Taurina	Sin efecto descrito		↑ niveles mRNA	Carneiro, 2008
Ácidos fenólicos	↑ niveles mRNA	Valentová, 2007	Sin efecto descrito	
Flavonoides cítricos	↑ niveles mRNA	Jung, 2006	Sin efecto descrito	
Palmitato	↓ actividad del promotor	Swagell, 2007	Sin efecto descrito	
Leucina	Sin efecto descrito		↑ niveles mRNA	Yang, 2006
Fructosa	Sin efecto descrito		↑ actividad ↑ niveles mRNA	Maiztegui, 2009

Glucosa	Sin efecto descrito		↑ actividad ↑ síntesis mRNA	Leibiger, 2001
Acido retinoico	↑ actividad ↑ niveles mRNA	Decaux, 1997	↑ actividad ↑ niveles mRNA	Cabrera- Vallades, 2001
Biotina	↑ actividad ↑ niveles mRNA	Chauhan, 1991	↑ actividad ↑ niveles mRNA ↑ actividad del promotor	Romero- Navarro, 1999

### 1.6.3 Efecto de la biotina sobre la actividad y expresión de la glucocinasa.

Las primeras observaciones del efecto de la biotina sobre la actividad y expresión de la glucocinasa fueron realizadas por Dakshinamurti (1968), quien encontró que la administración de biotina a dosis de 1 mg/kg de peso, en ratas bajo condiciones de ayuno, aumenta la actividad de la glucocinasa en el hígado. Posteriormente, Spence y Kouldeka (1984), encontraron que la administración de 1  $\mu$ M de biotina en hepatocitos aislados incrementa la actividad de la glucocinasa a partir de las 2 horas de exposición; este efecto es precedido por un aumento en los niveles de GMPc. Los estudios de Chauhan y Dakshinamurti (1991) demostraron que el efecto de la biotina se realiza a través del incremento en la transcripción del gen de la glucocinasa, el cuál se observó entre los 45 y 60 minutos después de la administración de la vitamina.

La actividad y expresión de la glucocinasa pancreática también son afectadas por la biotina. En la línea celular RIN-1048 se observó que la biotina a concentraciones de 10  $\mu$ M aumenta la actividad y de los niveles de mRNA de la glucocinasa, a partir de las 24 horas de tratamiento (Borboni, 1996). Nosotros encontramos que en ratas deficientes de biotina la actividad y expresión de la glucocinasa pancreática disminuye en ratas deficientes de la vitamina (Romero-Navarro, 1999). También reportamos que en islotes de Langerhans tratados *in vitro* con biotina, la actividad de la glucocinasa se incrementa. Este efecto se observó a partir de dosis de 10 nM, concentración considerada fisiológica (Zempleni, 2005), así como a 100 y 1000 nM. El tiempo en el cual se observa el efecto de la biotina sobre la actividad de la glucocinasa pancreática es a partir

de las 24 horas, precedido por cambios en la abundancia del mRNA, los cuales se observan incrementados desde las 12 horas de tratamiento.

#### **1.6.4 El papel de la insulina como modulador autocrino de expresión genética en el islote.**

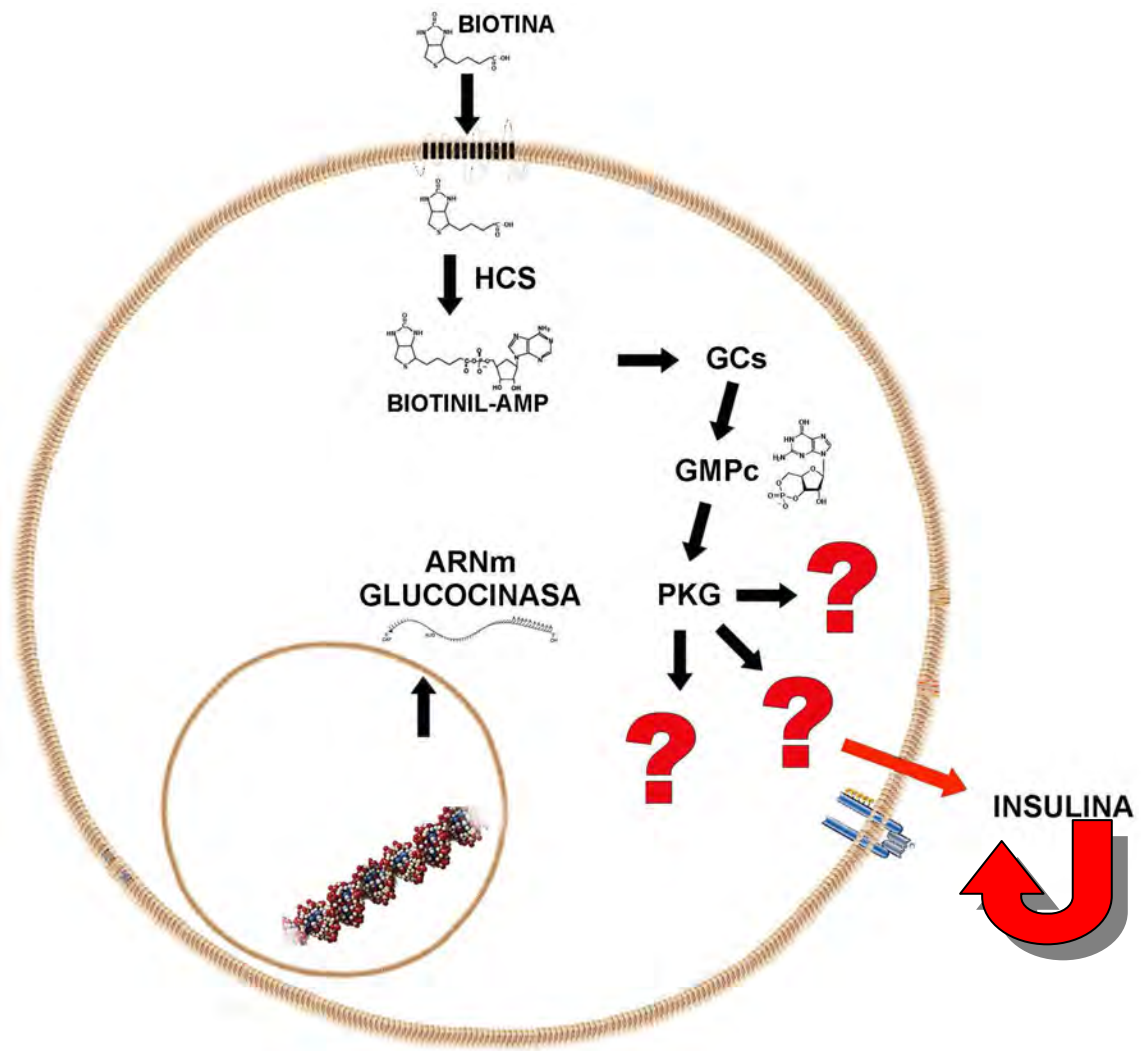
La acción anabólica de la insulina conduce a cambios en la expresión genética de diferentes enzimas que se requieren para modular el metabolismo celular. Cada vez son más los reportes que señalan las funciones que modula la acción autocrina de la insulina sobre las células del islote pancreático (Leibiger, 2002). Entre estos efectos se encuentra la regulación de la expresión genética de varias proteínas, entre ellas, la glucocinasa, a través de la activación del receptor B para la insulina (Leibiger, 2001). Dado que previamente demostramos que la biotina puede aumentar la secreción de insulina *in Vitro* (Romero-Navarro, 1999), es posible que este efecto y la expresión de la glucocinasa se encuentren asociados.

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

Si bien el efecto de la vitamina sobre la expresión de genes se encuentra ampliamente demostrado se sabe poco de los mecanismos moleculares mediante los cuales se produce su acción. Se han descrito dos diferentes mecanismos: a) la biotinilación de histonas y b) la cascada de señalización del GMPc/PKG. El mecanismo más aceptado actualmente es el de la activación de la vía de señalización de GMPc/PKG, sin embargo se desconocen los mecanismos de acción de la biotina sobre la expresión de genes subsiguientes a la activación de la PKG. Entre la multiplicidad de mecanismos posibles, teorizamos que el mecanismo de acción de la biotina podría estar ligado a la secreción de la insulina; dado que nosotros y otros grupos hemos encontrado que tanto la biotina (Romero-Narvarro, 1999; Sone, 2000) como el GMPc (Laychock, 1987; 1991) inducen a la secreción de esta hormona. Por otro lado, se sabe que la acción autocrina de la insulina es un importante regulador en la expresión de algunos genes importantes en la fisiología del islote, entre ellos, la glucocinasa (Leibiger, 2001). En el presente trabajo exploramos el mecanismo por el cuál la biotina aumenta la expresión de la glucocinasa pancreática.

### **2.1. HIPOTESIS**

La biotina modifica la glucocinasa pancreática mediante un mecanismo en el que participa la secreción de la insulina y su efecto autocrino (figura 6).



**Figura 6.** Hipótesis del mecanismo de acción de la biotina para inducir un aumento en la expresión de la glucocinasa pancreática.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GENERAL.**

Estudiar de los mecanismos moleculares a través de los cuales la biotina aumenta la expresión del gen de la glucocinasa pancreática.

#### **3.2. OBJETIVOS PARTICULARES.**

A) Determinar si el efecto de la biotina sobre la expresión de la glucocinasa pancreática se realiza a través de la vía de señalización del GMPc, mediado por la actividad de la guanilato ciclasa soluble y la PKG.

B) Determinar si el efecto de la biotina sobre los niveles de mRNA de la glucocinasa requiere de la secreción de insulina y de su vía de señalización.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1. Aislamiento de islotes pancreáticos de Langerhans.

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 200-300 g de peso, mantenidas bajo condiciones controladas de bioterio. Después de un periodo de ayuno de 12 hrs, las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (90 mg/kg). Para facilitar la escisión del páncreas de los tejidos que lo circundan se inyectó solución de Hanks-BSA a través del conducto biliar. Una vez separado el páncreas, se fragmentó con tijeras y se procedió a su digestión con colagenasa tipo P (Boehringer Mannheim), durante 10 min, a 37° C, en un baño con agitación. Los islotes se separaron del tejido acinar a través de una centrifugación en gradiente de Ficoll (Sigma). Finalmente se recolectaron los islotes bajo microscopio de disección y se sembraron en grupos de 200 islotes en cajas de cultivo con medio de cultivo DMEM (Gibco) sin biotina, conteniendo 5.5 mM de glucosa, suplementado con antibiótico-antimicótico (200 U/ml penicilina G, 200 mg/ml estreptomycin y 0.5 mg/ml amfotericina B) y 5% de suero de bovino fetal dializado. Los islotes se mantuvieron en incubación por 16 horas a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sup>2</sup>.

### 4.2. Tratamientos e inhibidores.

Al finalizar las 16 horas de incubación el medio de cultivo fue reemplazado y se añadieron los diferentes tratamientos: a) vehículo de solución amortiguadora de fosfatos (PBS), b) 1 μM de d-biotina (Gibco) disuelta en PBS; c) 1 μM de 8-Br-GMPc (Sigma), un análogo del GMPc permeable a la membrana, disuelto en PBS. Los islotes se trataron durante 1, 2, 3 y 24 horas para evaluar el tiempo de acción de la vitamina. Para determinar la participación de diferentes proteínas involucradas en vías de señalización se emplearon: como inhibidor de la guanilato ciclasa soluble: 1-H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-α]quinoxalin-1one (ODQ) (ICN) [50μM]; En la inhibición de la PKG: Rp-8[4-clorophenylthio]-guanosine-3'5'-cyclic monophosphorothioate (Rp-cGMPS) (Sigma) [10μM]; Para evaluar la participación de la secreción de la insulina



se utilizaron los siguientes inhibidores: diazóxido (Sigma) [250  $\mu$ M], el cual mantiene abiertos los canales de potasio sensibles a ATP, impidiendo la despolarización de la membrana; nifedipina (Sigma) [10 $\mu$ M], un bloqueador selectivo de los canales membranales de calcio activados por voltaje; y suero con anticuerpos anti-insulina [dilución 1:1000] (proporcionado por el Dr. Eulises Díaz del Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán, obtenido en conejo). En la determinación de la vía de señalización de la insulina se emplearon: wortmanina (Fluka) [100nM] como inhibidor específico de la fosfoinositol-3-cinasa (PI3K) y 1-L-6-hydroxymethyl-chiro-inositol-2-[(R)-2-O-methyl-3-O-octadecyl-carbonate] (Alexis Biochemicals) [10 $\mu$ M] como inhibidor de Akt o PKB. Los compuestos se agregaron al medio de cultivo 30 minutos antes de iniciar el tratamiento con vehículo, d-biotina u 8-Br-GMPc, a excepción del bloqueador nifedipina que se adicionó únicamente durante 15 minutos.

#### **4.3. Expresión de la glucocinasa pancreática por RT-PCR en tiempo real.**

El RNA total de los islotes se aisló por el método de TRIzol, usado bajo las especificaciones del fabricante (Gibco Life Technologies). La muestra de islotes se expuso a una mezcla de isothiocianato de guanidina y fenol, la cual permite la separación de ácidos nucleicos con cloroformo. El RNA se precipitó con isopropanol y etanol al 70%, y finalmente se resuspendió en agua estéril, tratada previamente con DEPC. La cantidad de RNA total se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm; al mismo tiempo se verificó que su relación con el contenido de DNA, determinado a 280 nm, fuera cercana a 2. La integridad del RNA de cada muestra se verificó a través de electroforesis en geles desnaturalizantes de agarosa al 1.5%.

Debido a la fácil degradación y poca estabilidad del RNA, se sintetizó una copia de éste en DNA de cadena sencilla (cDNA) a partir de 0.5  $\mu$ g de RNA total por medio de la reacción de transcripción reversa, empleando el protocolo establecido para 200 U de la enzima reverso transcriptasa del virus de leucemia murina (MLV-RT) (InVitroGen).

La expresión relativa de glucocinasa se evaluó por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, utilizando los materiales y métodos proporcionados por Applied Biosystems. La enzima DNA polimerasa de *Thermophilus aquaticus* crea varias copias del cDNA al identificar la doble cadena formada con una sonda de oligonucleótidos específica para una secuencia determinada de mensajero. Al sintetizarse cada copia, se libera un fluoróforo, el cual es detectado por el sistema de lectura del termociclador, acoplado a una computadora. El cambio en la fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de copias de DNS. 20 ng de cDNA se mezclaron con la mezcla TaqMan® universal PCR y con las sondas TaqMan® MGB marcadas con los fluoróforos FAM o VIC, en un volumen total de 25 µl. Las secuencias que se emplearon de las sondas de glucocinasa de *Ratus norvegicus* fueron:

sentido 5' – GACAAGGGCATCCTCCTCAATTGGA - 3'

antisentido 5' – CTAGACAAGGGCATCCTCCTCAATT- 3'

Se determinó la expresión del RNA ribosomal (rRNA) 18S como gen de referencia endógena. La reacción de PCR de cada gen se realizó por triplicado para cada muestra en un instrumento ABI PRISM 7700, operado bajo las especificaciones del fabricante.

A partir de las gráficas de duplicación de DNA se obtuvo el valor de ciclo umbral (Ct) para cada gen, es decir, el ciclo de la reacción de PCR en donde todas las muestras alcanzaron una cantidad determinada de DNA dentro de una función lineal, sin limitaciones de sustrato ni saturación de la enzima. En este punto se debe cumplir con la función:

$$P=T*2^n$$

donde la cantidad de producto P es igual a la cantidad de templado T que se duplica a cada ciclo n.

Para calcular la abundancia relativa de la glucocinasa con respecto a la expresión endógena del ARNr 18S, se empleó el modelo matemático delta-delta Ct ( $\Delta\Delta Ct$ , Livak, 2001): la expresión relativa de glucocinasa (gk) se calculó de la diferencia resultante entre las Ct's de gk y el rRNA 18S (18S), entre los islotes controles y los tratados.

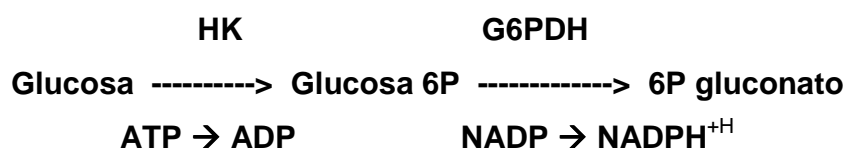
$$\text{Expresión relativa} = \frac{\Delta CT_{\text{tratamiento}} [Ct(gk)-Ct(18S)]}{\Delta CT_{\text{control}} [Ct(gk)-Ct(18S)]}$$

Las curvas de calibración se construyeron previamente a partir de 0.1 a 10 ng de cDNA, proveniente de islotes de rata sin tratamiento.

#### 4.4. Determinación de ATP intracelular.

Islotes pancreáticos de ratas adultas se aislaron y cultivaron en las condiciones anteriormente mencionadas. Después de 16 horas de incubación, los islotes se preincubaron por 10 minutos en PBS sin glucosa, prosiguiendo con una incubación de 30 minutos en medio DMEM con concentraciones de 5.5 o 15.5 mM de glucosa, con o sin la presencia de d-biotina o 8-Br-GMPc por 30 minutos. Al finalizar el tiempo de tratamiento los islotes se recolectaron en ácido perclórico al 3% (v/v) y fueron sonicados y centrifugados a 12000 rpm. El sobrenadante se neutralizó en frío con KOH 3 M / TRIS 0.1 M.

El principio de la determinación de ATP intracelular se basa en el acoplamiento de dos reacciones, en donde la hexocinasa (HK) utiliza el ATP de la muestra como sustrato para formar glucosa-6-fosfato. Este producto es a su vez transformado por la glucosa-6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH) en 6-P-gluconato, con la formación de  $NADPH^{+H}$ , el cual directamente proporcional a la cantidad de ATP:



Las muestras fueron colocadas en 2 ml de amortiguador de HEPES 50 mM, pH 7.4, conteniendo una concentración final de 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM de glucosa, y 1 U/mL de G6PDH de *Leuconostoc mesenteroides* (Sigma). La reacción se inició añadiendo 1 U de HK (Roche) a 30°C. El contenido de ATP se determinó por el cambio fluorométrico de NADPH<sup>H</sup>, con una longitud de onda de excitación de 355 nm, y una longitud de onda de emisión de 460 nm, en un fluorofotometro Shimadzu RF5000 U (Kioto, Japan) (Bergmayer, 1983; Marín-Hernandez, 2006).

#### **4.5. Determinación de insulina.**

Después de un periodo de incubación de 16 horas, grupos de 50 islotes fueron lavados en la siguiente solución de secreción: 20 mM HEPES, 115 mM NaCl, 5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 4.7 mM KCL, 2.6 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, y 1% de BSA (pH 7.4). Los islotes fueron incubados a 37°C durante una hora en medio DMEM con 5.5 mM de glucosa, al cual se le adicionó el vehículo (PBS), 1 µM de d-biotin, 1 µM de 8-Br-GMPc o 16 mM de glucosa. A partir de una alícuota del medio se determinó la concentración de insulina secretada empleando el inmunoensayo ultrasensible para insulina de rata de ALPCO (ELISA;ALPCO Diagnostics, Salem, NH).

#### **4.6. Determinación de la actividad específica de la glucocinasa.**

Se empleó la técnica descrita por Parry y Walker (1966) y modificada por Romero-Navarro y cols (1999). Después de los tratamientos con d-biotina o 8-Br-GMPc, los islotes fueron sonicados en un buffer de lisis para obtener los extractos crudos celulares. La actividad de las enzimas fosforilantes de la glucosa presentes en los extractos se determinó al agregar glucosa, ATP y Mg<sup>2+</sup> al medio de reacción. Dado que los extractos celulares también poseen actividad fosforilante de la glucosa por la presencia de hexocinasa (HK) (de baja Km), la actividad de fosforilación se determinó a dos diferentes concentraciones finales de glucosa: 0.5 y 100 mM. La formación del primer producto (glucosa 6-fosfato) es proporcional a la actividad de

la HK y la glucocinasa presente en el extracto. La cantidad del producto formado se determinó por su deshidrogenación en presencia de un exceso de la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) de *Leuconostoc mesenteroides* (Sigma) y NAD como coenzima. La formación de NADH<sup>+</sup> se cuantificó a través de cambios en la absorbancia a 340 nm, siendo esta proporcional a la cantidad de glucosa 6-fosfato proveniente de la primera reacción. El cambio en la densidad óptica obtenido en la reacción con glucosa a una concentración de 0.5 mM representa la actividad de la HK, y el obtenido en la reacción con glucosa con la concentración final de 100 mM es el resultado de la suma de ambas actividades: HK más glucocinasa. El valor correspondiente a la actividad la glucocinasa se obtiene de la diferencia del valor obtenido a baja glucosa y del valor a alta glucosa. La actividad enzimática se estandarizó en función de la cantidad de proteína determinada por el método colorimétrico de Bradford (Bio-Rad). El principio de este método se basa en la determinación de la cantidad de proteína por unión del colorante ácido azul de Coomassie, específicamente, a residuos de aminoácidos básicos y aromáticos.

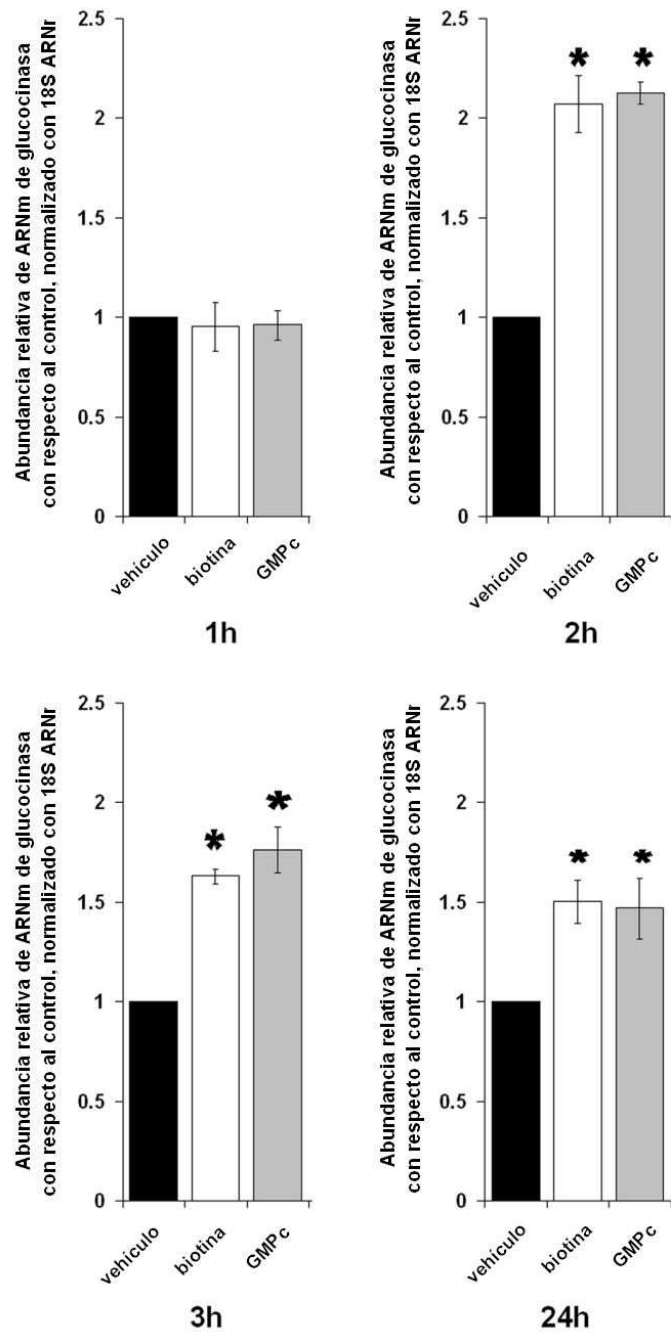
#### **4.8. Análisis estadístico.**

Los datos se analizaron en los programas PRISM 2.01 (Graph Pad, Ca, USA) y Statview statistical V.4.5 (Abacus Concepts). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error estándar (ES) del número de experimentos indicados en el texto. Las comparaciones entre los datos fueron evaluadas a través de un análisis de varianza ANOVA de una o de dos vías con interacciones. Se utilizó el análisis *post-hoc* de Bonferroni para la detección de diferencias significativas entre medias. Se consideró como diferente la significancia de  $p < 0.05$ .

## 5. RESULTADOS

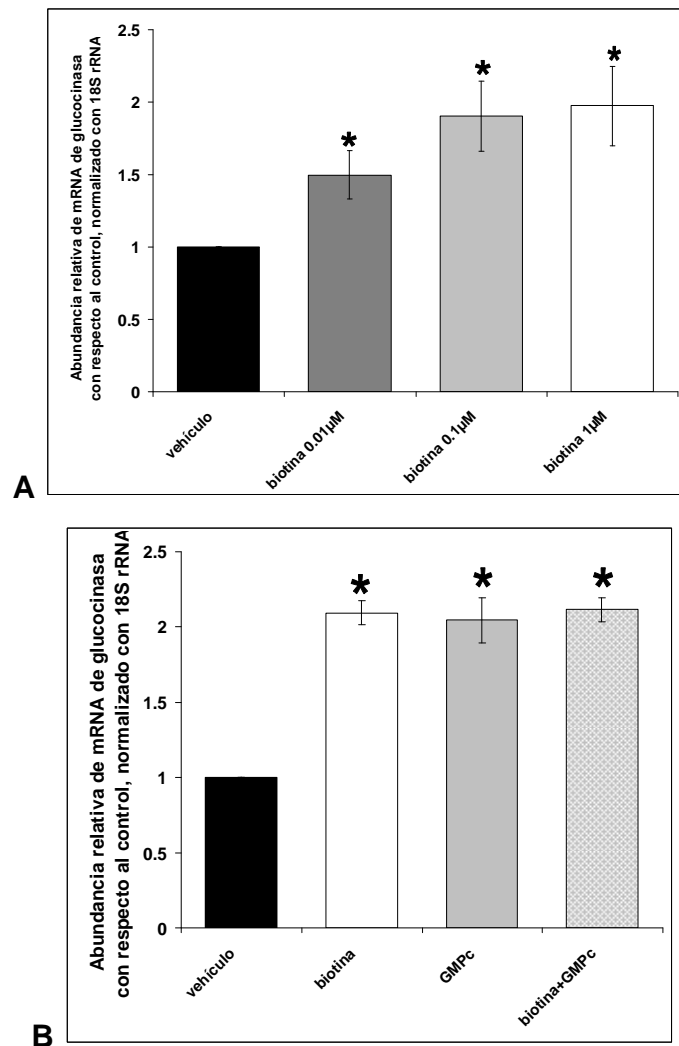
### 5.1. Incremento de la abundancia del mRNA de la glucocinasa pancreática con biotina y el GMPc.

El primer paso de la investigación consistió en evaluar si el mecanismo de acción de la biotina sobre la expresión de la glucocinasa pancreática utiliza la vía de señalización de la guanilato ciclasa. Comparamos a diferentes tiempos el efecto de la biotina y del GMP cíclico sobre la abundancia del mRNA de la glucocinasa. Encontramos que la biotina y el GMPc inducen incrementos similares en tiempo y magnitud sobre el mensajero de la enzima. Como se muestra en la figura 7 la biotina (barras blancas) incrementó el mRNA de la glucocinasa  $1.07 \pm 0.14$  veces a las 2 horas, en comparación con el vehículo (barras negras).  $p < 0.05$ ). A las 3 horas, el incremento fue de  $0.63 \pm 0.04$  veces y se sostuvo hasta las 24 horas ( $p < 0.05$ ). El análogo permeable del GMPc (barras grises) indujo incrementos sobre la abundancia del mRNA de la glucocinasa, similares a la biotina en tiempo y magnitud  $1.12 \pm 0.05$ ,  $0.76 \pm 0.11$ , y  $0.46 \pm 0.15$ , a las 2, 3 y 24 horas, respectivamente ( $p < 0.05$ ).



**Figura 7.** Efecto curso-temporal de la biotina o del GMPc en la abundancia del ARNm de la glucocinasa. Islotes pancreáticos de rata se trataron durante diferentes tiempos en presencia de vehículo (control), d-biotina [ $1 \mu\text{M}$ ] o con 8-Br-GMPc [ $1 \mu\text{M}$ ]. La abundancia del mRNA de la glucocinasa se cuantificó por RT-PCR en tiempo real. Los datos se expresan en veces de incrementos relativos con respecto a los islotes control. Cada valor representa la media  $\pm$  ES de 3 experimentos independientes. Barras negras: vehículo (PBS); barras blancas: biotina; barras grises: GMPc. Las comparaciones fueron evaluadas por ANOVA de dos vías (tratamiento, tiempo). Diferentes letras denotan diferencias significativas,  $p \leq 0.05$ .

Una vez determinado el tiempo en el que se observaron los mayores cambios, a las dos horas, analizamos el efecto de diferentes concentraciones de biotina sobre la expresión de la glucocinasa. Observamos que la biotina incrementó significativamente la abundancia en el mRNA de la glucocinasa pancreática, tanto a concentraciones consideradas fisiológicas de 0.01  $\mu\text{M}$ , como a dosis farmacológicas igual o mayores a 0.1  $\mu\text{M}$  (figura 8A). No se observó un efecto aditivo al agregar ambos compuestos a los islotes al mismo tiempo (figura 8B), lo que nos indica que la biotina y el GMPc utilizan la misma vía de señalización para realizar su efecto.



**Figura 8.** Efecto dosis-respuesta de la biotina en la abundancia del ARNm de la glucocinasa. Islotes pancreáticos de rata se trataron con d- biotina (A) a concentraciones fisiológicas y farmacológicas (0.01, 0.1 y 1  $\mu\text{M}$ ), y con 8-Br-GMPc simultáneamente (1  $\mu\text{M}$ , panel B). El mRNA de la glucocinasa se cuantificó por RT-PCR en tiempo real. Los datos se expresan en veces de incrementos relativos con respecto a los islotes control. Barras negras: vehículo (PBS). Cada valor representa la media  $\pm$  ES de 4 experimentos independientes. Las comparaciones fueron evaluadas por ANOVA de una vía. \* denota diferencias significativas,  $p \leq 0.05$ .



## 5.2. La vía de señalización del GMPc participa en el efecto de la biotina sobre la expresión de la glucocinasa pancreática.

Con el empleo de inhibidores específicos de la actividad de la guanilato ciclasa soluble y de la PKG, demostramos que la vía de señalización del GMPc es necesaria en el mecanismo de acción de la biotina. Como se muestra en la tabla 2, el bloqueo de la actividad de la guanilato ciclasa suprimió el efecto de la biotina sobre el mRNA de la glucocinasa, mientras que la inducción producida por el GMPc se mantuvo. En presencia del inhibidor de la PKG, no se incrementó la abundancia del mRNA de la glucocinasa ni con la biotina ni con el nucleótido cíclico (Tabla 2). Estos datos señalan que el mecanismo de acción de la biotina sobre la expresión de la glucocinasa en los islotes pancreáticos requiere de la cascada de fosforilación en la que participan la guanilato ciclasa y la PKG.

<b>Tabla 2.</b> Participación de la guanilato ciclasa soluble y la proteína cinasa G en el efecto de la biotina y el GMPc en la abundancia de ARNm de glucocinasa.			
	Sin inhibidores	Inhibidor de la guanilato ciclasa soluble: ODQ [50 $\mu$ M]	Inhibidor de la PKG: Rp-cGMPS [10 $\mu$ M]
Vehículo	1 $\pm$ 0.16	1.12 $\pm$ 0.12	1.01 $\pm$ 0.15
Biotina [1 $\mu$ M]	2.25 $\pm$ 0.12 *	1.16 $\pm$ 0.24	0.91 $\pm$ 0.26
GMPc [1 $\mu$ M]	2.06 $\pm$ 0.28 *	2.27 $\pm$ 0.16 *	0.97 $\pm$ 0.13

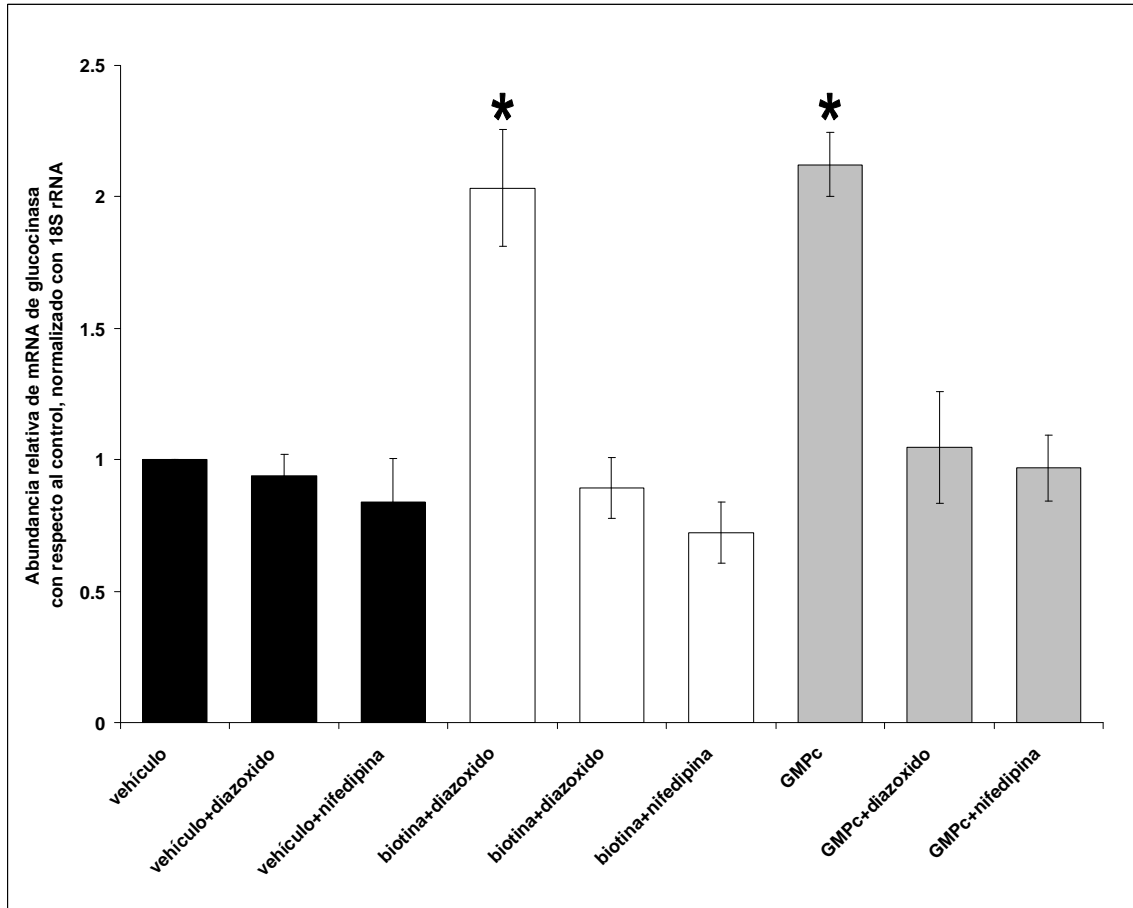
Islotes pancreáticos de rata se trataron con el vehículo (PBS), con ODQ [50  $\mu$ M] o con Rp-cGMPS [10  $\mu$ M] durante 30 minutos antes de agregar a los cultivos, vehículo, biotina [1  $\mu$ M] o 8-Br-GMPc [1  $\mu$ M]. El mRNA de la glucocinasa se cuantificó por RT-PCR en tiempo real. Los datos se expresan en veces de incrementos relativos con respecto a los islotes control. Cada valor representa la media  $\pm$  ES de 4 experimentos independientes. \* denota diferencia significativa a  $p < 0.05$  con respecto al control.

### **5.3. El efecto de la biotina sobre la expresión de la glucocinasa pancreática requiere de la secreción de insulina.**

No se conocen los mecanismos de acción que emplea la biotina para modificar la transcripción de genes, posteriores a la activación de la PKG. Entre la multiplicidad de acciones posibles, especulamos que el mecanismo podría estar ligado a la secreción de la insulina, con base en a) datos obtenidos por nosotros y otros grupos que han encontrado que tanto la biotina (Romero-Narvarro, 1999; Sone, 2000) como el GMPc (Laychock, 1987; 1991) inducen a la secreción de esta hormona. b) reportes sobre la acción autocrina de la insulina como importante regulador en la expresión de genes en el islote (Leibiger 2001; Uhles, 2007; Aikin, 2006).

Para comprobar esta hipótesis determinamos el requerimiento de la secreción de la insulina en el mecanismo de acción de la biotina sobre la glucocinasa. Como se observa en la Figura 9, la inhibición de la secreción de la hormona con diazóxido, un compuesto que mantiene abiertos los canales de potasio dependientes de ATP, o con nifedipina, un bloqueador de los canales de calcio tipo-L activados por voltaje, previene el efecto de la biotina sobre la abundancia del mRNA de la glucocinasa. De igual manera la inhibición de la secreción de la insulina impidió el efecto estimulante del 8-Br GMPc sobre la expresión de la glucocinasa.

Como se esperaba, encontramos que los islotes tratados durante una hora con biotina o con GMPc incrementaron significativamente ( $P < 0.01$ ) la concentración de insulina en el medio de cultivo (control:  $0.64 \pm 0.11$  nmol/L; biotina:  $1.60 \pm 0.57$  nmol/L; 8-Br GMPc:  $1.58 \pm 0.60$  nmol/L;  $n=3$ ).

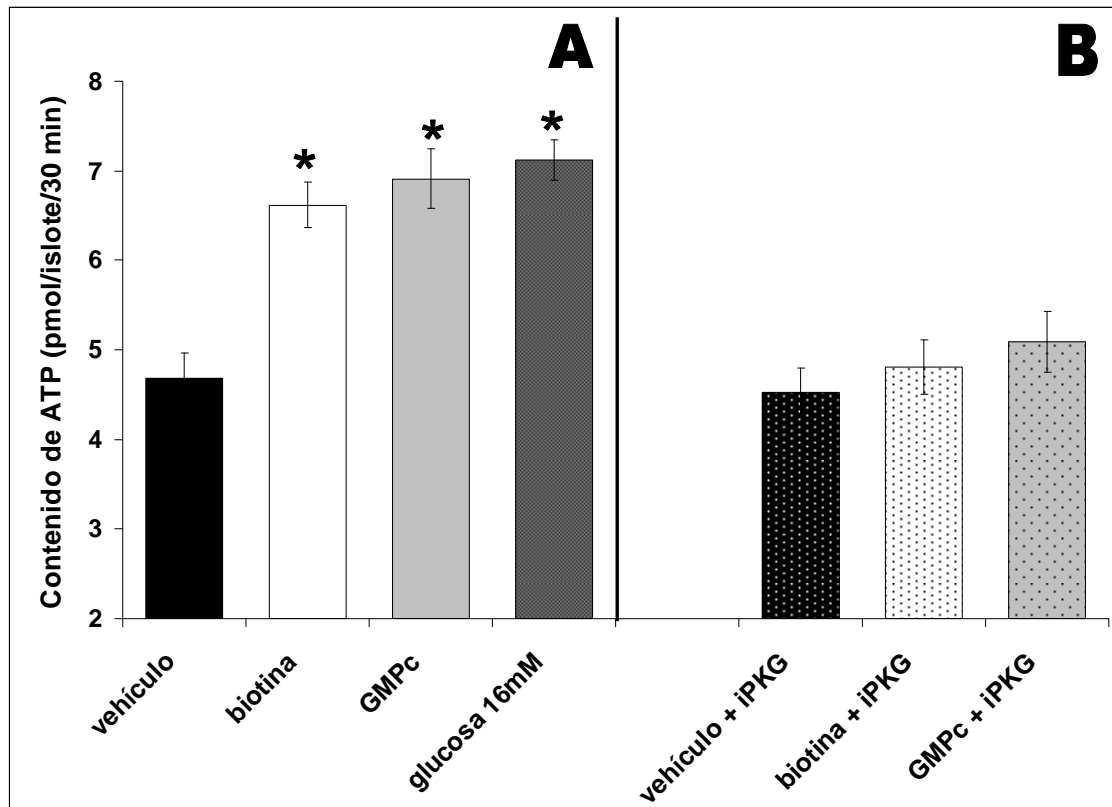


**Figura 9.** Efecto de la inhibición de la secreción de insulina a nivel de canales iónicos, en la abundancia del mRNA de la glucocinasa inducida por biotina o por GMP cíclico. Los islotes se trataron con el vehículo (PBS), diazóxido [250  $\mu$ M] durante 30 minutos o nifedipina 10 $\mu$ M antes de agregar a los cultivos, vehículo, biotina [1  $\mu$ M] o 8-bromo GMP cíclico [1  $\mu$ M]. El mRNA de la glucocinasa se cuantificó por RT-PCR en tiempo real. Los datos se expresan en veces de incrementos relativos con respecto a los islotes control. Cada valor representa la media  $\pm$  ES de 4 experimentos independientes. Las comparaciones fueron evaluadas por ANOVA de una vía. Los símbolos \* denotan diferencias significativas,  $p \leq 0.05$ .

#### **5.4. La biotina modifica el contenido de ATP en los islotes vía PKG.**

Dado que el incremento de ATP intracelular es esencial en la inducción de la secreción de insulina analizamos el efecto de la vitamina sobre las concentraciones de este nucleótido (Figura 10, panel A). A los 30 minutos de incubación, la biotina aumentó significativamente ( $p < 0.05$ ) el contenido del nucleótido ( $6.62 \pm 0.26$  pmol/islote/30min) con respecto al control ( $4.68 \pm 0.28$  pmol/islote/30min) (Figura 10A). Los islotes tratados con el análogo del GMPc también incrementaron el contenido de ATP ( $6.91 \pm 0.33$  pmol/islote/30min). Los aumentos producidos por la biotina y el GMPc fueron similares a los generados por la glucosa (15mM) ( $7.12 \pm 0.22$  pmol/islote/30min), pero no resultaron ser sinérgicos (datos no mostrados).

También investigamos el vínculo entre la vía de señalización de GMPc/PKG y el aumento en el contenido de ATP. Como se muestra en el panel B de la figura 10, la inhibición de la actividad de la PKG con Rp-cGMPS [10  $\mu$ M] evita que los niveles de ATP intracelular se incrementen en respuesta a la vitamina o al GMPc.



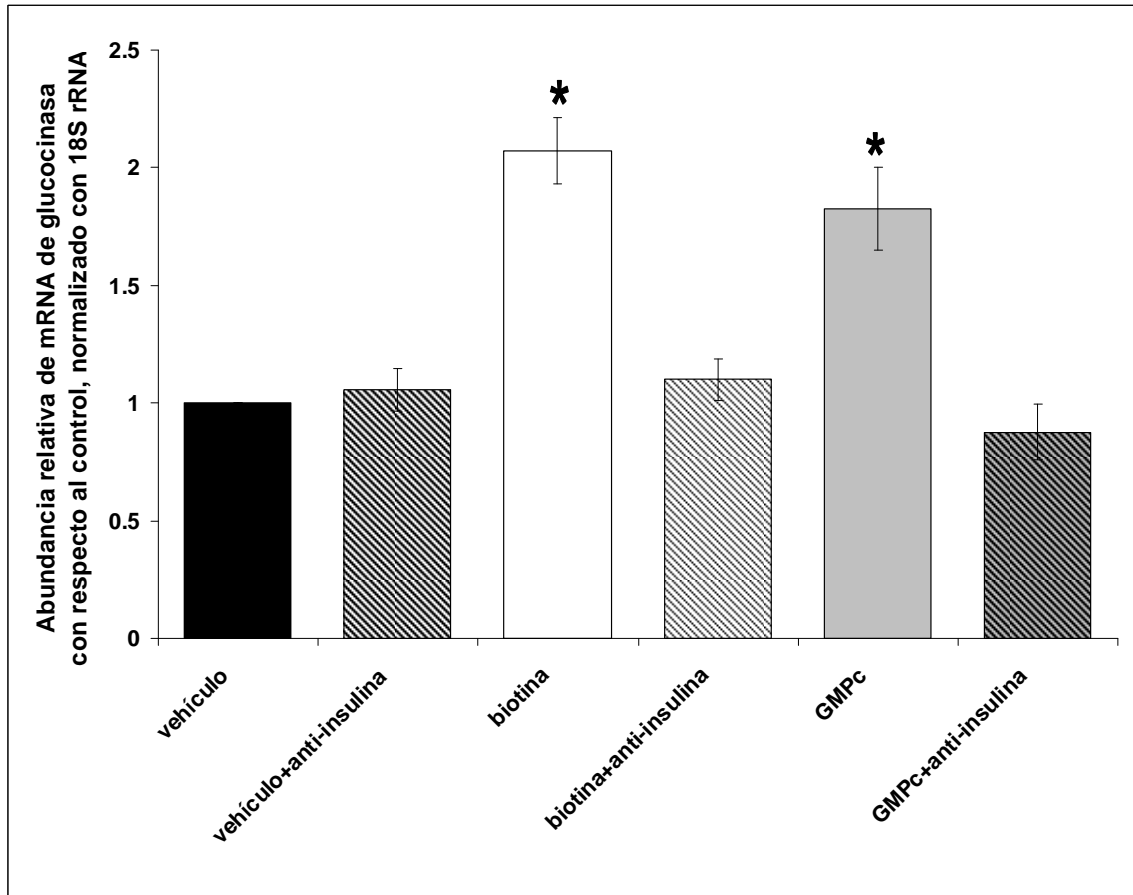
**Figura 10.** Efecto de la biotina o del GMPc sobre el contenido de ATP en islotes. Islotes pancreáticos de rata se trataron con el vehículo (PBS), con biotina [1  $\mu$ M] o con 8-Br-GMPc [1  $\mu$ M], en ausencia (panel A) o presencia (panel B) del inhibidor de la PKG (Rp-cGMPS [10  $\mu$ M]). Como control, un grupo de islotes se trató con 15mM de glucosa. Después de treinta minutos se determinó el contenido de ATP por fluorimetría. Cada valor representa la media  $\pm$  ES de 4 experimentos independientes. Barra negra: vehículo (PBS); barra blanca: biotina; barra gris claro: GMPc; barra gris oscuro: glucosa. Las comparaciones fueron evaluadas por ANOVA de dos vías. \* denota diferencias significativas,  $p \leq 0.05$ .

## **5.5 La biotina afecta la expresión de la glucocinasa pancreática a través de la acción autocrina de la insulina.**

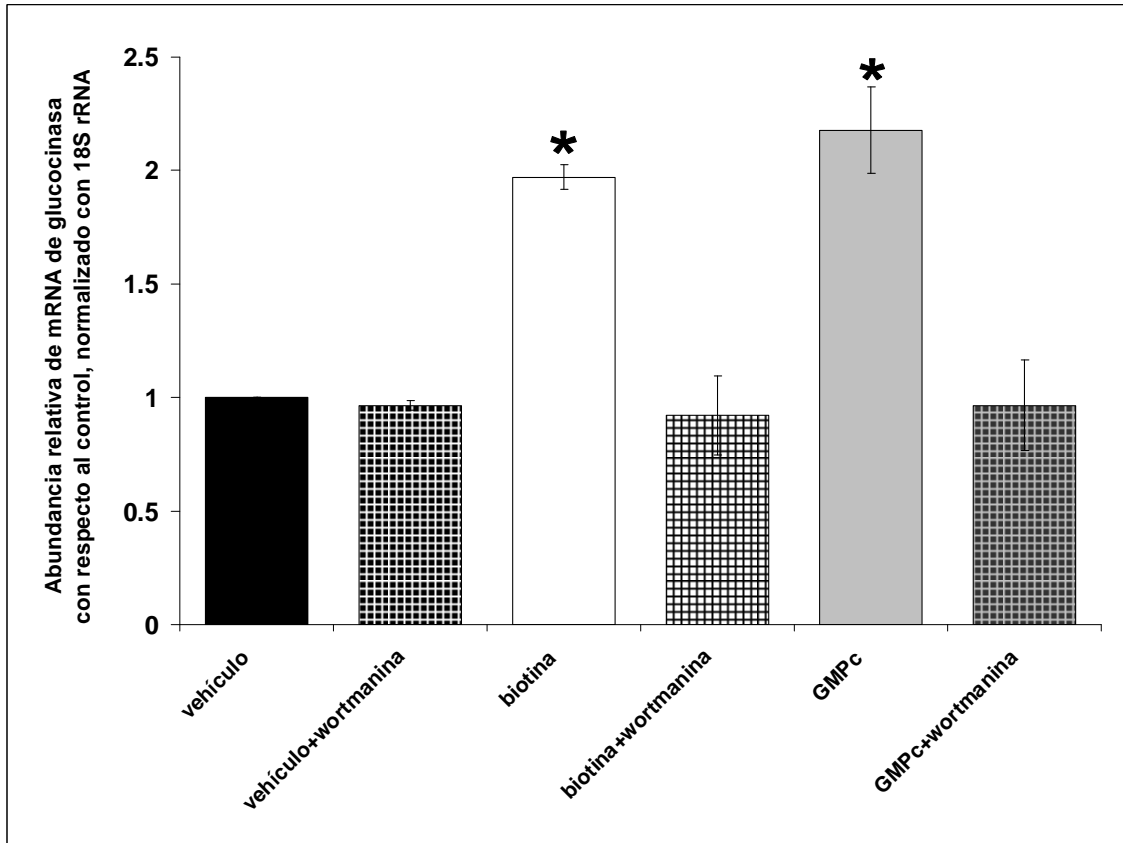
Para evaluar la participación autocrina de la insulina en el aumento de la expresión de la glucocinasa, neutralizamos a la hormona presente en el medio con anticuerpos anti-insulina. Como se muestra en la Figura 11, los efectos de la biotina y del GMP cíclico sobre la abundancia de mRNA de la glucocinasa no se produjeron con la neutralización de la insulina.

La interacción autocrina de la insulina con su receptor en la célula  $\beta$  pancreática activa cascadas de señalización que juegan un papel importante en la expresión de genes del islote pancreático (Leibiger, 2002; Navarro-Tableros, 2004; Aikin, 2006; Horrens, 1996). Profundizamos nuestro estudio investigando cuál de las vías de señalización de la insulina interviene en el efecto de la biotina. Los islotes cultivados en presencia de 100 nM de wortmanina, un inhibidor específico de la fosfoinositol-3-cinasa (PI3K), enzima de una de las vías de transducción de la señal de la insulina, no presentaron aumentos en el mRNA de la glucocinasa en respuesta a biotina o al GMPc (Figura 12).

También evaluamos la participación de la proteína serin-treonin cinasa Akt (también conocida como PKB), una importante mediadora de la acción metabólica de la insulina activada por la PI3K. Como se observa en la Figura 13, los islotes tratados con biotina o con 8-Br-GMPc incrementaron al doble la abundancia del mRNA de la glucocinasa con respecto a control. Sin embargo, en presencia del inhibidor específico de la Akt/PKB no se produjo el efecto de la biotina sobre la abundancia del ARNm de la glucocinasa; resultados similares se observaron con el tratamiento de GMP cíclico, indicando que tanto la vitamina como el nucleótido participan en la misma vía de señalización.

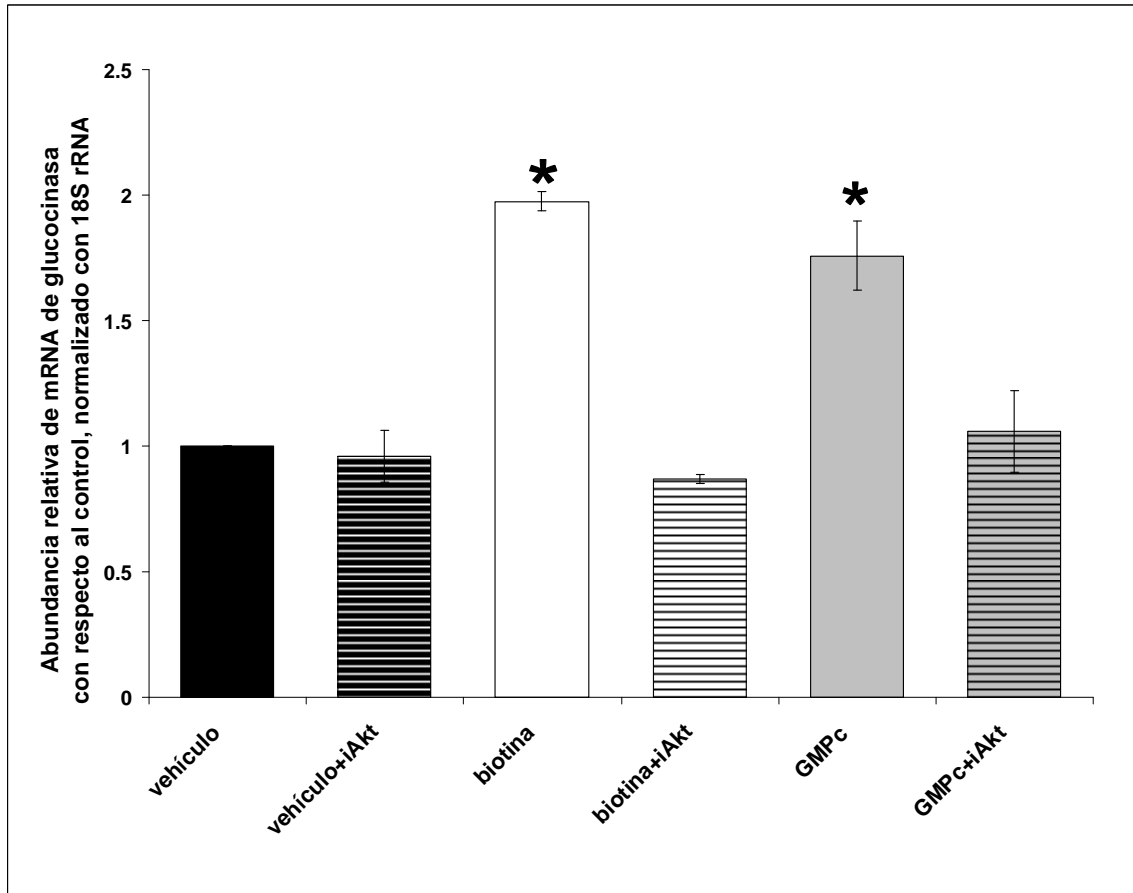


**Figura 11.** Efecto de la neutralización de insulina en el medio de cultivo, en la abundancia de mRNA de la glucocinasa inducida por biotina o por GMPC. Islotes pancreáticos de rata se trataron con el vehículo (suero normal) o con suero con anticuerpos contra insulina 30 minutos antes de agregar al medio biotina [1  $\mu$ M] o 8-Br-GMPC [1  $\mu$ M]. Después de dos horas el mRNA de la glucocinasa se cuantificó por RT-PCR en tiempo real. Los datos son expresados en veces de incrementos relativos con respecto a los islotes control. Barras negras: vehículo (PBS); barras blancas: biotina; barras grises: GMPC. Cada valor representa la media  $\pm$  ES de 4 experimentos independientes. Las comparaciones fueron evaluadas por ANOVA de dos vías. \* denota diferencias significativas,  $p \leq 0.05$ .



**Figura 12.** Efecto de la inhibición de la actividad de la PI3K en la abundancia de mRNA de la glucocinasa inducida por biotina o por GMPc. Islotes pancreáticos de rata se trataron con el vehículo (PBS) o con wortmanina [100 nM] 30 minutos antes de agregar al medio biotina [1  $\mu$ M] o 8-Br-GMPc [1  $\mu$ M]. Después de dos horas el mRNA de la glucocinasa se cuantificó por RT-PCR en tiempo real.. Los datos se expresan en veces de incrementos relativos con respecto a los islotes control. Barras negras: vehículo (PBS); barras blancas: biotina; barras grises: GMPc. Cada valor representa la media  $\pm$  ES de 3 experimentos independientes. Las comparaciones fueron evaluadas por ANOVA de dos vías. \* denota diferencias significativas,  $p \leq 0.05$ .

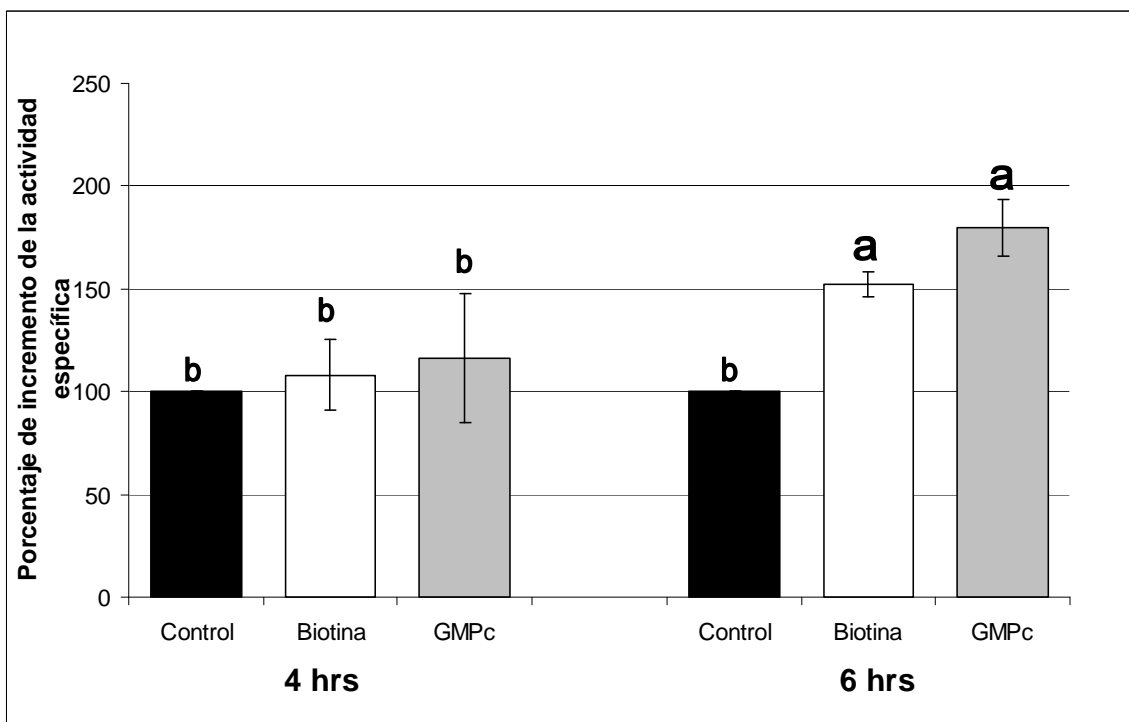




**Figura 13.** Efecto de la inhibición de la actividad de Akt/PKB en la abundancia de mRNA de la glucocinasa inducida por biotina o por GMPc. Islotes pancreáticos de rata se trataron con el vehículo (PBS) o con el inhibidor de la Akt (PKB) [10  $\mu$ M] 30 minutos antes de agregar al medio biotina [1  $\mu$ M] o GMPc [1  $\mu$ M]. Después de dos horas el mRNA de la glucocinasa se cuantificó por RT-PCR en tiempo real. Los datos se expresan en veces de incrementos relativos con respecto a los islotes control. Barras negras: vehículo (PBS); barras blancas: biotina; barras grises: GMPc. Cada valor representa la media  $\pm$  ES de 4 experimentos independientes. Las comparaciones fueron evaluadas por ANOVA de dos vías. \* denota diferencias significativas,  $p \leq 0.05$ .

## 5.6 Efecto de la biotina sobre la actividad específica de la glucocinasa.

También analizamos el efecto de la biotina sobre la actividad de la glucocinasa (Figura 14). Nuestros resultados demostraron que, en los islotes tratados con biotina o con GMPc, la actividad específica de la glucocinasa pancreática se incrementó significativamente después de las 6 horas de tratamiento: (Control:  $54.9 \pm 13$ ; biotina:  $93.7 \pm 17$ ; GMPc:  $109.9 \pm 14$  pmol/h.islet;  $n=3$ ).



**Figura 14.** Efecto de la biotina y del GMPc sobre de la actividad específica de la glucocinasa pancreática. Los islotes fueron tratados con el vehículo (PBS) o con biotina [ $1 \mu\text{M}$ ] o GMPc [ $1 \mu\text{M}$ ] durante 4 y 6 horas, y posteriormente se determinó la actividad específica de la glucocinasa. Los datos se expresan en porcentaje de incremento con respecto a los islotes control. Barras negras: vehículo (PBS); barras blancas: biotina; barras grises: GMPc. Cada valor representa la media  $\pm$  ES de 4 experimentos independientes. Las comparaciones fueron evaluadas por ANOVA de dos vías. Diferentes letras denotan diferencias significativas,  $p \leq 0.05$ .

## 6. DISCUSIÓN

Los mecanismos moleculares mediante los cuales la biotina afecta la expresión genética se han explorado solo parcialmente. En este estudio investigamos los posibles efectores que participan en el efecto de la biotina sobre la expresión de la glucocinasa pancreática. Nuestros resultados permiten por primera vez ensamblar nuevos elementos en la vía de señalización de la vitamina y abren un nuevo panorama en el entendimiento de los mecanismos moleculares de la biotina sobre la expresión genética y el metabolismo de carbohidratos.

Los datos obtenidos apoyan el rol que juega la señalización vía GMPc/PKG en la expresión genética mediada por la biotina. La acción de esta vitamina sobre la expresión de la glucocinasa es análoga a la que se ha descrito en el efecto sobre la traducción del receptor de asialoglicoproteínas (Collins, 1988; Stockert, 1990, 1992, 1997) y el receptor de la insulina (De la Vega, 1999) en la línea celular hepática HepG2. Un mecanismo similar podría participar en la expresión de la glucocinasa hepática ya que Spence y Kouldelka (Spence, 1984) reportaron que un aumento en la concentración intracelular de GMPc precede al aumento de la actividad de esta isoenzima en respuesta a la biotina. Sin embargo, nuestros resultados no descartan la posibilidad de que otros mecanismos de acción de la biotina como la biotinilación de histonas, o los cambios en la heterocromatina que participan en la expresión genética (Stanley, 2001; Kothapalli, 2005), pudiesen coexistir en la acción de la vitamina, de manera similar a como se presenta, por ejemplo, en la acción de las hormonas esteroideas, las cuales ejercen sus efectos a través de diferentes mecanismos y vías (Cheskis, 2004).

La cascada de eventos que continúan después de la activación de la guanilato ciclasa / PKG en la transcripción genética mediada por biotina se desconoce. Utilizando diferentes bloqueadores encontramos que el efecto de la biotina sobre la expresión de la glucocinasa requiere de la secreción de insulina. Nuestros resultados revelaron que al inhibir de la secreción de la insulina, tanto previniendo el cierre de los canales de K<sup>+</sup> sensibles a ATP con diazóxido, o bloqueando los

canales tipo L de  $\text{Ca}^{2+}$  activados por voltaje, se atenúa el efecto inducido por la biotina sobre la expresión de la glucocinasa pancreática.

En este estudio también demostramos que tanto la biotina como el 8-Br-cGMP incrementan el contenido de ATP. Esta observación es consistente con otras evidencias que indican el efecto de ambos compuestos sobre la utilización de glucosa y la producción de ATP. En las células RINm5F y en islotes pancreáticos, Laychock y colaboradores (1987, 1991) encontraron que el 8-Br-cGMP incrementó la utilización de glucosa. Por otro lado, Sone y cols. (2004) reportaron que en islotes pancreáticos tratados con biotina se incrementa la producción de ATP y  $\text{CO}_2$ , y que el aumento en la oxidación de glucosa es proporcional al efecto observado sobre la secreción de insulina. Estos autores también observaron que el estado 3 de la respiración en mitocondrias hepáticas es mayor en respuesta a la biotina (Sone, 2004). Dado que la secreción de insulina estimulada por glucosa involucra el acoplamiento clásico del cierre de los canales de  $\text{K}^+$  sensibles a ATP, como resultado de un aumento en la relación ATP/ADP generado por la oxidación de la glucosa; los estudios previos de Laychock, 1(987) y de Sone, (2004) aunados a nuestros resultados sugieren que el efecto de la biotina en los islotes involucra a la secreción de insulina, mediada por un incremento en los niveles de oxidación de la glucosa que conducen a un aumento en la producción de ATP.

Los mecanismos moleculares que participan en el efecto de la biotina sobre el contenido de ATP no han sido determinados. En este trabajo demostramos que la actividad de la PKG es indispensable para incrementar el contenido de ATP en respuesta tanto a la biotina como al  $\text{GMPc}$ , demostrando por primera vez que la biotina participa en el metabolismo energético a través de la vía de señalización  $\text{GMPc}/\text{PKG}$ .

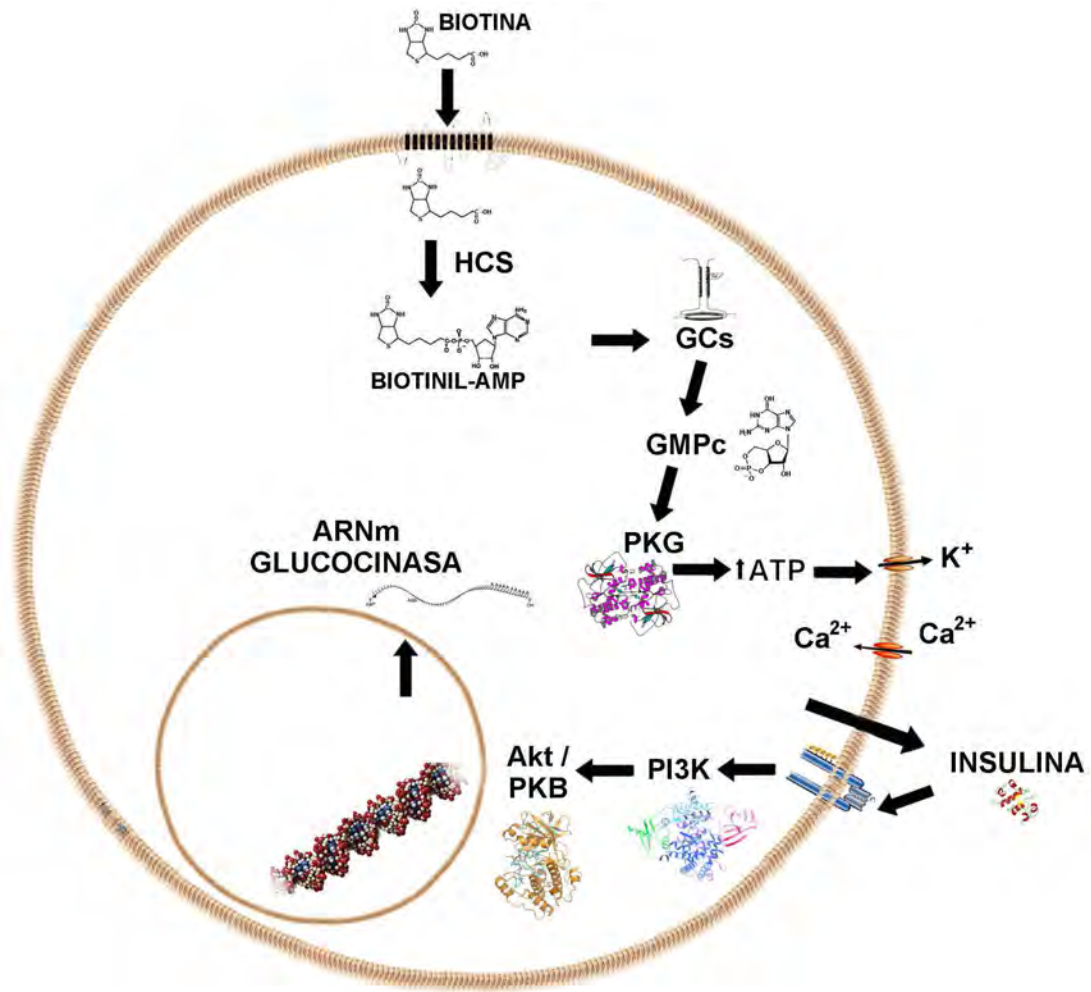
Los resultados obtenidos también nos indican que la expresión de la glucocinasa inducida por la biotina requiere de la acción autocrina de la insulina y su señalización a través de  $\text{PI3K}/\text{Akt}$ . Observamos que el efecto de la biotina en los

islotos tratados se suprimía cuando: a) la insulina secretada es neutralizada con anticuerpos agregados al medio; b) al inhibir la actividad de la fosfoinositol-3 cinasa; y c) al inhibir la actividad de la PKB /Akt. De manera similar a nuestras observaciones, Leibeiger y cols. (2001) reportaron que la señalización autocrina de la insulina activa la transcripción de la glucocinasa pancreática a través de la activación del receptor para insulina tipo B, y por el aumento en la actividad de la fosfoinositol-3 cinasa clase II y la PKB / Akt. Investigaciones más recientes han aportado evidencias que demuestran la participación autocrina de la insulina en diferentes procesos, como la transcripción y traducción genética, el influjo de calcio y la misma secreción de insulina (Uhles, 2007, Aikin, 2006; Leibiger, 2002); en la sobrevivencia de islotos aislados (Aikin, 2006; Navarro-Tableros, 2004), y en la supresión de un programa constitutivo de apoptosis en las células  $\beta$  (Hoorens, 1996). El efecto de concentraciones farmacológicas de biotina sobre la acción autocrina de la insulina sugiere que la vitamina podría tener una importancia terapéutica en el desarrollo temprano de la diabetes, aumentando la sobrevivencia de las células del islote, y en el cultivo y preservación de los mismos, previo a su trasplante.

A la fecha existen dos estudios que han explorado cuales serían las proteínas blanco del GMPc que median el efecto de la biotina. De la Vega y Stockert (1999, 2000) demostraron que la biotina, a través de la actividad de la guanilato ciclasa soluble y la PKG, incrementa la fosforilación de  $\alpha$ -COP, una proteína del complejo postransduccional COP-I que regula la traducción de los receptores hepáticos para asialoglicoproteínas y para la insulina (De la Vega, 2000). En las células HepG-2, la deficiencia de biotina incrementa la cantidad de proteínas que participan en la vía de señalización mediada por tirosina cinasas (Rodriguez-Melendez, 2005); estos autores asumen que dicho aumento requiere de la vía de señalización de la biotina mediada por GMPc. El diseño del presente estudio, usando bloqueadores e inhibidores de diferentes vías, nos permite identificar aquellas proteínas cuya actividad participa en la señalización de la biotina. Sin embargo, esta aproximación posee algunas limitaciones dado que algunos

inhibidores no son totalmente específicos (ver Anexo). La activación de la PKG puede activar por entrecruzamiento otras vías, incluso afectar directamente la actividad de canales iónicos (Denninger, 1999). Por otro lado, tampoco podríamos descartar la posibilidad de que, además de los eventos descritos, la biotina también incremente en los islotes la traducción del receptor de la insulina y que este efecto contribuya al aumento en la expresión de la glucocinasa pancreática (De la Vega, 2000). En estudios futuros planteamos analizar esta posibilidad.

De los conocimientos derivados de este trabajo establecimos un nuevo esquema para explicar el mecanismo de acción de la biotina sobre la expresión de la glucocinasa pancreática. En la Figura 15 se ilustran los eventos que intervienen en la vía de la señalización de la biotina posteriores a la actividad de la PKG. Proponemos que una vez que la biotina es metabolizada en biotinil-AMP, se involucra la vía de señalización mediada por la guanilato ciclasa y la PKG. Este evento produce un incremento en la producción de ATP intracelular, el cual induce a la secreción de insulina a través del cierre de los canales de  $K^+$  sensibles a ATP, y la consecuente apertura de los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje. La insulina liberada activa de manera autocrina a la vía de señalización de PI3K / Akt, la cual conduce a un aumento en la abundancia del mRNA de la glucocinasa pancreática.



**Figura 15.** Los mecanismos moleculares a través de los cuales la biotina afecta la expresión de la glucocinasa pancreática, requieren de la activación de la vía de señalización del GMPc, a través de la guanilato ciclasa y de la PKG. Esto conlleva al aumento en los niveles de ATP intracelular y a la estimulación de la secreción de insulina mediada por la actividad de los canales de potasio sensibles a ATP y de los canales de calcio tipo L dependientes de voltaje. La insulina secretada actúa de manera autocrina sobre las células del islote y activa la vía de señalización mediada por la fosfoinositol-3-quinasa y la proteína Akt, la cual incrementa la expresión de la glucocinasa pancreática.

Las primeras apreciaciones de Dakshinamurti (Dakshinamurti, 1968) en la década de 1960 sugerían que la biotina poseía efectos insulino-trópicos. Nuestros hallazgos demuestran la participación de la secreción de la insulina y la vía de transducción mediada por PI3K/Akt en la cascada de señalización de la biotina. Aunada esta observación junto con los estudios que indican que la biotina aumenta traducción del receptor de la insulina (De la Vega, 1999), dan apoyo molecular a la acción insulino-trópica de la biotina.

La recomendación de ingesta diaria de biotina es de 30  $\mu\text{g}$  al día (Food and Nutrition Board, 1998). Varios estudios han demostrado que la deficiencia de biotina afecta al metabolismo de los carbohidratos, lo que indica que la ingesta diaria de biotina es necesaria para mantener la homeostasis de la glucosa (Dakshinamurti 1968; Romero-Nararro, 1999; Sone 1999, 2000). Varios estudios han demostrado que la administración de dosis farmacológicas de biotina (en el orden de miligramos) favorece la homeostasis de la glucosa (Reddi, 1988; Zhang, 1997; Coggeshall, 1985; Maebashi, 1993; Koustikos, 1966). De hecho, actualmente se emplea esta estrategia para el tratamiento de la diabetes (Albarracin, 2005; Singer, 2006). La suplementación farmacológica de biotina (1.2 mg/día) durante dos semanas alcanza una concentración sérica de 9.4 a 47.7 nmol/L (Mock, 1997). En este trabajo y en uno previo (Romero-Navarro, 1999) hemos demostrado que a estas concentraciones de biotina se incrementan tanto la actividad como el mRNA de la glucocinasa en cultivos primarios de islotes.

El conocimiento de la acción molecular de las vitaminas ha permitido en la actualidad el desarrollo de fármacos que ahora son empleados regularmente para el tratamiento de diversas afecciones, al mismo tiempo que abre nuevas perspectivas y conocimientos sobre las señales nutricionales y las funciones biológicas. En particular, el extenso conocimiento de las acciones genéticas de la vitamina A y la vitamina D han dado fruto a agentes farmacológicos indicados en el tratamiento de diferentes afecciones. En la actualidad varias compañías farmacéuticas se encuentran investigando el uso de diversos compuestos



derivados de la vitamina A como nuevos agentes terapéuticos (Hinds, 1997), entre ellas, en el tratamiento de diabetes tipo-2 (Mukherjee, 1997; Liu, 2000). En contraste, el desarrollo de la investigación sobre la biotina ha sido escaso, y es solo recientemente que se ha reiniciado el estudio de sus efectos y mecanismos de acción. Dada la importancia que posee la glucocinasa en la regulación de la glucemia y el efecto potencial de la biotina en el desarrollo de medicamentos de acción hipoglucemiante, el conocimiento de los mecanismos de acción de la biotina sobre esta enzima ayudará en la construcción del conocimiento para determinar, de manera semejante a la trayectoria del estudio de otras vitaminas, su uso futuro como medicamento y/o al desarrollo nuevos productos farmacológicos, en el tratamiento de diabetes, enfermedad que representa un importante problema de salud en México y en el mundo.

## 7. CONCLUSIONES

Los mecanismos moleculares a través de los cuales la biotina afecta la expresión de la glucocinasa pancreática, requieren de la activación de la vía de señalización del GMPc, a través de la guanilato ciclasa y de la PKG. Esto conlleva al aumento en los niveles de ATP intracelular y a la estimulación de la secreción de insulina mediada por la actividad de los canales de potasio sensibles a ATP y de los canales de calcio tipo L dependientes de voltaje. La insulina secretada actúa de manera autocrina sobre las células del islote y activa la vía de señalización mediada por la PI3K y la proteína Akt, la cual incrementa la expresión de la glucocinasa pancreática. Nuestros resultados permiten por primera vez ensamblar nuevos elementos en la vía de señalización de la vitamina y abren un nuevo panorama en el entendimiento de los mecanismos moleculares de la biotina sobre la expresión genética y en el metabolismo de los carbohidratos.

## 8. REFERENCIAS

- Achuta PN, Mistry SP. Synthesis of biotin-dependent carboxylases from their apoproteins and biotin. *Biochem. Rev.* (Bangalore) 1972; 43: 1–12.
- Aikin R, Hanley S, Maysinger D, Lipsett M, Castellarin M, Paraskevas S, Rosenberg L. Autocrine insulin action activates Akt and increases survival of isolated human islets. *Diabetologia.* 2006; 49(12):2900-9.
- Albarracin C, Fuqua B, Geohas J, Finch M, Komorowski JR. Improvement in glycemic control, lipids and insulin sensitivity with the combination of chromium picolinate and biotin in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes* 2005; 54 S; A428.
- Ashcroft, F. M., and Rorsman, P. ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels: a link between B-cell metabolism and insulin secretion. *Biochem Soc Trans.* 1990; 18(1):109-11.
- Báez-Saldaña A, Díaz G, Espinoza B, Ortega E. Biotin deficiency induces changes in subpopulations of spleen lymphocytes in mice. *Am J Clin Nutr* 1998; 64: 431-437.
- Báez-Saldaña A, Ortega E. Biotin deficiency accelerates thymus involution, blocks thymocyte maturation and decreases nose-rump length in mice. *J Nutr* 2004; 34: 1979-1987
- Bailey LM, Ivanov RA, Wallace JC, Polyak SW. Artifactual detection of biotin on histones by streptavidin. *Anal Biochem.* 2008; 373(1):71-7.
- Balmer JE, Blomhoff R. Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res* 2002; 43: 1773-1808
- Bhullar RP, Dakshinamurti K. The effect of biotin on cellular functions in HeLa cells. *J Cell Physiol* 1985; 123(3):425-430.
- 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(2):154-8.
- Brandsch R. Regulation of gene expression by cofactors derived from B vitamins. *J Nutr Sci Vitaminol* 1994; 40: 371-399
- Cabrera-Valladares G, Matschinsky FM, Wang J, Fernandez-Mejia C. Effect of retinoic acid on glucokinase activity and gene expression in neonatal and adult cultured hepatocytes. *Life Sci.* 2001; 68(25):2813-24.
- Camporeale G, Giordano E, Rendina R, Zempleni J, Eissenberg JC. 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.

Carlberg C. Lipid soluble vitamins in gene regulation. *Biofactors* 1999; 10: 91-97

Carneiro EM, Latorraca MQ, Araujo E, Beltrá M, Oliveras MJ, Navarro M, Berná G, Bedoya FJ, Velloso LA, Soria B, Martín F. Taurine supplementation modulates glucose homeostasis and islet function. *J Nutr Biochem* 2008. On press.

Chapman A, Cronan J. Molecular biology of attachment to proteins. *J Nutr* 1999; 447S-484S.

Chatterjee N, Kumar C, Ortiz A, Rubin S, Said H. Molecular mechanism of the intestinal biotin transport process. *Am J Physiol* 1999; 277 (46): C605-C613.

Chauhan J, Dakshimamurti K. Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats. *J Biol Chem* 1991; 266: 10035-10038.

Chen C, Hosokawa H, Bumbalo LM, Leahy JL. Regulatory effects of glucose on the catalytic activity and cellular content of glucokinase in the pancreatic beta cell. Study using cultured rat islets. *J Clin Invest* 1994; 94(4):1616-20.

Cheskis BJ. Regulation of cell signalling cascades by steroid hormones. *J Cell Biochem*. 2004; 93:20-7.

Chistakos S, Dhawan P, Liu Y. New insights into the mechanism of vitamin D action. *J Cell Biochem* 2003; 88: 695-705

Coggeshall JC, Hegggers JP, Robson MC. Biotin status and plasma glucose levels in diabetics. *Ann NY Acad Sci* 1985; 447: 389-392

Cohen N, Thomas M. Biotin transport into fully differentiated 3T3-L1 cells. *Biochim Biophys Res Comm* 1982; 108 (4): 1508-1516.

Collins JC, Paietta E, Green R, Morell AG, Stockert RJ. Biotin-dependent expression of the asialoglycoprotein receptor in HepG2 cells. *J Biol Chem* 1988; 263: 11280-11283.

Combs, GF Jr. (eds.) Biotin: The Vitamins. Fundamental Aspects in Nutrition and Health. 2nd Edition Academic Press Inc: San Diego, 1994; 329-345.

Crisp SE, Griffin JB, White BR, Toombs CF, Camporeale G, Said HM, Zemleni J. Biotin supply affects rates of cell proliferation, biotinylation of carboxylases and histones, and expression of the gene encoding the sodium-dependent multivitamin transporter in JAr choriocarcinoma cells. *Eur J Nutr* 2004; 43(1):23-31.

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

Dakshinamurti K, Mistry Sp. Tissue and intracellular distribution of biotin-C-1400H in rats and chicks. *J Biol Chem* 1963a Jan;238:294-6.

Dakshinamurti K, Mistry Sp. Amino acid incorporation and biotin deficiency. *J Biol Chem* 1963b Jan;238:297-301.

Dakshinamurti K, Modi VV, Mistry SP. Some aspects of carbohydrates metabolism in biotin-deficient rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1968; 127(2):396-400.

Dakshinamurti K, Tarrago-Litvak L, Hong HC. Biotin and glucose metabolism. *Can J Biochem* 1970: 493-500.

Dakshinamurti K. Biotin: a regulator of gene expression. *J Nutr Biochem* 2005; 16: 419-423

Dakshinamurti, K, Chauhan J. 1994. En Vitamin receptors: Vitamins as ligands in Cell Communication. Cambridge University Press, EE.UU.: 200-249.

De la Vega, LA Stockert RJ. Regulation of the insulin and asialoglycoprotein receptors via cGMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol- Cell Physiol* 2000; 279 (6): C2037-C2042.

De la Vega, LA, Stockert RJ. The cytoplasmic coatmer protein COPI. A potencial translational regulador. *J Biol Chem* 1999; 274; 44: 31135-31138.

Decaux JF, Juanes M, Bossard P, Girard J. Effects of triiodothyronine and retinoic acid on glucokinase gene expression in neonatal rat hepatocytes. *Mol Cell Endocrinol* 1997; 130(1-2):61-7.

Denninger J, Marletta M. Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *BBA* 1999; 1411: 334-350.

Deodhar AD, Mistry SP. Gluconeogenesis in biotin deficiency: in vivo synthesis of pyruvate holocarboxylase in biotin deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1969; 34:755-9.

Fernandez-Mejia C, Davidson MB. Regulation of glucokinase and proinsulin gene expression and insulin secretion in RIN-m5F cells by dexamethasone, retinoic acid, and thyroid hormone. *Endocrinology* 1992; 130(3):1660-8.

Fernandez-Mejia C, Vega-Allende J, Rojas-Ochoa A, Rodriguez-Dorantes M, Romero-Navarro G, Matschinsky FM, Wang J, German MS. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate increases pancreatic glucokinase activity and gene expression. *Endocrinology*. 2001; 142(4):1448-52.

Fernandez-Mejia C. Pharmacological effects of biotin. *J Nutr Biochem* 2005; 16: 424-427.

Ferre T, Riu E, Bosch F, Valera A. Evidence from transgenic mice that glucokinase is rate limiting for glucose utilization in the liver. *FASEB J* 1996 (10):1213-8.

Food and Nutrition Board, Institute of Medicine: Dietary reference intakes for Thiamine, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Panthotenic acid, Biotin and Choline. Washington DC: National Academy Press. 1998, pp.374-89

Fulgencio JP, Kohl C, Girard J, Pégorier JP. Effect of metformin on fatty acid and glucose metabolism in freshly isolated hepatocytes and on specific gene expression in cultured hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 2001;62(4):439-46.

Glaser B, Kesavan P, Heyman M, Davis E, Cuesta A, Buchs A, Stanley CA, Thornton PS, Permutt MA, Matschinsky FM, Herold KC. Familial hyperinsulinism caused by an activating glucokinase mutation. *N Engl J Med* 1998; 338(4):226-30.

Gloyn AL, Odili S, Zelent D, Buettger C, Castleden HA, Steele AM, Stride A, Shiota C, Magnuson MA, Lorini R, d'Annunzio G, Stanley CA, Kwagh J, van Schaftingen E, Veiga-da-Cunha M, Barbetti F, Dunten P, Han Y, Grimsby J, Taub R, Ellard S, Hattersley AT, Matschinsky FM. Insights into the structure and regulation of glucokinase from a novel mutation (V62M), which causes maturity-onset diabetes of the young. *J Biol Chem*. 2005; 280(14):14105-13.

Granata R, Settanni F, Gallo D, Trovato L, Biancone L, Cantaluppi V, Nano R, Annunziata M, Campiglia P, Arnoletti E, Ghè C, Volante M, Papotti M, Muccioli G, Ghigo E. Obestatin promotes survival of pancreatic beta-cells and human islets and induces expression of genes involved in the regulation of beta-cell mass and function. *Diabetes* 2008; 57(4):967-79.

Griffin JB, Rodriguez-Melendez R, Zemleni J. The nuclear abundance of transcription factors Sp1 and Sp3 depends on biotin in Jurkat cells. *J Nutr* 2003; 133(11):3409-15.

H.U. Bergmeyer, in: H.U. Bergmeyer (Ed.), *Methods of enzymatic analysis*, Vol. 3-9, Weinheim Verlag Chemie, Germany, 1983.

Hinata S, Nishi S, Matsukage T, Funai T, Ichiyama A, Yoshimi T. Regulation of glucokinase gene expression in cultured rat islet cells: the inhibitory effects of T3 and glucagon, and the stimulatory effect of glibenclamide. *Diabetes Res* 1994; 26(1):13-23.

Hinds TS, West WL, Knight EM. Carotenoids and retinoids: a review of research, clinical, and public health applications. *J Clin Pharmacol* 1997; 37: 551-8.

Hoorens A, Van de Casteele M, Kloppel G, Pipeleers D. Glucose promotes survival of rat pancreatic beta cells by activating synthesis of proteins which suppress a constitutive apoptotic program. *J Clin Invest* 1996; 98(7):1568-74.

Hymes J, Fleischhauer K, Wolf B. Biotinylation of histones by human serum biotinidase: assessment of biotinyl-transferase activity in sera from normal individuals and children with biotinidase deficiency. *Biochem Mol Med* 1995; 56: 76-83.

Hymes J, Wolf B. Biotinidase and its roles in biotin metabolism. *Clin Chim Acta* 1996; 225: 1-11.

Hymes J, Wolf B. Human biotinidase isn't just for recycling biotin. *J Nutr* 1999; 129(2S Suppl):485S-489S.

Ilyedjian PB, Jotterand D, Nospikel T, Asfari M, Pilot PR. Transcriptional induction of glucokinase gene by insulin in cultured liver cells and its repression by the glucagon-cAMP system. *J Biol Chem* 1989; 264(36):21824-9.

Jitrapakdee S, Wallace JC. The biotin enzyme family: conserved structural motifs and domain rearrangements. *Curr Protein Pept Sci* 2003; 4(3): 217-229. Review

Jung UJ, Lee MK, Park YB, Kang MA, Choi MS. Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type-2 diabetic mice. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006; 38(7):1134-45.

Kim HI, Cha JY, Kim SY, Kim JW, Roh KJ, Seong JK, Lee NT, Choi KY, Kim KS, Ahn YH. Peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma upregulates glucokinase gene expression in beta-cells. *Diabetes* 2002; 51(3):676-85.

Kim SY, Kim HI, Park SK, Im SS, Li T, Cheon HG, Ahn YH. Liver glucokinase can be activated by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Diabetes* 2004; 53 Suppl 1:S66-70.

Kothapalli N, Camporeale G, Kueh A, Chew YC, Oommen AM, Griffin JB, Zemleni J. Biological functions of biotinylated histones. *J Nutr Biochem* 2005; 16(7):446-8.

Koustikos D, Fourtounas C, Kapetanaki A, Agroyannis, B., Tzanatos, H., Rammos, G., Kopelias, I., Bosiolis, B., Bovoleti, O., Darema, M., Sallum, G. Oral glucose test after high-dose i.v. biotin administration in normoglycemic hemodialysis patients. *Ren Fail* 1966; 18: 131-137

Kulkarni RN, Brüning JC, Winnay JN, Postic C, Magnuson MA, Kahn CR. Tissue specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells an insulin secretory defect similar to that of type 2 diabetes. *Cell* 1999.; 96: 329-339.

Lamhonwah AM, Quan F, Gravel RA. Sequence homology around the biotin-binding site of human propionyl-CoA carboxylase and pyruvate carboxylase. *Arch Biochem Biophys* 1987; 254: 631-636.

Laychock SG, Modica ME, Cavanaugh CT. L-arginine stimulates cyclic guanosine 3',5'-monophosphate formation in rat islets of Langerhans and RINm5F insulinoma cells: evidence for L-arginine:nitric oxide synthase. *Endocrinology* 1991; 129(6):3043-52.

Laychock SG. Effects of guanosine 3',5'-monophosphate on glucose utilization in isolated islets of Langerhans. *Endocrinology* 1987; 120(2):517-24.

Leibiger B, Leibiger IB, Moede T, Kemper S, Kulkarni RN, Kahn CR, de Vargas LM, Berggren PO. Selective insulin signaling through A and B insulin receptors regulates transcription of insulin and glucokinase genes in pancreatic beta cells. *Mol Cell*. 2001; 7(3):559-70.

Leibiger IB, Leibiger B, Berggren PO. Insulin feedback action on pancreatic beta-cell function. *FEBS Lett*. 2002; 532(1-2):1-6.

Liu IM, Hsu FL, Chen CF, Cheng JT. Antihyperglycemic action of isoferulic acid in streptozotocin-induced diabetic rats. *Br J Pharmacol* 2000; 129: 631-6.

Liu HK, Green BD, Gault VA, McCluskey JT, McClenaghan NH, O'Harte FP, Flatt PR. N-acetyl-GLP-1: a DPP IV-resistant analogue of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) with improved effects on pancreatic beta-cell-associated gene expression. *Cell Biol Int* 2004; 28(1):69-73.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>[Delta Delta C(t)] method. *Methods* 2001; 25:402-408.

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: 211-218

Magnuson MA. Glucokinase gene structure. Functional implications of molecular genetic studies. *Diabetes* 1990;39(5):523-7. Review.

Magnuson MA. Tissue-specific regulation of glucokinase gene expression. *J Cell Biochem* 1992; 48(2):115-21

Maiztegui B, Borelli MI, Raschia MA, Del Zotto H, Gagliardino JJ. Islet adaptive changes to fructose-induced insulin resistance: beta-cell mass, glucokinase, glucose metabolism, and insulin secretion. *J Endocrinol* 2009; 200(2):139-49.



Manthey KC, Griffin JB, Zampleni J. Biotin supply affects expression of biotin transporters, biotinylation of carboxylases and metabolism of interleukin-2 in Jurkat cells. *J Nutr* 2002; 132 (5): 887-892.

Marin-Hernandez A, Rodriguez-Enriquez S, Vital-Gonzalez PA, Flores-Rodriguez FL, Macias-Silva M, Sosa-Garrocho M, Moreno-Sanchez R. Determining and understanding the control of glycolysis in fast-growth tumor cells. Flux control by an over-expressed but strongly product-inhibited hexokinase. *FEBS J* 2006; 273:1975-88.

Matschinsky FM, Glaser B, Magnuson MA. Pancreatic beta-cell glucokinase: closing the gap between theoretical concepts and experimental realities. *Diabetes* 1998; 47(3):307-15.

Matschinsky, FM. Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes* 1996; 45: 223-242.

Meglasson MD, Matschinsky FM. Pancreatic islet glucose metabolism and regulation of insulin secretion. *Diabetes Metab Rev* 1986; 2(3-4):163-214.

Mock DM, Mock NI. Serum concentrations of bisnorbiotin and biotin sulfoxide increase during both acute and chronic biotin supplementation. *J Lab Clin Med* 1997; 129:384-8.

Mukherjee R, Davies PJ, Crombie DL, Bischoff ED, Cesario RM, Jow L, Hamann LG, Boehm MF, Mondon CE, et al. Sensitization of diabetic and obese mice to insulin by retinoid X receptor agonists. *Nature* 1997;386: 407-10.

Narang MA, Dumas R, Ayer LM, Gravel RA. Reduced histone biotinylation in multiple carboxylase deficiency patients: a nuclear role for holocarboxylase synthetase. *Hum Mol Genet* 2004; 13(1):15-23.

Narkewicz MR, Iynedjian PB, Ferre P, Girard J. Insulin and tri-iodothyronine induce glucokinase mRNA in primary cultures of neonatal rat hepatocytes. *Biochem J* 1990; 271(3):585-9.

Navarro-Tableros V, Sanchez-Soto MC, Garcia S, Hiriart M. Autocrine regulation of single pancreatic beta-cell survival. *Diabetes* 2004; 53(8):2018-23.

Parry MJ, Walker DG. Purification and properties of adenosine 5'-triphosphate-D-glucose 6-phosphotransferase from rat liver. *Biochem J* 1966; 99(2):266-74.

Paulose CS, Thliveris JA, Viswanathan M, Dakshinamurti K. Testicular function in biotin-deficient adult rats. *Horm Metab Res* 1989; 21(12):661-5

Peters DM, Griffin JB, Stanley JS, Beck MM, Zempleni J. Exposure to UV light causes increased biotinylation of histones in Jurkat cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 283(3):C878-84.

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: 1323-1330

Rodríguez-Melendez R, Camporeale G, Griffin JB, Zempleni J. Interleukin-2 receptor  $\gamma$ -dependent endocytosis depends on biotin in Jurkat cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 284: C415-421.

Rodriguez-Melendez R, Cano S, Mendez ST, Velazquez A. Biotin regulates the genetic expression of holocarboxylase synthetase and mitochondrial carboxylases in rats. *J Nutr* 2001; 131(7):1909-13.

Rodriguez-Melendez R, Griffin JB, 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, Schwab LD, Zempleni J. Jurkat cells respond to biotin deficiency with increased nuclear translocation of NF-kappaB, mediating cell survival. *Int J Vitam Nutr Res* 2004; 74(3):209-16.

Rodriguez-Melendez R, Zempleni J. Regulation of gene expression by biotin. *J Nutr Biochem* 2003; 14: 680-690.

Rodriguez-Melendez R, Zempleni 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, Velasquez A, Wang J, and Fernandez-Mejia C. Biotin regulation of pancreatic glucokinase and insulin in primary cultured rat islets and in biotin deficient rats. *Endocrinology* 1999; 140: 4595-4500.

Romero-Navarro G, Lopez-Aceves T, Rojas-Ochoa A, Fernandez Mejia C. Effect of dichlorvos on hepatic and pancreatic glucokinase activity and gene expression, and on insulin mRNA levels. *Life Sci* 2006; 78(9):1015-20.

Sarabu R, Grimsby J. Targeting glucokinase activation for the treatment of type 2 diabetes-a status review. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2005; 8(5):631-7.

Scheerger SB, Zempleni J. Expression of oncogenes depends on biotin in human small cell lung cancer cells NCI-H69. *Int J Vitam Nutr Res* 2003; 73(6):461-7.

Serafini, T. ADP-ribosylation factor is a subunit of the coat of Golgi-derived COP-coated vesicles: a novel role for a GTP-binding protein. *Cell*, 1991; 67(2): 239-53.

Shiraishi A, Yamada Y, Tsuura Y, Fijimoto S, Tsukiyama K, Mukai E, Toyoda Y, Miwa I, Seino Y. A novel glucokinase regulator in pancreatic beta cells: precursor of propionyl-CoA carboxylase beta subunit interacts with glucokinase and augments its activity. *J Biol Chem* 2001; 276(4):2325-8.

Sibrowski W, Seitz HJ. Rapid action of insulin and cyclic AMP in the regulation of functional messenger RNA coding for glucokinase in rat liver. *J Biol Chem* 1984; 259(1):343-6

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* 2006; 8(6):636-43.

Solorzano-Vargas RS, 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.

Sone H, Ito M, Shimizu M, Sasaki Y, Komai M, Furukawa Y. Characteristics of the biotin enhancement of glucose-induced insulin secretion in pancreatic islets of rat. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000; 64(3): 550-554.

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.

Sone H, Sasaki Y, Komai M, Toyomizu M, Kagawa Y, Furukawa Y. Biotin enhances ATP synthesis in pancreatic islets of the rat, resulting in reinforcement of glucose-induced insulin secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 314(3):824-9.

Spence JT, Koudelka AP. 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

Stanley JS, Griffin JB, Zemleni J. Biotinylation of histones in human cells. Effects of cell proliferation. *Eur J Biochem* 2001; 268(20):5424-9.

Stockert RJ, Morell A. Second messenger modulation of the asialoglycoprotein receptor. *J Biol Chem* 1990; 265 (4): 1841-1846.

Stockert RJ, Paietta E, Racevskis J, Morell AG. Posttranscriptional regulation of the asialoglycoprotein receptor by cGMP. *J Biol Chem* 1992; 267 (1): 56-59.

Stockert RJ, Ren Q. Cytoplasmic protein mRNA interaction mediates cGMP-modulated translational control of the asialoglycoprotein receptor. *J Biol Chem* 1997; 272 (14): 9161-9165.

Swagell CD, Henly DC, Morris CP. Regulation of human hepatocyte gene expression by fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 362(2):374-80.

Tiedge M, Lenzen S. Effects of glucose refeeding and glibenclamide treatment on glucokinase and GLUT2 gene expression in pancreatic B-cells and liver from rats. *Biochem J* 1995; 308 ( Pt 1):139-44.

Tiedge M, Steffek H, Elsner M, Lenzen S. Metabolic regulation, activity state, and intracellular binding of glucokinase in insulin-secreting cells. *Diabetes* 1999; 48(3):514-23.

Tully DB, Allgood VE, Cidlowski JA. Modulation of steroid receptor-mediated gene expression by vitamin B6. *FASEB J* 1994; 8: 343-349.

Valentová K, Truong NT, Moncion A, de Waziers I, Ulrichová J. Induction of glucokinase mRNA by dietary phenolic compounds in rat liver cells in vitro. *J Agric Food Chem* 2007; 55(19):7726-31.

Velho G, Froguel P, Clement K, Pueyo ME, Rakotoambinina B, Zouali H, Passa P, Cohen D, Robert JJ. Primary pancreatic beta-cell secretory defect caused by mutations in glucokinase gene in kindreds of maturity onset diabetes of the young. *Lancet* 1992; 340(8817):444-8.

Vesely DL. Biotin enhances guanylate cyclase activity. *Science* 1982; 216(4552):1329-30.

Vilches-Flores A, Fernández-Mejía C. Efecto de la biotina sobre la expresión genética y el metabolismo. *Rev Inv Clin* 2005; 57: 716-724

Wang KS, Mock NI, Mock DM. Biotin biotransformation to bisnorbiotin is accelerated by several peroxisome proliferators and steroid hormones in rats. *J Nutr* 1997; 127(11):2212-6

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

Watanabe T. Morphological and biochemical effects of excessive amounts of biotin on embryonic development in mice. *Experientia* 1996; 52: 149-154

Wedel B, Harteneck C, Foerster J, Friebe A, Schultz G, Koesling D. Functional domains of soluble guanylyl cyclase. *J Biol Chem* 1995; 270 (42): 24871-24875.

Weinhaus AJ, Stout LE, Bhagroo NV, Brelje TC, Sorenson RL. Regulation of glucokinase in pancreatic islets by prolactin: a mechanism for increasing glucose-stimulated insulin secretion during pregnancy. *J Endocrinol* 2007;193 (3):367-81

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.

Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, Zhang Y, Bernal D, Pons S, Shulman GI, Bonner-Weir S, White MF. Disruption of IRS-2 causes type-2 diabetes in mice. *Nature* 1998; 391: 900-904.

Wolf, B. (2001) in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, eds. Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Sly, W. S., Valle, D. & Childs, B. (McGraw-Hill Professional, New York), Vol. 3, pp. 3935-3961.

Yang J, Wong RK, Park M, Wu J, Cook JR, York DA, Deng S, Markmann J, Naji A, Wolf BA, Gao Z. Leucine regulation of glucokinase and ATP synthase sensitizes glucose-induced insulin secretion in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 2006; 55(1):193-201

Yoshida K, Murao K, Imachi H, Cao WM, Yu X, Li J, Ahmed RA, Kitanaka N, Wong NC, Unterman TG, Magnuson MA, Ishida T. Pancreatic glucokinase is activated by insulin-like growth factor-I. *Endocrinology* 2007; 148(6):2904-13.

Yoshikawa H, Tajiri Y, Sako Y. Effects of biotin on glucotoxicity of lipotoxicity in rat pancreatic islets. *Metabolism* 2002; 51: 163-168.

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

Zempleni J, Helm RM, Mock DM. 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.

Zhang H, Osada K, Maebeshi 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 mellitus. *J Nutr Sci Vitaminol* 1997; 42: 517-526.

## 9. ANEXO

### Información técnica de los inhibidores, proporcionada por el distribuidor.

#### 9.1. ODQ: 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one

Este compuesto es un inhibidor altamente selectivo e irreversible de la guanilato ciclasa soluble. Se une a su sitio activo, compitiendo con el óxido nítrico. La inhibición es dependiente del tiempo, alcanzando un máximo a los 10 minutos, a una concentración de 0.3  $\mu\text{M}$ . Es soluble en acetato de etilo y DMSO (5 mg/ml).

#### 9.2. Diazoxido

Activador selectivo de los canales de  $\text{K}^+$  sensibles a ATP del músculo liso vascular y de las células  $\beta$  pancreáticas, por lo tanto, inhibe la secreción de insulina. Actúa sobre la subunidad SUR1 del canal, regulando su apertura. Es soluble en metanol (3.2 mg/ml) y en DMSO (10 mg/ml), presentando una coloración amarilla.

#### 9.3. Nifedipina

Esta dihidropiridina es un bloqueador del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L sensible a voltaje, con propiedades vasodilatadoras ya que inhibe el flujo de calcio hacia el interior de la célula. También puede inhibir los canales de  $\text{K}^+$  sensibles a  $\text{Ca}^{2+}$  a concentraciones de 100  $\mu\text{M}$ , así como la síntesis de ADN y el crecimiento celular a 10  $\mu\text{M}$  de nifedipina. Es soluble en DMSO, etanol, metanol y acetato de etilo (50 mg/mL), pero altamente susceptible a la degradación a temperatura ambiente y a la luz.

#### 9.4. Wortmanina

La wortmanina es un antibiótico aislado de *Penicillium funiculosum*, altamente permeable a las células. Es ampliamente usado como inhibidor de la fosfatidilinositol -3 cinasa (PI3K) ya que bloquea directa e irreversiblemente la subunidad catalítica (110 kDa) desde concentraciones de 1 nM y con valores de  $\text{IC}_{50}$  de 3 nM. También puede inhibir a otras enzimas, como la cinasa de la cadena ligera de

la miosina y la fosfolipasa D. Es soluble en methanol (5 mg/mL), acetate de etilo (10 mg/ml) y DMSO (50 mg/mL)

**9.5. Inhibidor de Akt (iAkt): 1L-6-Hydroxymethyl-*chiro*-inositol-2-[(R)-2-Omethyl-3-O-octadecylcarbonate]**

Potente inhibidor de la proteína Akt o PKB (Proteína Cinasa B) que altera la conformación del sitio catalítico, disminuyendo su afinidad por los sustratos. IC<sub>50</sub>=2.0μM. También se ha observado que inhibe débilmente a PI3K (IC<sub>50</sub>=83μM).



## Biotin increases glucokinase expression via soluble guanylate cyclase/protein kinase G, adenosine triphosphate production and autocrine action of insulin in pancreatic rat islets<sup>☆</sup>

Alonso Vilches-Flores<sup>a</sup>, Armando R. Tovar<sup>b</sup>, Alvaro Marin-Hernandez<sup>c</sup>,  
Alberto Rojas-Ochoa<sup>a</sup>, Cristina Fernandez-Mejia<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Unidad de Genética de la Nutrición, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México/Instituto Nacional de Pediatría, Mexico City, C.P. 04530, Mexico

<sup>b</sup>Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City 14000, Mexico

<sup>c</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Mexico City 14000, Mexico

Received 5 October 2008; received in revised form 3 March 2009; accepted 17 March 2009

### Abstract

Besides its role as a coenzyme prosthetic group, biotin has important effects on gene expression. However, the molecular mechanisms through which biotin exerts these effects are largely unknown. We previously found that biotin increases pancreatic glucokinase expression. We have now explored the mechanism underlying this effect. Pancreatic islets from Wistar rats were treated with biotin, in the presence or absence of different types of inhibitors. Glucokinase mRNA and 18s rRNA abundance were determined by real-time PCR. Adenosine triphosphate (ATP) content was analyzed by fluorometry. Biotin treatment increased glucokinase mRNA abundance approximately onefold after 2 h; the effect was sustained up to 24 h. Inhibition of soluble guanylate cyclase or protein kinase G (PKG) signalling suppressed biotin-induced glucokinase expression. The cascade of events downstream of PKG in biotin-mediated gene transcription is not known. We found that inhibition of insulin secretion with diazoxide or nifedipine prevented biotin-stimulated glucokinase mRNA increase. Biotin treatment increased islet ATP content (control:  $4.68 \pm 0.28$ ; biotin treated:  $6.62 \pm 0.26$  pmol/islet) at 30 min. Inhibition of PKG activity suppressed the effects of biotin on ATP content. Insulin antibodies or inhibitors of phosphoinositol-3-kinase/Akt insulin signalling pathway prevented biotin-induced glucokinase expression. The nucleotide 8-Br-cGMP mimicked the biotin effects. We propose that the induction of pancreatic glucokinase mRNA by biotin involves guanylate cyclase and PKG activation, which leads to an increase in ATP content. This induces insulin secretion via ATP-sensitive potassium channels. Autocrine insulin, in turn, activates phosphoinositol-3-kinase/Akt signalling. Our results offer new insights into the pathways that participate in biotin-mediated gene expression.

© 2009 Published by Elsevier Inc.

**Keywords:** Biotin; cGMP; Glucokinase; Gene expression; Insulin signaling

### 1. Introduction

In the last few decades, an increasing number of vitamin-mediated effects have been discovered at the level of gene expression [1–3] in addition to their well-known roles as substrates and cofactor [4]. Examples are the lipophilic vitamins A and D that serve as ligand precursors of the hormone nuclear receptors superfamily and thus affect systemic functions [1–3]. Although little is known about water-soluble vitamins as genetic modulators, there is increasing number of examples of their effects on gene expression [5–8].

Biotin is a water-soluble vitamin that acts as a prosthetic group of carboxylases. Unrelated to this classic role as a coenzyme prosthetic group, biotin regulates gene expression at both the transcriptional and the translational level [6,8,9], and has a wide repertoire of effects on systemic processes such as development [10,11], immunity [12,13] and glucose metabolism [14,15]. Biotin affects gene expression at both the transcriptional and the posttranscriptional level. DNA microarray studies have aided in the identification of thousands of genes affected by biotin [16,17].

The first evidence that biotin affects glucose metabolism was reported by Dakshinamurti et al. [18] in biotin-deficient rats. They observed that glucose tolerance test curves in biotin-deficient rats were significantly higher than the curves of nondeficient rats [18]. They further demonstrated that these effects were the result of a reduction in hepatic glucokinase (EC 2.7.1.1) activity [19], and that the stimulatory effect of biotin occurs at the level of transcription [20]. This group also found that biotin decreases the transcription of hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase (EC 4.1.1.32), a key

<sup>☆</sup> Supported by research grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 44266-M and the Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México IN201901 and IX229004. Alonso Vilches-Flores was a recipient of the CONACyT scholarship number 169971.

\* Corresponding author. Tel.: +52 55 56063558; fax: +52 55 56063489.  
E-mail address: [crisfern@biomedicas.unam.mx](mailto:crisfern@biomedicas.unam.mx) (C. Fernandez-Mejia).



enzyme that stimulates glucose production by the liver [21]. In previous studies [22], we found that biotin stimulates the expression and activity of the pancreatic isoform of glucokinase, which is regulated differently than the hepatic isoenzyme [23]. We also found that insulin secretion increased in response to biotin [22]. Furthermore, studies by our group [22] and others [24,25] have found that the lack of biotin affects pancreatic islet functions.

The findings that biotin has stimulatory effects on the transcription of genes whose action favors glycemia reduction and decreases the transcription of gluconeogenic genes support other observations that indicate that pharmacological doses of biotin decrease hyperglycemia [26–30]. In genetically diabetic KK mice and in OLETF rats, biotin treatment lowered postprandial glucose concentration and improved tolerance to glucose [26,27]. Hyperglycemia reduction was also observed in both type 1 and type 2 diabetics treated with biotin [28,29]. In hemodialysis patients, pharmacological doses of biotin improved their oral glucose tolerance tests [30]. Moreover, commercially available drugs containing pharmacological amounts of biotin are currently used in the treatment of diabetes [31,32].

In spite of the extensive effect of biotin on gene transcription and its present use as a pharmacological agent, the molecular mechanisms of the vitamin as genetic modulator are largely unknown. Two different mechanisms appear to be involved in the genetic effects of biotin: histone biotinylation [33–37] and a soluble guanylate cyclase signalling cascade [38–42]. Histone biotinylation has been implicated in heterochromatin structures, DNA repair, and mitotic chromosome condensation and lifespan [34–36]. On the other hand, guanylate cyclase activity is linked to gene expression of the enzymes involved in its function as a cofactor, such as carboxylases and holocarboxylase synthase [40], and to translation of the asialoglycoprotein receptor [38,39] and insulin receptor [39]. Solorzano-Vargas et al. [40] have proposed that biotinyl-AMP, an intermediate of holocarboxylase synthetase catalytic action, activates soluble guanylate cyclase. Activation of guanylate cyclase leads to increased production of cyclic guanosine monophosphate (cGMP) [41,42], which in turn stimulates protein kinase G (PKG). The cascade of events downstream guanylate cyclase/PKG in biotin-mediated transcription has not been investigated yet. In the present study, we sought to understand the mechanisms regulating biotin-induced pancreatic glucokinase expression.

## 2. Methods and materials

### 2.1. Reagents

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with 5.5 mmol/L glucose, antibiotic mixture (penicillin, streptomycin, amphotericin), dialyzed fetal bovine serum and d-biotin were purchased from Gibco/Invitrogen Corp. (Grand Island, NY, USA); collagenase P, glucose-6-phosphate dehydrogenase and hexokinase from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany); wortmannin from Fluka/Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA); 8-Br-cGMP and ODQ (1-GH (1,2,4) oxadiazolo-(4,3-a) quinaxolin-1-one) from ICN Biomedicals, Inc. (Costa Mesa, CA, USA). The Akt inhibitor 1L-6-hydroxymethyl-chiro-inositol-2-((R)-2-O-methyl-3-O-octadecylcarbonate) was purchased from Alexis Biochemicals (San Diego, CA, USA); Reporter Lysis Buffer from Promega (Madison, WI, USA); TRIzol reagent, dNTP and M-MLV reverse transcriptase from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA); ultrasensitive rat insulin enzyme-linked immunosorbent assay from ALPCO Diagnostics (Salem, NH, USA); Rp-cGMPs (Rp-8 (4-chlorophenylthio)-guanosine-3',5'-cyclic monophosphothiorate), an inhibitor of PKG, diazoxide and nifedipine from Sigma (St. Louis, MO, USA); normal rabbit serum and serum anti-insulin were provided by Dr. Eulises Díaz (Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico). Immunoassay kit for insulin determination was purchased from ALPCO Diagnostics.

### 2.2. Animals

Wistar adult male rats (200–250 g) were obtained from the Biomedical Research Institute of the National Autonomous University of Mexico. Environmental conditions and light–dark cycles (12:12 h) were strictly controlled. Animals were handled according to the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory

Animals (National Academy of Sciences, Washington, DC, 1996). All methods were approved by the Internal Council and the Animal Care Committee of The Biomedical Research Institute.

### 2.3. Islet culture

Overnight food-deprived Wistar adult male rats (200–250 g) were anaesthetized by intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (Pfizer, Mexico City, Mexico), and their pancreas was removed. Finally, rats were killed by cervical dislocation. Pancreatic islets were isolated as described previously [22]. Batches of 400 islets were cultured in a biotin-free DMEM medium with low glucose (5.5 mmol/L), supplemented with biotin-free 5% dialyzed fetal bovine serum and 200,000 U/L penicillin G, 200 g/L streptomycin and 0.5 g/L amphotericin B. After 16 h of incubation at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>, cultured media were replaced and islets were treated or not with one of the following: vehicle (PBS); 0.01, 0.1, 1 μmol/L of d-biotin; or 1 μmol/L 8-Br-cGMP, at different times as indicated in the text. Inhibitors or antibodies were added 30 min before biotin or cGMP treatment. Concentrations of inhibitors were 50 μmol/L ODQ; 10 μmol/L Rp-cGMPs; 250 μmol/L diazoxide; 100 nmol/L wortmannin; 10 μmol/L PKB/Akt inhibitor; insulin antibody serum diluted 1:1000. Ten micromoles per liter of nifedipine was added 15 min before either d-biotin or 8-Br-cGMP treatment.

### 2.4. Messenger RNA analysis

After treatment, islets were collected and total RNA was extracted with TRIzol. RNA concentration was determined by absorbance at 260 nm, and its integrity confirmed by electrophoresis on 1% denaturing agarose gel. Single-stranded cDNA was synthesized from 0.5 μg of total RNA by reverse-transcription reaction with 500 U of M-MLV RT. Glucokinase relative expression was evaluated in real-time PCR with materials and methods supplied by Applied Biosystems. Twenty nanograms of cDNA was mixed with TaqMan universal PCR master mix, unlabeled PCR primers and TaqMan MGB probes (FAM dye-labeled), in a total volume of 25 μL. Forward and reverse primers sequence for *Rattus norvegicus* glucokinase were GACAAGGGCCTCTCTCAATTGGA and CTACA-CAAGGGCCTCTCTCAATT, respectively. Real-time PCR was performed on an ABI Prism 7700 Sequence Detector (Foster City, CA, USA). The samples were analyzed in triplicate and corrected for the 18S ribosomal subunit used as internal standard. Standard curves were constructed from 0.1 to 10 ng of cDNA from untreated rat islets. Relative glucokinase expression was calculated from cycle threshold (Ct) values by the abundant relative quantification model of the  $\Delta\Delta Ct$  [43].

### 2.5. Glucokinase assay

Glucokinase activity was determined as reported previously [22]. Briefly, batches of approximately 450 islets for each experimental group were isolated and cultured as described above. After 16 h of incubation, cultured media were replaced and islets were treated with either vehicle (PBS) or 1 μmol/L of d-biotin. After 6 h of incubation, islets were harvested and centrifuged at 1200 rpm. Tissue pellets were lysed in 500 μL reporter lysis buffer, vortexed and cell membranes disrupted by three freeze–thaw cycles. The lysates were then centrifuged at 4°C for 1 h at 35,000×g, in a Beckman ultracentrifuge model Optima TLX. Supernatants were recovered and enzymatic activity was assayed using NAD as coenzyme. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* was used as coupling enzyme. Correction for hexokinase activity was applied by subtracting the activity measured at 0.5 mM glucose from the activity measured at 100 mM glucose.

### 2.6. Adenosine triphosphate determination

Islets were isolated and cultured as described above. Batches of 400 islets were preincubated in PBS without glucose during 10 min, and then the PBS solution was replaced by DMEM medium with 5.5 mmol/L glucose, treated with vehicle (PBS) or 1 μmol/L of d-biotin or 1 μmol/L 8-Br-cGMP for 30 min. Islets were then washed and sonicated, and adenosine triphosphate (ATP) content determined at 30°C by following the fluorescence signal of NADPH as described previously [44] in an RF5000 U fluorophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). The excitation and emission wavelengths were 340 and 460 nm, respectively.

### 2.7. Insulin concentration assay

After 16 h of incubation, groups of 50 islets were washed with secretion buffer [22]. Then islets were incubated in DMEM medium with 5.5 mmol/L glucose, treated with vehicle (PBS), or 1 μmol/L of d-biotin or 1 μmol/L 8-Br-cGMP for 60 min. Insulin concentration in the media was analyzed using an ultrasensitive rat insulin enzyme-linked immunosorbent assay.

### 2.8. Statistical analysis

The PRISM 2.01 program (GraphPad, CA, USA) and Statview statistical analysis program v. 4.5 (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA) were used. Each result is expressed as the mean ± S.E.M. of the number of experiments indicated in the text. Data

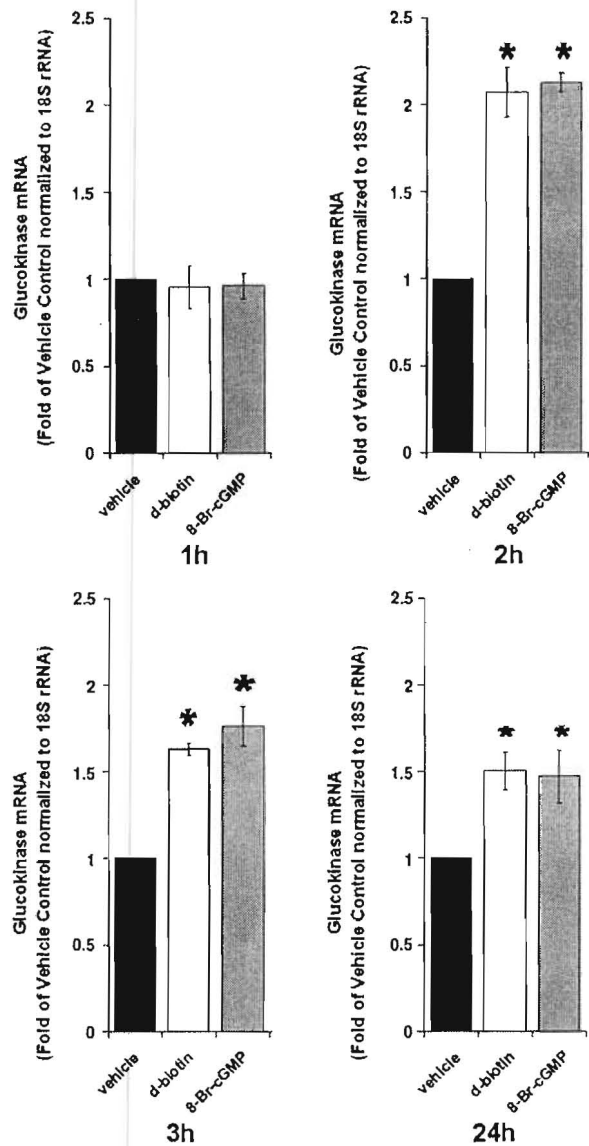


Fig. 1. Time course of the effect of either biotin or cGMP on glucokinase mRNA abundance. Islets were treated at different times in the presence of vehicle, 1  $\mu\text{mol/L}$  d-biotin or 1  $\mu\text{mol/L}$  8-Br-cGMP. Data are expressed as fold change relative to that measured in control islets. Values are represented as mean  $\pm$  S.E.M. of three independent experiments. Each time group was normalized to its vehicle control. Bars with asterisk indicate significant differences between treatments ( $P < .01$ ).

for the experiments in Figs. 1 and 2, as well as insulin concentration in the cultured media data, were analyzed using one-way ANOVA. Data presented in Table 1 and in Figs. 3–7 were tested using two-way ANOVA with interaction (treatments, inhibitors). Bonferroni correction was used for the *post hoc* detection of significant differences. Differences were considered significant at  $P < .05$ .

### 3. Results

#### 3.1. Effect of biotin and cGMP on glucokinase mRNA

We compared the effect of biotin and of the nucleotide 8-Br-cGMP on glucokinase mRNA abundance. Biotin treatment produced a onefold increase of glucokinase mRNA abundance at 2 h compared with controls ( $P < .01$ ) (Fig. 1). At 3 h, the increase was slightly reduced ( $P < .01$ ) and maintained during the 24 h of treatment ( $P < .01$ ). Incubation with 1  $\mu\text{mol/L}$  8-Br-cGMP induced increased glucokinase mRNA abundance of comparable magnitude and with similar kinetics

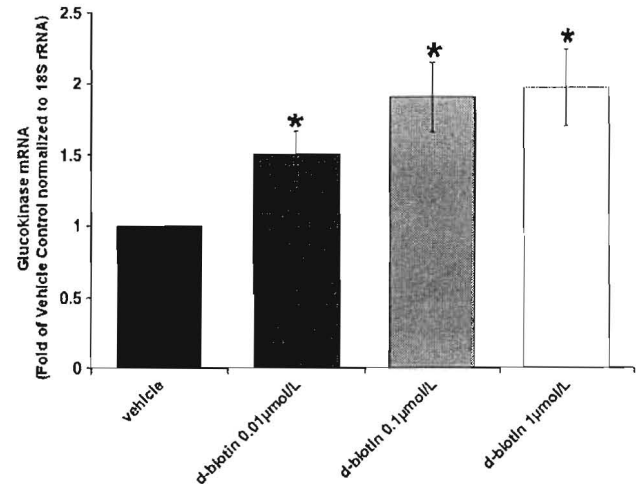


Fig. 2. Effect of different concentrations of biotin on glucokinase mRNA abundance. Islets were treated for 2 h in the presence of different concentrations of biotin. Data are expressed as fold change relative to that measured in control islets, and values are represented as mean  $\pm$  S.E.M. of four independent experiments. Bars with asterisk indicate significant differences between treatments ( $P < .01$ ).

as biotin. We also assessed the effect of different concentrations of biotin on glucokinase mRNA expression (Fig. 2). We found that glucokinase mRNA abundance increased in response to 0.01, 0.1 or 1  $\mu\text{mol/L}$  of biotin ( $P < .01$ ). The stimulatory effect of either biotin or cGMP was also observed on glucokinase activity (control:  $54.9 \pm 13$ ; biotin:  $93.7 \pm 17$ ; cGMP:  $109.9 \pm 14$  pmol/h per islet;  $n = 3$ ).

#### 3.2. Requirement of cGMP signaling

To assess the role of soluble guanylate cyclase activity in biotin signaling, we incubated pancreatic islets in a medium containing the guanylate cyclase-specific inhibitor ODQ (1-H-(1,2,4)oxadiazolo (4,3-a)quinoxalin-1-one). As shown in Table 1, the biotin response was inhibited in ODQ-treated islets, while the cGMP response was not affected ( $P < .05$ ). To investigate whether the effect of biotin occurs through PKG, we preincubated pancreatic islets in the presence of the PKG inhibitor Rp-cGMPs (Rp-8(4-chlorophenylthio)-guanosine-3'5'-cyclic monophospho thioate) before treatment with either biotin or cGMP. In the presence of 10  $\mu\text{mol/L}$  Rp-cGMPs, neither biotin nor 8-Br-cGMP induced an increase of glucokinase mRNA abundance (Table 1). Our data indicate that soluble guanylate cyclase and PKG are involved in the effects of biotin. The cascade of events downstream of PKG in biotin-mediated gene transcription is not known. We next investigated the actions that ensue guanylate cyclase/PKG activation in biotin-induced glucokinase expression.

#### 3.3. Requirement of insulin secretion

Previous reports (including our own) have reported that biotin [22,24,25] and cGMP [45,46] induce insulin secretion. Since autocrine

Table 1  
Effect of biotin and cGMP on glucokinase mRNA abundance, in the presence of inhibitors of soluble guanylate cyclase and PKG

	Without inhibitors	50 $\mu\text{mol/L}$ ODQ	10 $\mu\text{mol/L}$ Rp-cGMPs
Vehicle	1 $\pm$ 0.16	1.12 $\pm$ 0.12	1.01 $\pm$ 0.15
d-Biotin (1 $\mu\text{mol/L}$ )	2.25 $\pm$ 0.12*	1.16 $\pm$ 0.24	0.91 $\pm$ 0.26
8-Br-cGMP (1 $\mu\text{mol/L}$ )	2.06 $\pm$ 0.28*	2.27 $\pm$ 0.16*	0.97 $\pm$ 0.13

Data are expressed as fold change relative to that measured in control islets, and values represent the mean  $\pm$  S.E.M. of three independent experiments.

\* Indicates significant differences compared with vehicle ( $P < .05$ ).

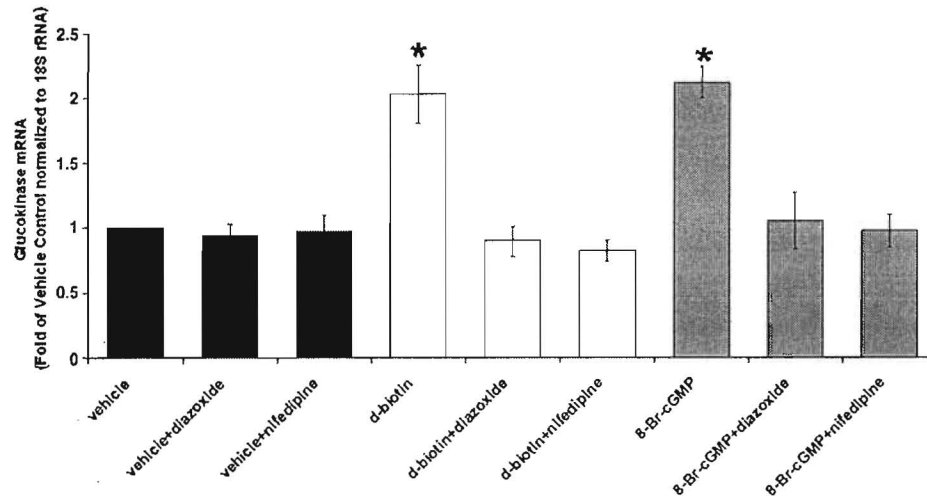


Fig. 3. Effect of either diazoxide or nifedipine on biotin- or cGMP-induced glucokinase mRNA abundance. Islets were treated with vehicle or diazoxide or nifedipine before adding either d-biotin or 8-Br-cGMP during 2 h. Data are expressed as fold change relative to that measured in control islets, and values represent the mean  $\pm$  S.E.M. of four independent experiments. Bars with asterisk indicate significant differences between treatments ( $P < .01$ ).

insulin is involved in pancreatic glucokinase expression [47] we investigated whether the effect of biotin on glucokinase mRNA abundance is mediated by an increase in insulin release. As expected, we found that after 1 h of incubation islets treated with either biotin or cGMP significantly increased ( $P < .01$ ) insulin concentration in the cultured media (control:  $0.64 \pm 0.11$  nmol/L; biotin-treated:  $1.60 \pm 0.57$  nmol/L; 8-Br-cGMP-treated:  $1.58 \pm 0.60$  nmol/L;  $n = 3$ ). Inhibitors of insulin secretion prevented biotin-stimulated glucokinase mRNA increase. Islets pretreated with diazoxide, an ATP-sensitive  $K^+$  channel opener, did not increase glucokinase mRNA abundance in response to either biotin or 8-Br-cGMP at 2 h (Fig. 3). We also investigated the effect of nifedipine, an L-type voltage-operated calcium channel blocker (Fig. 3). The results showed that islets treated with biotin increased glucokinase mRNA abundance; however, no effect of biotin or cGMP on glucokinase mRNA expression was observed on nifedipine-incubated islets (Fig. 3). Neither diazoxide nor nifedipine modified basal glucokinase mRNA abundance in islets incubated with vehicle at 2 h.

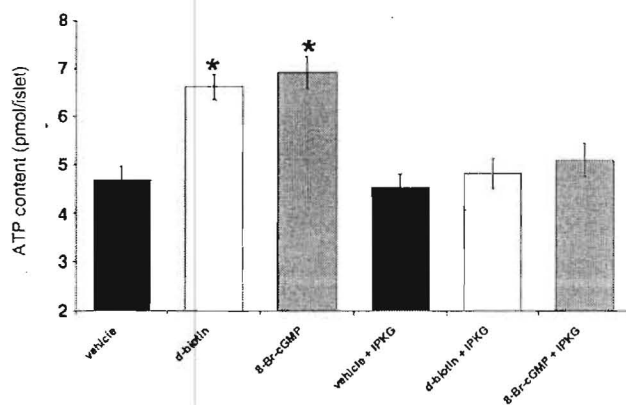


Fig. 4. Effect of either biotin or cGMP on ATP content, in the presence or absence of PKG inhibitor. Islets were treated with either serum (vehicle) or PKG inhibitor for 30 min before addition of d-biotin or 8-Br-cGMP. ATP content was determined after 30 min of incubation. Values represent the mean  $\pm$  S.E.M. of five independent experiments. Bars with asterisk indicate significant differences between treatments.  $P$  values: biotin = .0006; cGMP = .0001.

### 3.4. Adenosine triphosphate content

The classic stimulus-secretion coupling pathway that mediates glucose-induced insulin secretion involves an increase in ATP production [48]. Hence, we evaluated whether the treatment with biotin modified ATP content. Results showed that after 30 min of incubation biotin treatment significantly increased ( $P = .01$ ) ATP content (Fig. 4); a similar response was observed in response to cGMP ( $P < .01$ ).

To assess whether biotin activation of the cGMP/PKG signalling pathway leads to an increase in ATP content, we preincubated pancreatic islets in the presence of the PKG inhibitor Rp-cGMPS before treatment with either biotin or cGMP. Inhibition of PKG activity prevented the increase in ATP content in response to both biotin and cGMP treatment (Fig. 4).

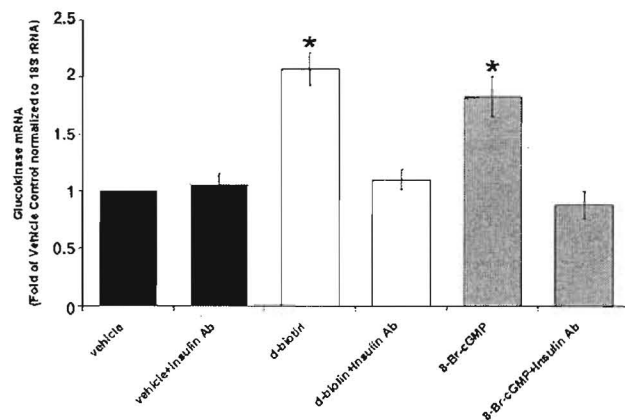


Fig. 5. Effect of insulin neutralization in culture media on either biotin- or cGMP-induced glucokinase mRNA abundance. Islets were treated with either serum (vehicle) or anti-insulin serum during 30 min before adding either d-biotin or 8-Br-cGMP during 2 h. Data are expressed as fold change relative to that measured in control islets, and values represent the mean  $\pm$  S.E.M. of three independent experiments. Bars with asterisk indicate significant differences between treatments.  $P$  values: biotin = .0163; cGMP = .032.

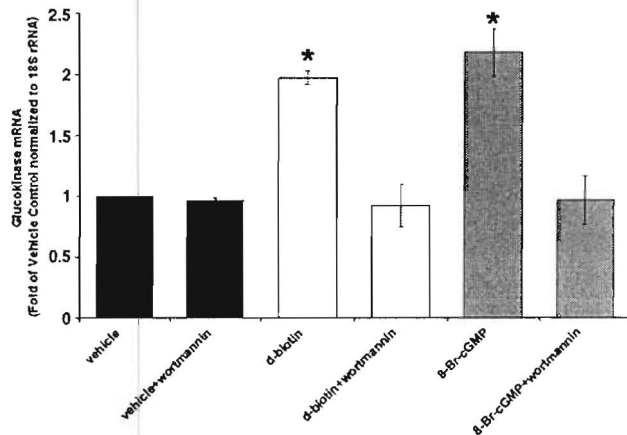


Fig. 6. Effect of phosphoinositol-3 kinase activity inhibition on either biotin- or cGMP-induced glucokinase mRNA abundance. Islets were treated with either vehicle (PBS) or wortmannin during 30 min before either d-biotin or 8-Br-cGMP was added to the cultures for 2 h. Data are expressed as fold change relative to that measured in control islets. The values represent the mean  $\pm$  S.E.M. of four independent experiments. Bars with asterisk indicate significant differences between treatments ( $P < .01$ ).

### 3.5. Requirement of autocrine action of insulin

Insulin antibodies added to the culture media inhibited the response to biotin (Fig. 5). Similarly, insulin antibodies suppressed the stimulatory effect of cGMP on glucokinase mRNA abundance (Fig. 5). We next assessed the role of insulin signalling in biotin-induced glucokinase. Pancreatic islets cultured in the presence of 100 mmol/L wortmannin, a phosphoinositol-3 kinase activity inhibitor, did not increase glucokinase mRNA abundance in response to either biotin or cGMP treatment (Fig. 6). We also analyzed the involvement of the serine/threonine kinase PKB/Akt activity in biotin-induced glucokinase mRNA. Islets treated with either biotin or 8-Br-cGMP increased glucokinase mRNA abundance; however, inhibition of PKB/Akt activity prevented the induction of glucokinase mRNA (Fig. 7).

## 4. Discussion

The molecular mechanisms by which biotin regulates gene expression are largely unknown. Biotin increases pancreatic glucoki-

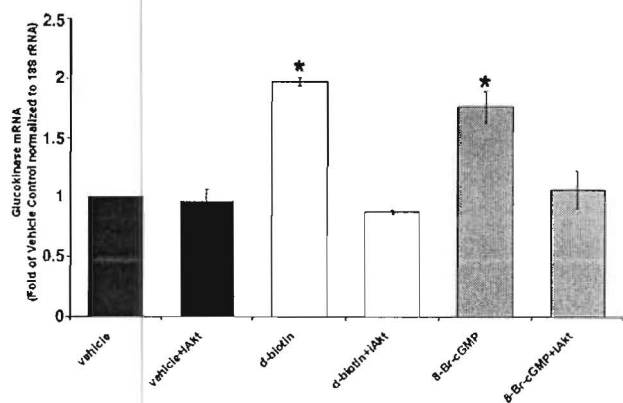


Fig. 7. Effect of PKB/Akt inhibition on either biotin- or cGMP-induced glucokinase mRNA abundance. Islets were preincubated with either vehicle (PBS) or with PKB/Akt inhibitor during 30 min before treatment either d-biotin or 8-Br-cGMP, for 2 h. Data are expressed as fold change relative to that measured in control islets, and values represent the mean  $\pm$  S.E.M. of three independent experiments. Bars with asterisk indicate significant differences between treatments ( $P < .01$ ).

nase activity and mRNA abundance, as reported previously [22]. In this study, we explored the mechanisms involved in biotin-induced glucokinase gene expression.

We found that activation of guanylate cyclase and PKG is part of the signalling involved in the stimulatory effect of biotin on pancreatic glucokinase expression. This mechanism is similar to the one involved in posttranscriptional regulation of proteins such as asialoglycoprotein and insulin receptor [39], as well as in mRNA expression of holocarboxylase synthetase (EC 6.3.4.10) [40], carboxylases [40,49] or sodium-dependent multivitamin transporter [50]. Interestingly, Spence and Koudelka [41] found that the effect of biotin on hepatic glucokinase activity was preceded by an increase in cGMP intracellular concentration. Although the involvement of soluble guanylate cyclase and PKG was not demonstrated in the mentioned studies, the increase in cyclic nucleotide suggests that this signalling pathway may also participate in biotin-induced hepatic glucokinase activity.

The cascade of events that follow guanylate cyclase/PKG activity in biotin-mediated gene transcription is unknown. We found that insulin secretion is required in biotin-induced glucokinase expression: inhibition of insulin secretion by preventing the closure of ATP-sensitive  $K^+$  channels with diazoxide or by blocking L-type voltage-activated  $Ca^{2+}$  channels abolished biotin-induced effects on pancreatic glucokinase expression (Fig. 3). We also showed that either biotin or 8-Br-cGMP increased ATP content (Fig. 4). The observed increase in ATP is consistent with observations indicating that biotin and cGMP augment the production of this nucleotide as well as glucose utilization. In RINm5F insulinoma cells, Laychock et al. [45,46] found that 8-Br-cGMP increases glucose utilization in isolated pancreatic islets. In islets stimulated with biotin, Sone et al. [51] found that biotin increases ATP and  $CO_2$  production and that the glucose oxidation rate was proportional to the effects observed in insulin secretion. They also found in liver mitochondria that the state-3 respiratory rate increased in response to biotin [51]. Since the classic stimulus-secretion coupling pathway that mediates glucose-induced insulin release

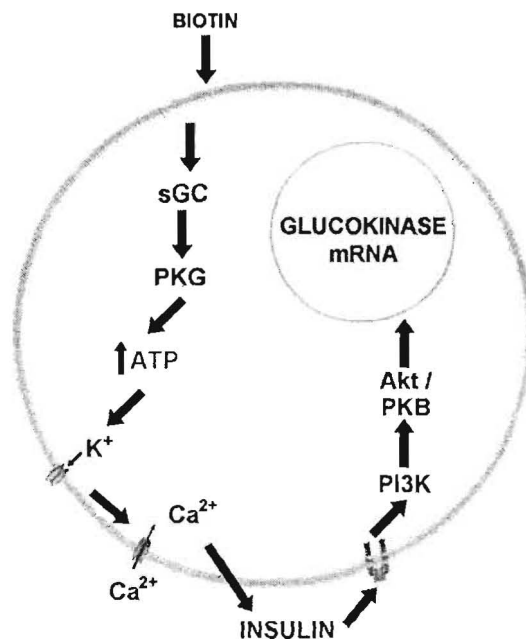


Fig. 8. Proposed model of the pathways involved in biotin-induced pancreatic glucokinase expression. We propose that the induction of pancreatic glucokinase mRNA by biotin involves guanylate cyclase and PKG activation, which leads to an increase in ATP content. This induces insulin secretion via ATP-sensitive potassium channels. Autocrine insulin, in turn, activates phosphoinositol-3-kinase/Akt signalling.

involves the closure of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel as a result of the enhanced ATP/ADP ratio generated by glucose oxidation [48], these studies [45,51] and our present results suggest that the effect of biotin on islets involves insulin secretion, mediated by increased glucose oxidation rates that in turn enhance ATP production.

The molecular mechanism involved in the effect of biotin on ATP content has not been determined. We showed that PKG activity is indispensable to increase ATP content in response to either biotin or cGMP (Fig. 4). These results demonstrate for the first time that biotin participates in fuel metabolism via cGMP/PKG signalling.

Our results also indicate that biotin-induced glucokinase expression requires autocrine insulin signalling and PI3K/Akt signalling. We found that the effect of biotin on treated islets was suppressed by (a) neutralization of insulin secreted with insulin antibodies added to the culture medium (Fig. 5); (b) inhibition of phosphoinositol-3 kinase activity (Fig. 6); and (c) inhibition of PKB/Akt activity (Fig. 7). Consistent with our findings, studies by Leibiger et al. [47] found that autocrine insulin signalling activates the transcription of pancreatic glucokinase through the activation of the B-type insulin receptor, phosphoinositol-3 kinase class II-like activity and PKB/Akt activity [47]. Recent investigations provide evidence that autocrine insulin is used as a signalling pathway in several processes that include gene transcription, translation, calcium flux, and insulin secretion [52–54], survival of isolated islets [53,55] and suppression of a constitutive apoptotic program in beta cells [56]. The effect of pharmacological concentrations of biotin on autocrine insulin action suggests that the vitamin may be of therapeutic importance in the first stages of type 1 diabetes and in the culturing and preservation of islets prior to transplantation.

To our knowledge, two studies have explored which cGMP target proteins mediate the effect of biotin: De la Vega and Stockert [38,39] have pinpointed that biotin, via soluble guanylate cyclase activity and PKG, increases phosphorylation of alpha-COP, a protein of the COPI trans-acting complex factor that regulates translation and participates in asialoglycoprotein receptor and insulin-receptor translation [39]. In HepG-2 cells, biotin deficiency increased the abundance of proteins involved in tyrosine kinase-mediated signalling [57]. However, this study did not demonstrate whether the increased abundance of tyrosine kinase cascade proteins actually mediates biotin signalling. The design of the present study, using blockers and inhibitors of different pathways, allowed us to identify proteins whose activity is involved in biotin signalling. Nonetheless, this approach possesses some limitations given that inhibitors may lack specificity. Also, our studies cannot rule out the possibility that, along with the events described herein, increased translation of insulin receptor [39] may account for the effect of biotin on pancreatic glucokinase expression. Further studies will be designed to generate additional insights into biotin-dependent cell signalling.

In Fig. 8, we depict our findings on the effect of biotin on glucokinase expression. We propose that biotin signalling involves guanylate cyclase/PKG activation, which triggers ATP production. The increase of ATP induces insulin secretion via ATP-sensitive potassium channels. Insulin, in turn, activates PI3K/Akt signalling, which increases pancreatic glucokinase mRNA expression.

Farsighted observations of Dakshinamurti [18,19,58] in 1968/1970 suggested that biotin possesses insulin-like effects. In our work, we demonstrated that insulin secretion and insulin-receptor tyrosine kinase PI3K/Akt signalling are involved in the effects of biotin. This finding, along with studies by De la Vega and Stockert [39] showing that biotin increases insulin receptor translation, lends molecular support to the insulin-like effects of biotin [19].

The reference dietary intake (RDI) of biotin for adults is 30 µg/day [59]. Several studies have demonstrated that biotin deficiency affects glucose metabolism [18,19,22,24,25], indicating that biotin dietary intake is required to maintain glucose homeostasis. On the other

hand, pharmacological doses of biotin (milligrams) favor glucose homeostasis [26–30] and are currently used in the treatment of diabetes [31,32]. Pharmacologic supplementation of biotin of 40× the RDI (i.e., 1.2 mg/day) for 14 days reaches serum concentrations in a range of 9.4–47.7 nmol/L [60]. Present and previous results [22] show that these concentrations increase both glucokinase activity and mRNA abundance in cultured islets. How biotin-induced pancreatic glucokinase contributes to glucose homeostasis in diabetic models is currently being investigated in our laboratory.

Knowledge of the molecular mechanisms of different vitamins has opened new perspectives that form a connection between nutritional signals and biological functions. The best documented examples are those involving the lipophilic vitamins A and D. Extensive research on these vitamins has pointed to the broad spectrum of actions in which they participate and has made it possible to develop new therapeutic agents [61,63] against numerous diseases including diabetes [62,63]. In contrast, the study of the biological effects of biotin has been scarcely studied. Understanding the mechanisms of action of biotin is essential to determine its use as a therapeutic agent in the battle against diabetes, a major global health problem. The present report contributes to the understanding of the biotin signalling pathways that participate in gene transcription and in glucose metabolism.

#### Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. Eulises Díaz (National Institute of Nutrition Salvador Zubirán, Mexico City) for providing anti-insulin antibodies and to Dr. Sumiko Morimoto for technical assistance. We are indebted to Dr. Marco Antonio Cerbón for valuable discussions throughout these studies and to Dr. Antonio Velázquez, Dr. Martha Perez-Armendariz and Dr. Albert Zlotnik for critical reading of this manuscript. We also thank Isabel Pérez Montfort for correcting the English version of the manuscript.

#### References

- [1] Balmer JE, Blomhoff R. Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res* 2002;43:1773–808.
- [2] Carlberg C. Lipid soluble vitamins in gene regulation. *Biofactors* 1999;10:91–7.
- [3] Christakos S, Dhawan P, Liu Y, Peng X, Porta A. New insights into the mechanisms of vitamin D action. *J Cell Biochem* 2003;1:695–705.
- [4] Rucker RB, Wold F. Cofactors in and as posttranslational protein modifications. *FASEB J* 1988;2:2252–61.
- [5] Brandsch R. Regulation of gene expression by cofactors derived from B vitamins. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 1994;40:371–99.
- [6] Rodríguez-Melendez R, Zemleni J. Regulation of gene expression by biotin (review). *J Nutr Biochem* 2003;14:680–90.
- [7] Tully DB, Allgood VE, Cidlowski JA. Modulation of steroid receptor-mediated gene expression by vitamin B6. *FASEB J* 1994;1:343–9.
- [8] Zemleni J. Uptake, localization, and noncarboxylase roles of biotin. *Annu Rev Nutr* 2005;25:175–96.
- [9] Vilches-Flores A, Fernandez-Mejia C. Effect of biotin upon gene expression and metabolism. *Rev Invest Clin* 2005;57:716–24.
- [10] Watanabe T. Morphological and biochemical effects of excessive amounts of biotin on embryonic development in mice. *Experientia* 1996;15(52):149–54.
- [11] Watanabe T, Endo A. Teratogenic effects of maternal biotin deficiency on mouse embryos examined at midgestation. *Teratology* 1990;42:295–300.
- [12] Baez-Saldana A, Diaz G, Espinoza B, Ortega E. Biotin deficiency induces changes in subpopulations of spleen lymphocytes in mice. *Am J Clin Nutr* 1998;67:431–7.
- [13] Baez-Saldana A, Ortega E. Biotin deficiency blocks thymocyte maturation, accelerates thymus involution, and decreases nose-rump length in mice. *J Nutr* 2004;134:1970–7.
- [14] Dakshinamurti K. Biotin: a regulator of gene expression. *J Nutr Biochem* 2005;16:419–23.
- [15] Fernandez-Mejia C. Pharmacological effects of biotin. *J Nutr Biochem* 2005;16:424–7.
- [16] Rodríguez-Melendez R, Griffin JB, Zemleni 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;17:23–30.
- [17] Wiedmann S, Rodríguez-Melendez R, Ortega-Cuellar D, Zemleni J. Clusters of biotin-responsive genes in human peripheral blood mononuclear cells. *J Nutr Biochem* 2004;15:433–9.

- [18] Dakshinamurti K, Modi VV, Mistry SP. Some aspects of carbohydrates metabolism in biotin-deficient rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1968;127:396–400.
- [19] Dakshinamurti K, Cheah-Tan C. Biotin-mediated synthesis of hepatic glucokinase in the rat. *Arch Biochem Biophys* 1968;127:17–21.
- [20] Chauhan J, Dakshinamurti K. Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats. *J Biol Chem* 1991;266:10035–8.
- [21] Dakshinamurti K, Li W. Transcriptional regulation of liver phosphoenolpyruvate carboxykinase by biotin in diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 1994;132:127–32.
- [22] Romero-Navarro G, Cabrera-Valladares G, German MS, Matschinsky FM, Velazquez A, Wang J, et al. Biotin regulation of pancreatic glucokinase and insulin in primary cultured rat islets and in biotin-deficient rats. *Endocrinology* 1999;140:4595–600.
- [23] Matschinsky FM. Regulation of pancreatic beta-cell glucokinase: from basics to therapeutics. *Diabetes* 2002;51(Suppl 3):S394–404.
- [24] 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;64:550–4.
- [25] 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;10:237–43.
- [26] 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;42:1323–30.
- [27] Zhang H, Osada K, Sone H, Furukawa Y. Biotin administration improves the impaired glucose tolerance of streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 1997;43:271–80.
- [28] Coggeshall JC, Hegggers JP, Robson MC, Beker H. Biotin status and plasma glucose levels in diabetics. *Ann NY Acad Sci* 1985;447:389–92.
- [29] 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;14:211–8.
- [30] Koustikos D, Fpourtounas K, Kapetanaki A, Agroyannis B, Tzantos H, Rammos G, et al. Oral glucose test after high-dose i.v. biotin administration in normoglycemic hemodialysis patients. *Ren Fail* 1966;18:131–7.
- [31] Albarracin C, Fuqua B, Geohas J, Finch M, Komorowski JR. Improvement in glycemic control, lipids and insulin sensitivity with the combination of chromium picolinate and biotin in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes* 2005;54:A428.
- [32] 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* 2006;8:636–43.
- [33] Camporeale G, Giordano E, Rendina R, Zemleni J, Eissenberg JC. Drosophila melanogaster holocarboxylase synthetase is a chromosomal protein required for normal histone biotinylation, gene transcription patterns, lifespan, and heat tolerance. *J Nutr* 2006;136:2735–42.
- [34] Kothapalli N, Camporeale G, Kueh A, Chew YC, Oommen AM, Griffin JB, et al. Biological functions of biotinylated histones. *J Nutr Biochem* 2005;16:446–8.
- [35] Narang MA, Dumas R, Ayer LM, Gravel RA. Reduced histone biotinylation in multiple carboxylase deficiency patients: a nuclear role for holocarboxylase synthetase. *Hum Mol Genet* 2004;13:15–23.
- [36] Peters DM, Griffin JB, Stanley JS, Beck MM, Zemleni J. Exposure to UV light causes increased biotinylation of histones in Jurkat cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;283:C878–84.
- [37] Stanley JS, Griffin JB, Zemleni J. Biotinylation of histones in human cells. Effects of cell proliferation. *Eur J Biochem* 2001;268:5424–9.
- [38] De La Vega LA, Stockert RJ. The cytoplasmic coatomer protein COPI. A potential translational regulator. *J Biol Chem* 1999;274:31135–8.
- [39] De La Vega LA, Stockert RJ. Regulation of the insulin and asialoglycoprotein receptors via cGMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;279:C2037–42.
- [40] Solorzano-Vargas RS, 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;99:5325–30.
- [41] Spence JT, Koudelka AP. Effects of biotin upon the intracellular level of cGMP and the activity of glucokinase in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1984;259:6393–6.
- [42] Vesely DL. Biotin enhances guanylate cyclase activity. *Science* 1982;216:1329–30.
- [43] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402–8.
- [44] Marin-Hernandez A, Rodriguez-Enriquez S, Vital-Gonzalez PA, Flores-Rodriguez FL, Macias-Silva M, Sosa-Garrocho M, et al. Determining and understanding the control of glycolysis in fast-growth tumor cells. Flux control by an over-expressed but strongly product-inhibited hexokinase. *FEBS J* 2006;273:1975–88.
- [45] Laychock SG. Effects of guanosine 3',5'-monophosphate on glucose utilization in isolated islets of Langerhans. *Endocrinology* 1987;120:517–24.
- [46] Laychock SG, Modica ME, Cavanaugh CT. L-Arginine stimulates cyclic guanosine 3',5'-monophosphate formation in rat islets of Langerhans and RINm5F insulinoma cells: evidence for L-arginine:nitric oxide synthase. *Endocrinology* 1991;129:3043–52.
- [47] Leibiger B, Leibiger IB, Moede T, Kemper S, Kulkarni RN, Kahn CR, et al. Selective insulin signaling through A and B insulin receptors regulates transcription of insulin and glucokinase genes in pancreatic beta cells. *Mol Cell* 2001;7:559–70.
- [48] Ashcroft FM, Rorsman P. ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels: a link between B-cell metabolism and insulin secretion. *Biochem Soc Trans* 1990;18:109–11.
- [49] Pacheco-Alvarez D, Solorzano-Vargas RS, Gravel RA, Cervantes-Roldan R, Velazquez A, Leon-Del-Rio A. Paradoxical regulation of biotin utilization in brain and liver and implications for inherited multiple carboxylase deficiency. *J Biol Chem* 2004;279:52312–8.
- [50] Pacheco-Alvarez D, Solorzano-Vargas RS, Gonzalez-Noriega A, Michalak C, Zemleni 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;5:301–7.
- [51] Sone H, Sasaki Y, Komai M, Toyomizu M, Kagawa Y, Furukawa Y. Biotin enhances ATP synthesis in pancreatic islets of the rat, resulting in reinforcement of glucose-induced insulin secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;314:824–9.
- [52] Uhles S, Moede T, Leibiger B, Berggren PO, Leibiger IB. Selective gene activation by spatial segregation of insulin receptor B signaling. *FASEB J* 2007;21:1609–21.
- [53] Aikin R, Hanley S, Maysinger D, Lipsett M, Castellarin M, Paraskevas S, et al. Autocrine insulin action activates Akt and increases survival of isolated human islets. *Diabetologia* 2006;49:2900–9.
- [54] Leibiger IB, Leibiger B, Berggren PO. Insulin feedback action on pancreatic beta-cell function. *FEBS Lett* 2002;532:1–6.
- [55] Navarro-Tableros V, Sanchez-Soto MC, Garcia S, Hiriart M. Autocrine regulation of single pancreatic beta-cell survival. *Diabetes* 2004;53:2018–23.
- [56] Hoorens A, Van de Castele M, Kloppel G, Pipeleers D. Glucose promotes survival of rat pancreatic beta cells by activating synthesis of proteins which suppress a constitutive apoptotic program. *J Clin Invest* 1996;98:1568–74.
- [57] Rodriguez-Melendez R, Griffin JB, Sarath G, Zemleni J. High-throughput immunoblotting identifies biotin-dependent signaling proteins in HepG2 hepatocarcinoma cells. *J Nutr* 2005;135:1659–66.
- [58] Dakshinamurti K, Tarrago-Litvak L, Hong HC. Biotin and glucose metabolism. *Can J Biochem* 1970;48:493–500.
- [59] Food and Nutrition Board, Institute of Medicine: Dietary reference intakes for Thiamine, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Panthothenic acid, Biotin and Choline. Washington DC: National Academic Press; 1998. p. 374–89.
- [60] Mock DM, Mock NI. Serum concentrations of bisnorbiotin and biotin sulfoxide increase during both acute and chronic biotin supplementation. *J Lab Clin Med* 1997;129:384–8.
- [61] Hinds TS, West WL, Knight EM. Carotenoids and retinoids: a review of research, clinical, and public health applications. *J Clin Pharmacol* 1997;37:551–8.
- [62] Liu YL, Sennitt MV, Hislop DC, Crombie DL, Heyman RA, Cawthorne MA. Reginoid X receptor have anti-obesity effects and improve insulin sensitivity in Zucker fa/fa rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000;24:997–1004.
- [63] Mukherjee R, Davies PJ, Crombie DL, Bischoff ED, Cesario RM, Jow L, Hamann LG, Boehm MF, Mondon CE, et al. Sensitization of diabetic and obese mice to insulin by retinoid X receptor agonists. *Nature* 1997;386:407–10.