

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**“EFECTOS DE LA SUPLEMENTACIÓN CON
BIOTINA SOBRE EL ISLOTE PANCREÁTICO”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO
DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

P R E S E N T A

Q. F. B. MARIA LUISA LAZO DE LA VEGA MONROY

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARIA CRISTINA FERNÁNDEZ MEJÍA

MÉXICO, D.F

2012

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis fue dirigida por:

Dra. María Cristina Fernández Mejía

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental

Instituto de Investigaciones Biomédicas

UNAM

Y bajo la co-tutoría de:

Dra. Elia Martha Pérez Armendáriz

Departamento de Medicina Experimental

Facultad de Medicina

UNAM

Dr. Armando Tovar Palacio

Departamento de Fisiología de la Nutrición

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

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

Parte del trabajo se realizó con la colaboración del Dr. Michael S. German del Diabetes
Center/Center of Regeneration Medicine and Stem Cell Research,
University of California San Francisco, USA

Se reconoce la colaboración y asesoría de la Dra. Elena Larrieta Carrasco y la
Dra. Armida Báez Saldaña en la realización del presente estudio

Se agradece el apoyo técnico de:

M. en C. Alberto Rojas Ochoa, L.N. Lilian Esparza Rosales y Biol. Maura Flores Aguilar,
Unidad de Genética de la Nutrición del Instituto de Investigaciones Biomédicas

Personal del laboratorio del Dr. Michael German
Diabetes Center/Center of Regeneration Medicine and Stem Cell Research,
University of California San Francisco, USA

Nuestro agradecimiento también al Dr. Gerold Grodsky y al Dr. Silvestre Frenk,
por sus valiosos comentarios respecto a este trabajo

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

Consejo Nacional de la Ciencia y la Tecnología (CONACYT)

CVU/becario: 217876/207055

Proyecto 44266-M

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

Proyecto IN220908

Proyecto 214811

University of California Institute for Mexico and the United States (UC-MEXUS)

Proyecto CNO7-87

Proyecto EBC/433/CFM

ÍNDICE

A. RESUMEN	10
B. ABSTRACT.....	12
C. ABREVIATURAS	13
D. INTRODUCCIÓN.....	16
<i>D.1. El Páncreas</i>	<i>17</i>
<i>D.2. Los islotes pancreáticos.....</i>	<i>18</i>
D.2.1 Composición de los islotes pancreáticos	18
D.2.2 Arquitectura de los islotes pancreáticos.....	18
<i>D.3. Las células beta y la secreción de insulina</i>	<i>19</i>
D.3.1 La insulina.....	20
D.3.1.1 Estructura de la insulina	20
D.3.1.2 Síntesis y procesamiento de la insulina	21
D.3.1.3 Transcripción de la insulina y su regulación.....	22
D.3.2 La secreción de insulina.....	23
D.3.2.1 Primera fase de secreción de insulina: la vía de disparo.....	24
D.3.2.2 Segunda fase de secreción de insulina: la vía de amplificación	25
D.3.3 Factores de acoplamiento metabólico y la secreción de insulina en respuesta a glucosa	26
D.3.3.1 Modulación de la secreción de insulina por nutrientes	27
D.3.3.2 Modulación de la secreción de insulina por hormonas y neurotransmisores.....	28
D.3.4 Masa de las células beta	28
<i>D.4. Acciones metabólicas de la insulina</i>	<i>29</i>
D.4.1 Mecanismos moleculares de la señalización de la insulina	29
<i>D.6. Diabetes mellitus</i>	<i>30</i>
D.6.1 Epidemiología y clasificación de la diabetes	30
D.6.2 Resistencia a insulina y falla de la célula beta en la diabetes mellitus	31
D.6.2.1 Diabetes MODY	31
D.6.2.2 Diabetes mellitus tipo 1	33
D.6.2.3 Diabetes mellitus tipo 2	33
<i>D.7. La Biotina</i>	<i>36</i>
D.7.1 Características fisicoquímicas	36
D.7.2 Metabolismo y farmacocinética	36

D.7.2.1 Digestión y absorción	37
D.7.2.2 Absorción de biotina en los tejidos.....	37
D.7.2.3 Transporte de biotina intracelular	38
D.7.3 Funciones de la biotina	38
D.7.4 Catabolismo de la biotina	40
D.7.5 Requerimientos de biotina y deficiencia de biotina.....	41
D.7.6 Toxicidad de la biotina.....	42
<i>D.8. Efectos de la suplementación con biotina.....</i>	<i>42</i>
D.8.1 Efectos de la suplementación con biotina sobre la expresión de genes	42
D.8.2 Efectos de la suplementación con biotina sobre la secreción de insulina	43
D.8.3 Efectos de la suplementación con biotina en diabetes	43
E. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E IMPACTO DEL TRABAJO	45
F. HIPOTESIS	47
G. OBJETIVO GENERAL	47
H. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
I. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	48
J. MATERIAL Y MÉTODOS	49
<i>J.1. Modelo animal</i>	<i>49</i>
<i>J.2. Medición de biotina en suero</i>	<i>49</i>
<i>J.3. Medición de glucosa en sangre.....</i>	<i>50</i>
<i>J.4. Medición de insulina en plasma</i>	<i>50</i>
<i>J.5. Curvas de tolerancia a la glucosa y secreción de insulina</i>	<i>50</i>
<i>J.6. Curvas de tolerancia a la insulina.....</i>	<i>51</i>
<i>J.7. Aislamiento de islotes pancreáticos</i>	<i>51</i>
<i>J.8. Medición de la secreción estática de insulina</i>	<i>51</i>
<i>J.9. Medición de expresión relativa de mRNA.....</i>	<i>51</i>
<i>J.10. Inmunohistoquímica y análisis morfométricos</i>	<i>52</i>
<i>J.11. Medición de la actividad de Piruvato carboxilasa.....</i>	<i>53</i>
<i>J.12. Análisis de crecimiento y proliferación celular</i>	<i>54</i>

<i>J.13. Análisis estadístico</i>	<i>55</i>
K. RESULTADOS.....	56
<i>K.1. Efectos de la suplementación con biotina sobre la ingesta de alimento, el consumo de biotina y las concentraciones de biotina en sangre</i>	<i>56</i>
<i>K.2. Efectos de la suplementación con biotina sobre la secreción estática de insulina</i>	<i>57</i>
<i>K.3. Perfil de expresión de genes de la función de la célula beta en respuesta a la suplementación con biotina</i>	<i>58</i>
K.3.1 Genes que participan en la secreción de insulina	58
K.3.2 Factores transcripcionales que regulan la maquinaria de síntesis y secreción de insulina	59
<i>K.4. Efectos de la suplementación con biotina sobre la homeostasis de la glucosa y la secreción de insulina in vivo.....</i>	<i>60</i>
<i>K.5. Efectos de la suplementación con biotina sobre la masa de las células beta y alfa y la morfología del islote pancreático</i>	<i>63</i>
<i>K.6. Efectos de la suplementación con biotina sobre la proliferación celular.....</i>	<i>65</i>
<i>K.7. Efectos de la suplementación con biotina sobre la arquitectura del islote pancreático.....</i>	<i>69</i>
<i>K.8. Efectos de la suplementación con biotina sobre la demanda metabólica de insulina</i>	<i>70</i>
<i>K.9. Efectos de la suplementación con biotina sobre la piruvato carboxilasa.....</i>	<i>72</i>
<i>K.10. Efectos de la suplementación con biotina sobre la expresión de moléculas de adhesión .</i>	<i>73</i>
L. DISCUSIÓN.....	74
M. CONCLUSIONES	80
N. REFERENCIAS.....	82

ANEXOS

- I. Lazo-de-la-Vega-Monroy, M.L. & Fernandez-Mejia, C. Transcription factors in the adult beta cell. *Rev Invest Clin* 61, 428-46 (2009).
- II. Fernandez-Mejia, C., Lazo-de-la-Vega-Monroy, M.L. Biological effects of pharmacological concentrations of biotin. *JEBCAM*, 16 (1), 40-48 (2011).
- III. Lazo-de-la-Vega-Monroy, M.L., German, M.S., Larrieta, E., Baez-Saldana, A., Fernandez-Mejia, C. Pharmacological concentrations of biotin in the diet enhance beta-cell function and mass. *Journal of Nutritional Biochemistry*. En prensa (2012).

Otras Publicaciones

- IV. Larrieta, E., Velasco, F., Vital, P., López-Aceves, T. Lazo-de-la-Vega-Monroy, M.L., Rojas, A., Fernandez-Mejia, C. Pharmacological concentrations of biotin reduce serum triglycerides and the expression of lipogenic genes. *Eur J Pharmacol* 644, 263-8 (2010).
- V. Larrieta, E., Lazo-de-la-Vega, M.L., Vital, P., Aguilera, A., German, M.S., El-Hafidi, M., Fernandez-Mejia, C. Effects of biotin deficiency on pancreatic islet morphology, insulin sensitivity and glucose homeostasis. *Journal of Nutritional Biochemistry* 23, 329-299 (2012).
- VI. Lazo-de-la-Vega-Monroy, M.L. & Fernandez-Mejia, C. Bases moleculares de la diabetes tipo 2. En *Diabetes 1ª y 2ª ed.* (eds. Morales-González, J.A., García-Domínguez, B.A., Madrigal-Santillán, E.O. & Ramírez-Farías, C.) (Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca, Hidalgo, México., 2008).
- VII. Lazo-de-la-Vega-Monroy, M.L. & Fernandez-Mejia, C. Bases moleculares de la obesidad. En *Obesidad. Un enfoque multidisciplinario.* (ed. Morales-González, J.A.) (Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca, Hidalgo, México., 2010).
- VIII. Fernandez-Mejia, C. & Lazo-de-la-Vega-Monroy, M.L. Glucokinase as a target for the development of novel therapeutics for diabetes. En *Advances in obesity-diabetes research at UNAM* (eds. Hiriart-Urdanivia, M. & Mas-Oliva, J.) (PUIS, UNAM, Manual Moderno, Mexico City, Mexico, 2010).
- IX. Lazo-de-la-Vega-Monroy, M.L. & Fernandez-Mejia, C. Beta Cell Function and Failure in Type 1 Diabetes. En *Type 1 Diabetes/Book 1* (ed. David H. Wagner, Jr) (INTECH Open Access Publisher, 2011).
- X. Composición de la dieta. Tomado de Baez-Saldana, A. & Ortega, E. Biotin deficiency blocks thymocyte maturation, accelerates thymus involution, and decreases nose-rump length in mice. *J Nutr* 134, 1970-7 (2004).

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Regulación del metabolismo por mensajes hormonales.....	17
Figura 2. El páncreas y la composición del islote pancreático.....	19
Figura 3. Diferencias en la arquitectura de los islotes pancreáticos de ratón y humano. .	19
Figura 4. Estructura covalente de la proinsulina humana.	20
Figura 5. Síntesis y procesamiento de la insulina.....	22
Figura 6. Regulación transcripcional del gen de la insulina.	23
Figura 7. Mecanismos de la secreción bifásica de insulina en respuesta a glucosa.	26
Figura 8. Regulación de la secreción de insulina en respuesta a glucosa por nutrientes, hormonas y neurotransmisores.....	27
Figura 9. Mecanismos moleculares de la señalización de la insulina.	30
Figura 10. Transporte y metabolismo de la biotina.....	39
Figura 11. Las carboxilasas en el metabolismo de glucosa, lípidos y proteínas	40
Figura 12. La suplementación con biotina en la dieta incrementa la concentración de biotina en suero.	56
Figura 13. La suplementación con biotina en la dieta incrementa la secreción de insulina.	57
Figura 14. La suplementación con biotina incrementa la expresión de genes que participan en la secreción de insulina.....	58
Figura 15. La suplementación con biotina incrementa la expresión de factores transcripcionales de la célula beta.	59
Figura 16. La suplementación con biotina no modifica la glucosa ni la insulina en sangre.	60
Figura 17. La suplementación con biotina mejora la tolerancia a la glucosa.	61
Figura 18. La suplementación con biotina no modifica la sensibilidad a la insulina.	62
Figura 19. La suplementación con biotina incrementa la secreción de insulina en respuesta a la administración de glucosa.	62

Figura 20. La suplementación con biotina incrementa la masa total de células alfa y beta.	63
Figura 21. La suplementación con biotina no modifica el número ni la composición de islotes pancreáticos.	64
Figura 22. La suplementación con biotina incrementa la masa de las células beta por un aumento en el tamaño de los islotes pancreáticos.	65
Figura 23. La biotina incrementa la secreción de insulina en células MIN6.	67
Figura 24. La suplementación con biotina aumenta el crecimiento celular de MIN6.	67
Figura 25. La suplementación con biotina aumenta la proliferación de las células beta. .	68
Figura 26. La suplementación con biotina modifica la arquitectura de los islotes pancreáticos.	69
Figura 27. La suplementación con biotina incrementa la cantidad de islotes con células alfa hacia el centro.	70
Figura 28. La suplementación con biotina no modifica la glucosa, el peso corporal ni la resistencia a la insulina.	71
Figura 29. La suplementación con biotina en la dieta no modifica la expresión ni la actividad de la piruvato carboxilasa.	72
Figura 30. La suplementación con biotina modifica la expresión de Ncam1 y beta-Actina	73

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación etiológica de la diabetes mellitus.	32
Tabla 2. Etapas propuestas de la disfunción de la célula beta durante la progresión hacia la diabetes tipo 2.	35
Tabla 3. Sondas Taqman utilizadas para la determinación de la expresión de RNAm en islotes de ratón por medio de RT-PCR en tiempo real.	52

A. RESUMEN

La biotina es una vitamina hidrosoluble del complejo B que además de participar como grupo prostético de las carboxilasas, posee efectos sistémicos sobre la proliferación, el desarrollo, la reproducción y el metabolismo. La suplementación con biotina favorece el metabolismo de glucosa, y actualmente existen en el mercado suplementos que contienen dosis suprafisiológicas de biotina utilizados para el tratamiento de la diabetes. Sin embargo, los efectos de la suplementación con biotina *in vivo* sobre la célula beta, un componente primordial en la regulación de la homeostasis de la glucosa, no han sido estudiados.

En este trabajo analizamos los efectos de dosis farmacológicas de biotina sobre la función y la masa de células beta. Ratones BALB/cAnN Hsd machos recién destetados fueron alimentados con una dieta control o una dieta suplementada con biotina durante 8 semanas. Posteriormente, evaluamos la homeostasis de la glucosa, la secreción de insulina, la expresión de genes del islote pancreático por PCR cuantitativo y realizamos análisis morfométricos del páncreas por medio de inmunohistoquímica.

La suplementación con biotina incrementó la secreción estática de insulina, así como la expresión del RNAm de factores transcripcionales que regulan la expresión y secreción de insulina, como *Foxa2*, *Pdx1* y *Hnf4a*. También incrementó el RNAm de *Glucocinasa*, *Cacna1d*, *acetil-CoA carboxilasa* e *Insulina*. En concordancia con estos efectos, los ratones suplementados con biotina mostraron una mejora en la tolerancia a la glucosa y un incremento de insulina en sangre, sin cambios en los niveles basales de glucosa ni en la tolerancia a la insulina.

El análisis morfométrico reveló que la suplementación con biotina incrementó la masa de las células beta por medio de un aumento en el tamaño de los islotes. Por medio de experimentos de crecimiento y proliferación en células MIN6, encontramos que la biotina podría incrementar la proliferación de las células beta. Asimismo, la arquitectura de los islotes se encontró modificada en los ratones suplementados con biotina, observándose un porcentaje más elevado de islotes con células alfa localizadas hacia el centro del islote con respecto a los controles. Se encontró además una disminución en la expresión del RNAm de *Ncam1*, indispensable en el mantenimiento de la arquitectura del islote.

Los efectos de la suplementación con biotina no se deben a una adaptación del islote a cambios metabólicos, ya que no se encontraron datos de obesidad, hiperglucemia, resistencia a insulina o modificaciones en la piruvato carboxilasa que pudieran ocasionar

dicha adaptación. En conclusión, la suplementación con biotina incrementa la secreción de insulina, mejora la tolerancia a la glucosa y aumenta la expresión de genes que regulan la producción y secreción de insulina, favoreciendo la función y la masa de las células beta. Estos resultados sugieren que la suplementación con biotina podría tener un efecto positivo sobre la fisiología del páncreas endocrino, apoyando el uso de la biotina en la prevención y el tratamiento de la diabetes.

B. ABSTRACT

Biotin is a water-soluble vitamin from the B group, that besides acting as carboxylase prosthetic group, and has a wide repertoire of systemic effects on proliferation, development, reproduction and metabolism. Biotin supplementation favors glucose metabolism and there are vitamin supplements with pharmacological doses of biotin that are being currently used in diabetes treatment. However, the *in vivo* effects of biotin supplementation on the beta-cell, a major participant in glucose homeostasis regulation, are largely unknown.

The present work investigates the effects of pharmacological doses of biotin on beta-cell function and mass. Male BALB/cAnN Hsd mice were fed either a control or a biotin-supplemented diet over a period of 8 wk post-weaning. Next, we evaluated glucose homeostasis, insulin secretion, pancreatic islet gene expression through Q-PCR, and pancreas morphometry using immunohistochemistry. Biotin supplementation increased static insulin secretion, as well as the expression of several transcription factors regulating insulin expression and secretion such as *Foxa2*, *Pdx1* and *Hnf4a*. mRNA abundance of *Glucokinase*, *Cacna1d*, *acetylCoA carboxylase*, and *insulin* was also increased. Consistent with these effects, biotin supplemented mice improved their glucose tolerance and insulin levels, without changes in basal glucose levels or insulin tolerance. The morphometric analysis revealed that biotin supplementation augmented beta-cell relative mass by enlarging islet size. Through growth and proliferation experiments in MIN6 cells, we found that biotin might increase beta-cell proliferation.

Unexpectedly, islet architecture was modified in the islets of biotin-supplemented mice, which showed an increase in the percentage of islets with alpha-cells at the islet core. A decrease in the mRNA expression of *Ncam2*, essential adhesion molecule in maintaining islet architecture, was observed as well.

The effects of biotin supplementation are not due to islet adaptation in response to metabolic changes, as no signs of obesity, hyperglycemia, insulin resistance or changes in pyruvate carboxylase activity were found. In conclusion, biotin supplementation increases insulin secretion, enhances glucose tolerance and increases the expression of genes modulating insulin production and secretion; favoring beta-cell function and mass. These findings suggest that biotin supplementation may have a positive effect on endocrine pancreas physiology, supporting a role for biotin in the prevention and treatment of diabetes.

C. ABREVIATURAS

ABC	Área bajo la curva
ACC	Acetil-CoA carboxilasa
Actb	Beta actina
ADP	Difosfato de adenosina
Akt/PKB	Proteína cinasa B
AMPc	AMP (monofosfato de adenosina) cíclico
ANOVA	Análisis de Varianza
aPKC	Proteína Cinasas C atípicas (ζ/λ)
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albúmina sérica bovina
Cacna1d	Subunidad alfa 1D del canal de calcio tipo L dependiente de voltaje.
CaMKII	Proteína Cinasa II Dependiente de Calcio-Calmodulina
CAP	Proteína asociada a Cbl
Cdh1	Cadherina 1 ó E-Cadherina
DAG	Diacil glicerol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo inmunoenzimático
ES	Error estándar
FAS	Sintasa de ácidos grasos
Foxa2	Forkhead box A 2
FoxO1	Forkhead box O1
GABA	Ácido γ -amino butírico
Gck	Glucocinasa
GDH	Glutamato Deshidrogenasa
GLUT	Transportador de glucosa
GMPc	Monofosfato de guanidina cíclico
GSK3	Cinasa 3 de la sintasa de glucógeno
GTP-SCS	GTP-Succinil CoA Sintetasa
HCS	Holocarboxilasa sintetasa
Hnf4 α	Hepatocyte Nuclear Factor 4 α
IGF	Factor de crecimiento similar a insulina
IGF-1R	Receptor 1del factor de crecimiento similar a insulina

Insr	Receptor de insulina
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato
IRS	Sustrato del receptor de insulina
JNK	Cinasa NH ₂ -terminal Jun-c
K _{ATP}	Canal de K ⁺ sensible a ATP
MAPK	Cinasa de la proteína activada por mitógenos
MCC	B–metilcrotonil-CoA carboxilasa
MDH	Malato Deshidrogenasa
ME	Enzima málica
MODY	Diabetes del adulto de inicio juvenil
mTORC1	Mammalian target of rapamycin
NADPH	Dinucleótido de adenina nicotinamida reducida fosfato
Ncam1	Molécula de adhesión de células neurales 1
OLETF	Otsuka Long Evans Tokushima Fatty
PBS	Solución Salina de Fosfatos
PC	Piruvato Carboxilasa
PCC	Propionil-CoA carboxilasa
PDE3B	Fosfodiesterasa 3B
PK1	Cinasa dependiente de fosfoinosítidos 1
PDX-1	Pancreatic Duodenum Homeobox 1
PEPCK	Fosfoenol piruvato carboxicinas
PGC1	Coactivador 1 de PPARgamma
PH	Dominios de homología a plekstrina
PHD	Piruvato Deshidrogenasa
PHH3	Histona H3 Fosforilada
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinasa
PIP2	Fosfatidili Inositol bisfosfato
PIP3	Fosfatidili Inositol trifosfato
PKA	Proteína cinasa A
PKA	Cinasa de proteínas regulada por AMPc
PKG	Proteína cinasa G
PLC	Fosfolipasa C
PLC-γ1	Fosfolipasa C-γ1
PP	Polipéptido pancreático
PPARα	Peroxisome proliferator activated receptor alpha

PPARg	Peroxisome proliferator activated receptor gamma
PTB	Dominio de unión a fosfotirosina
Ras	Proteína monomérica de unión a GTP
RE	Retículo endoplásmico
RER	Retículo endoplásmico rugoso
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa reversa
SBF	Suero Bovino Fetal
SH2	Dominio de homología a Src 2
Shc	Proteína cinasa de tirosina Src
SHP2	Tirosina fosfatasa 2
SMVT	Transportador múltiple de vitaminas dependiente de sodio
SREBP-1c	Proteína 1c de unión al elemento regulador de esterol
Sur1	ATP-binding cassette sub-family C (CFTR/MRP) member 8
TC10	Proteína pequeña de unión a GTP
α KG	Alfa-cetoglutarato

D. INTRODUCCIÓN

El ser humano tiene un requerimiento constante de energía, parte de los alimentos que ingerimos es utilizada para nuestros requerimientos inmediatos y otra gran parte de ellos, es almacenada en el organismo principalmente en forma de glucógeno en el hígado y en el músculo, y en forma de triglicéridos en el tejido adiposo. Estos nutrimentos almacenados son utilizados posteriormente para la obtención de energía en los períodos de ayuno ¹. El almacenamiento y la utilización de estas sustancias se encuentran controlados por mensajes hormonales (Fig.1).

En el estado posprandial, la coordinación entre la secreción de insulina por las células beta pancreáticas y la respuesta a la insulina de los principales tejidos que almacenan a la glucosa como el músculo, el hígado y el tejido adiposo, controlan las concentraciones de glucosa en plasma. La insulina promueve la captación de glucosa al interior de las células, la síntesis de glucógeno en el hígado y músculo, la formación de lípidos que se almacenan en el tejido adiposo, y la síntesis de proteínas en la mayoría de las células. El transporte de glucosa hacia el interior de las células del músculo esquelético, representa más del 75% de la captación total de glucosa de todo el organismo ². Paralelo al efecto estimulante de la insulina sobre la síntesis de reservas energéticas, en el estado posprandial, la hormona tiene funciones restrictivas sobre la producción de glucosa y la lipólisis ^{3,4}.

En el estado de ayuno, la disminución en la concentración plasmática de insulina y el aumento de hormonas que contrarrestan la acción de la insulina, como el glucagon, los glucocorticoides y las catecolaminas, contribuyen a la liberación al torrente sanguíneo de glucosa por medio de la degradación del glucógeno y la gluconeogénesis. Estas hormonas también favorecen la lipólisis, así como la disminución en síntesis de proteínas y el aumento en la degradación de las mismas ¹.

Tanto la insulina como el glucagon son sintetizadas y secretadas por los islotes pancreáticos, los cuales constituyen la parte endocrina del páncreas.

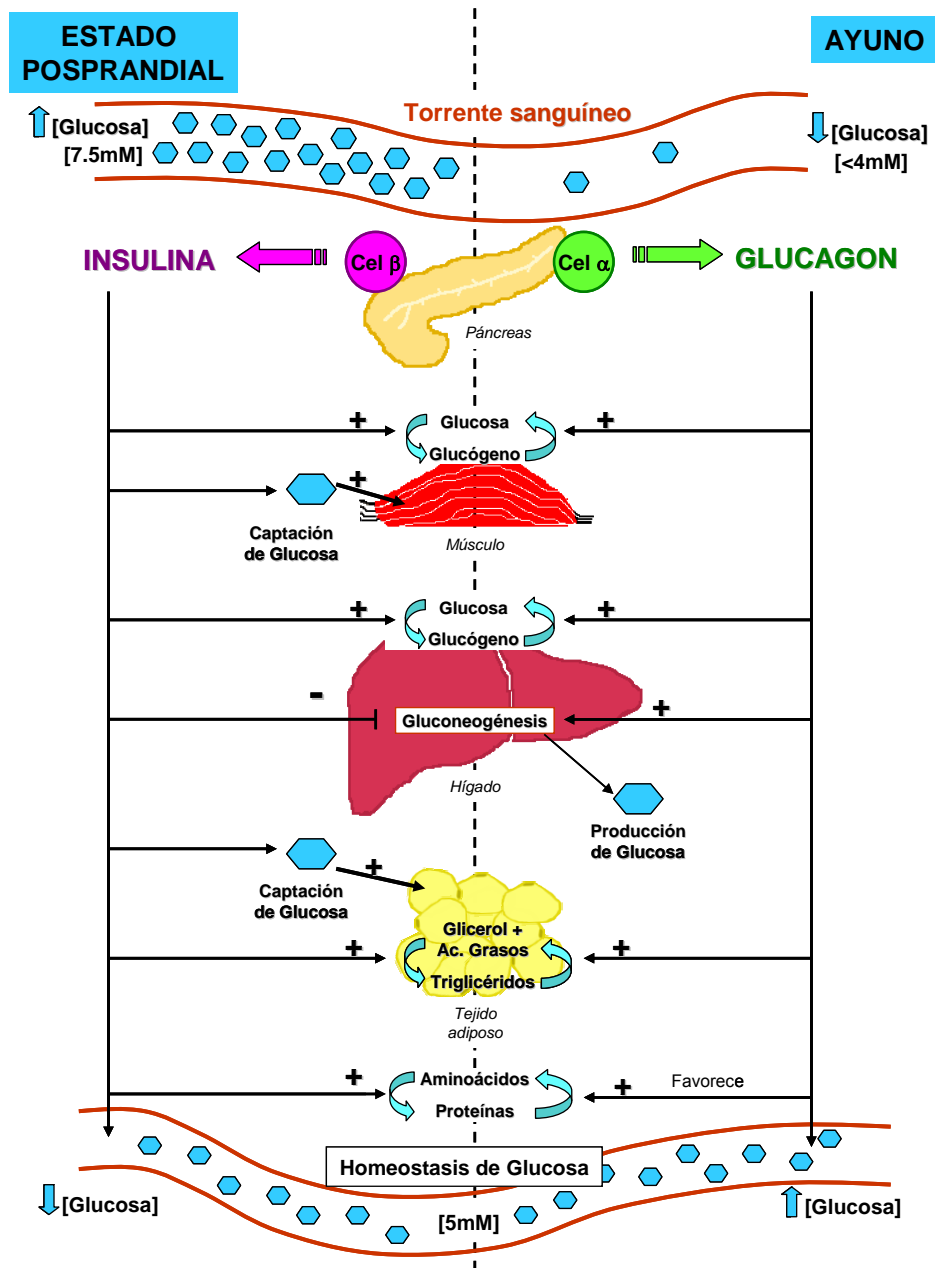


Figura 1. Regulación del metabolismo por mensajes hormonales

D.1. El Páncreas

El páncreas es una glándula mixta que se compone de una parte exocrina y una parte endocrina. La parte exocrina está constituida por los acinos pancreáticos, cúmulos de 15 a 100 células acinares encargadas de sintetizar y secretar enzimas digestivas y zimógenos (precursores enzimáticos inactivos) que son vertidos al duodeno y utilizados en la digestión de los alimentos. La parte endocrina del páncreas se constituye por los islotes de Langerhans o islotes pancreáticos^{5,6} (Fig. 2).

D.2. Los islotes pancreáticos

El páncreas humano contiene entre 500,000 y un millón de islotes pancreáticos. Los islotes son microestructuras o microorganos de entre 50 y 400 μm que se encuentran dispersos a lo largo del tejido acinar en el páncreas, y representan del 1% al 2% de la masa total del páncreas ⁷. Los islotes se componen de diversos tipos celulares, incluyendo células endoteliales, fibroblastos y, principalmente, células endocrinas.

D.2.1 Composición de los islotes pancreáticos

Las distintas células endocrinas que componen al islote producen y secretan diferentes hormonas: las células beta (β) secretan insulina, las células alfa (α) secretan glucagón, las células delta (δ) secretan somatostatina, las células PP secretan polipéptido pancreático, y las células épsilon (ϵ) que secretan grelina. Alrededor del 55% de las células del islote humano corresponden a células beta, mientras que el 35% son células alfa y el 11% corresponde a células delta. En el ratón, la composición de los islotes pancreáticos es ligeramente distinta, encontrándose un 77% de células beta, un 19% de células alfa y un 6% de células delta. Tanto en los islotes humanos como en los de ratón, las células épsilon son abundantes durante el desarrollo y el nacimiento, mientras que disminuyen en la etapa postnatal ⁸.

D.2.2 Arquitectura de los islotes pancreáticos

Los islotes pancreáticos no sólo difieren en su composición celular dependiendo de la especie, sino también en su arquitectura. Mientras que en el roedor adulto los islotes presentan las células beta al centro y los otros tipos celulares hacia la periferia del islote, los islotes de humano presentan una arquitectura más heterogénea, con las células beta dispersas entre los demás tipos celulares ⁹ (Fig. 3).

A pesar de estas diferencias, se conoce poco acerca de las consecuencias que la organización celular y la composición de los islotes pueda tener sobre la función de los mismos. Estudios realizados por Cabrera et. al. en 2006 han sugerido que las oscilaciones de calcio intracelular en los islotes de humano no se encuentran coordinadas de la misma forma como se encuentran en los islotes de ratón. Asimismo, estos estudios sugieren que los islotes de humano incrementan sus concentraciones de calcio intracelular a un menor umbral de concentraciones de glucosa comparados con los islotes de ratón ¹⁰.

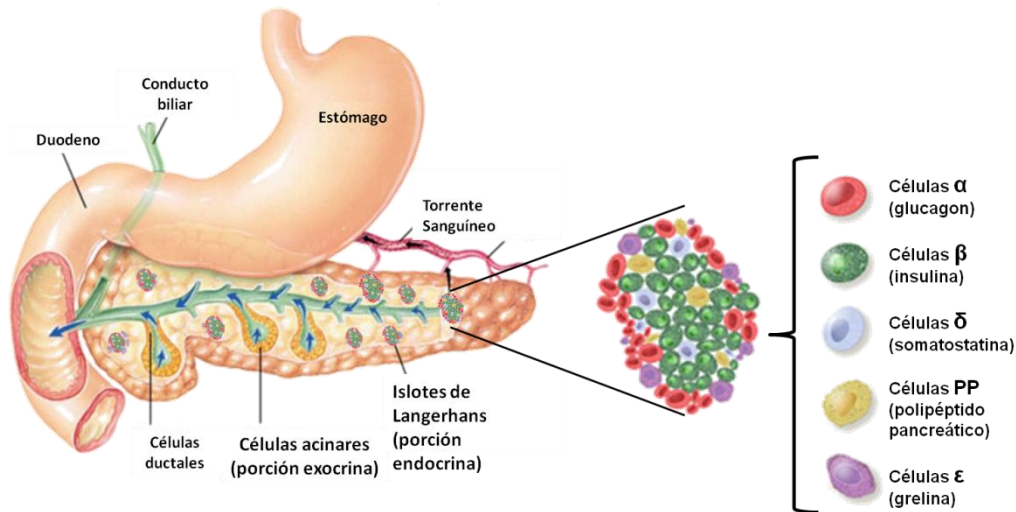


Figura 2. El páncreas y la composición del islote pancreático
 Modificada de <http://blogdefarmacia.com> y <http://www.betacell.org> (JP Cartailier).

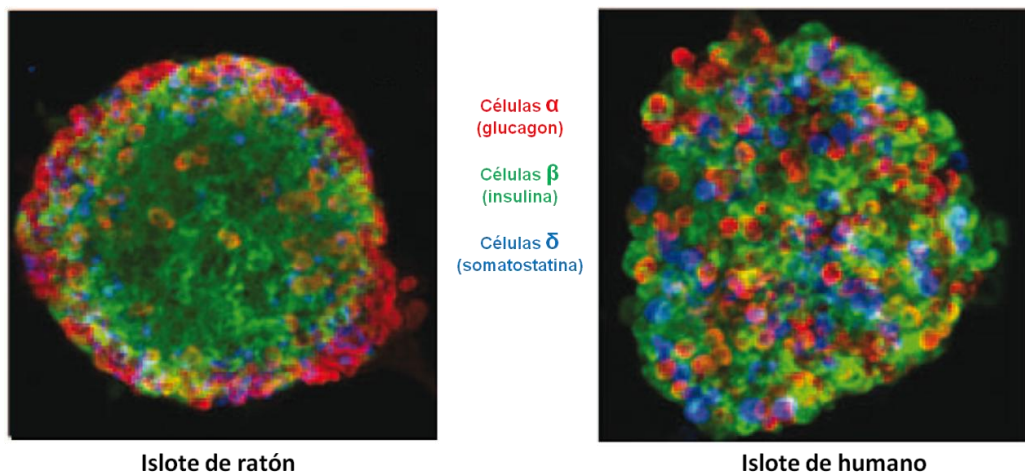


Figura 3. Diferencias en la arquitectura de los islotes pancreáticos de ratón y humano.

Modificada de Brissova, et. al. 2005⁹.

En el roedor, las células beta se encuentran en su mayoría hacia el centro de los islotes y los otros tipos celulares hacia la periferia. En cambio, en los islotes humanos, las células beta se encuentran dispersas entre los demás tipos celulares.

D.3. Las células beta y la secreción de insulina

Las células beta son un tipo celular altamente especializado que se encarga de controlar la producción, procesamiento, almacenamiento y modulación de la secreción de insulina en respuesta a incrementos en las concentraciones de nutrientes en sangre durante el estado posprandial, principalmente en respuesta a las concentraciones de glucosa. Esta especialización radica en la capacidad de las células beta para sensar la cantidad de

glucosa en sangre, para lo cual participa el metabolismo de la glucosa dentro de la célula beta. En el establecimiento y mantenimiento del fenotipo altamente especializado de las células beta participan un grupo de factores transcripcionales que en su conjunto modulan la expresión tanto de la insulina como de otros componentes claves en el proceso de acoplar la síntesis y secreción de esta hormona a las demandas metabólicas del organismo ^{11,12}.

D.3.1 La insulina

El principal regulador de la expresión de la insulina en las células beta pancreáticas es la concentración de glucosa en sangre. El metabolismo de la glucosa en la célula beta genera señales intracelulares que estimulan la transcripción, traducción y secreción de la insulina.

D.3.1.1 Estructura de la insulina

La insulina es una proteína de secreción que consta de dos cadenas polipeptídicas, denominadas A y B, unidas por dos puentes disulfuro. La molécula de insulina madura comprende un total de 51 aminoácidos, 21 en la cadena A y 30 en la cadena B ¹³ (Fig. 4).

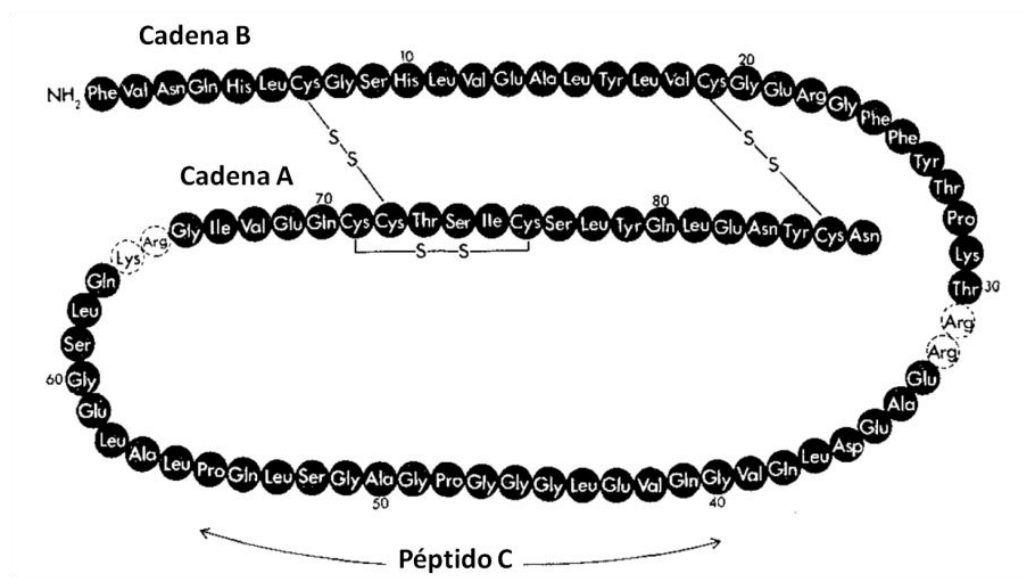


Figura 4. Estructura covalente de la proinsulina humana.
Modificada de Oyer et. al. 1971 ¹³

D.3.1.2 Síntesis y procesamiento de la insulina

La insulina se sintetiza por medio de una serie de moléculas de una sola cadena, incluyendo la preproinsulina, la proinsulina y varios productos de corte intermedios. El mRNA transcrito del gen de la insulina posee una secuencia líder en su extremo 5', seguida de los dominios peptídicos B, C y A. El producto inicial de la traducción de este mRNA es la preproinsulina, la cual posee un péptido señal de 24 residuos, característico de casi las proteínas secretorias de cualquier organismo. El péptido señal interactúa con la partícula de reconocimiento de señal (SRP), una ribonucleoproteína del citosol que facilita la separación de la preproinsulina naciente del compartimiento citosólico y la envía a la vía secretora. La preproinsulina se transloca entonces al lumen del RER (Retículo endoplásmico rugoso), donde el péptido señal es cortado por una peptidasa especializada y degradado rápidamente. Dentro del RER, la proinsulina se dobla y se forman tres puentes disulfuro que le darán su estructura nativa, formando la proinsulina. En un tiempo de 10 a 20 minutos, la proinsulina se transporta al aparato de Golgi para su procesamiento y empaquetamiento en gránulos secretores, proceso que durará de 2 a 3 horas posteriores a la traducción de la preproinsulina (Fig. 5) ^{6,14}.

Dentro del Golgi, la proinsulina es cortada por las prohormona convertasas PC2 y PC1/3 para formar la insulina y el péptido C, una proteína de 31 aminoácidos. La insulina y el péptido C se empaquetan en gránulos que contienen un centro electrodenso formado por 6 moléculas de insulina ordenadas en arreglos cristalinos romboédricos alrededor de una molécula de zinc (Zn^{2+}). Estas moléculas están suspendidas en un halo constituido por el péptido C, pequeñas cantidades (3%-5%) de proinsulina y sus productos intermediarios de corte, polipéptido amiloide, iones (Zn^{2+} y Ca^{2+}) y moléculas pequeñas como ATP, GABA, serotonina y glutamato. Cada célula beta contiene de 10000 a 13000 gránulos secretores, que contienen aproximadamente 10^{-18} moles de insulina por gránulo. Estos gránulos pueden almacenarse por varios días antes de ser liberados, o pueden ser degradados por crinofagia (destrucción por lisosomas) ^{6,14,15}.

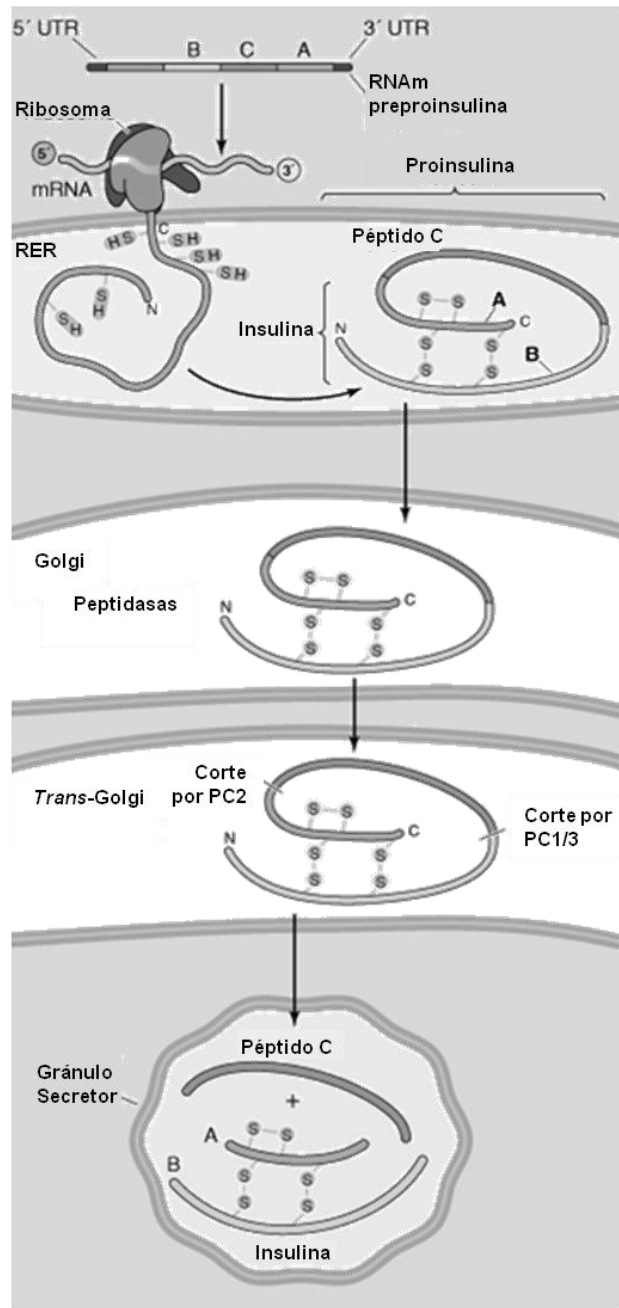


Figura 5. Síntesis y procesamiento de la insulina.
 Modificada de Barret 2005 ⁶

D.3.1.3 Transcripción de la insulina y su regulación

La insulina está codificada por un solo gen en los humanos (INS, cromosoma 11p15.5) y dos genes en los ratones (*Ins1*, 19, 49.0 cM e *Ins2*, 7, 69.1 cM). Existen diversos factores *cis*-activadores y *trans*-activadores asociados a la activación específica en la célula beta de la secuencia potenciadora (*enhancer*) del gen de la insulina. Además, la misma

insulina puede actuar de forma autócrina para regular esta activación mediada por secuencias potenciadoras, utilizando las mismas vías para la activación por glucosa ¹⁶.

La secuencia potenciadora del gen de la insulina está constituido principalmente por los elementos A, C y E, cuyos sitios de unión se encuentran tanto en el gen de roedores como de humano (Fig. 6). La estimulación de estos sitios está dada por factores transcripcionales que actúan de manera cooperativa, formando redes transcripcionales ¹⁶. Estas redes no sólo regulan la expresión de la insulina, sino también modulan la expresión de otros genes que participan en la producción y secreción de insulina, estableciendo y manteniendo así el fenotipo altamente diferenciado de la célula beta (revisado en el Anexo I).

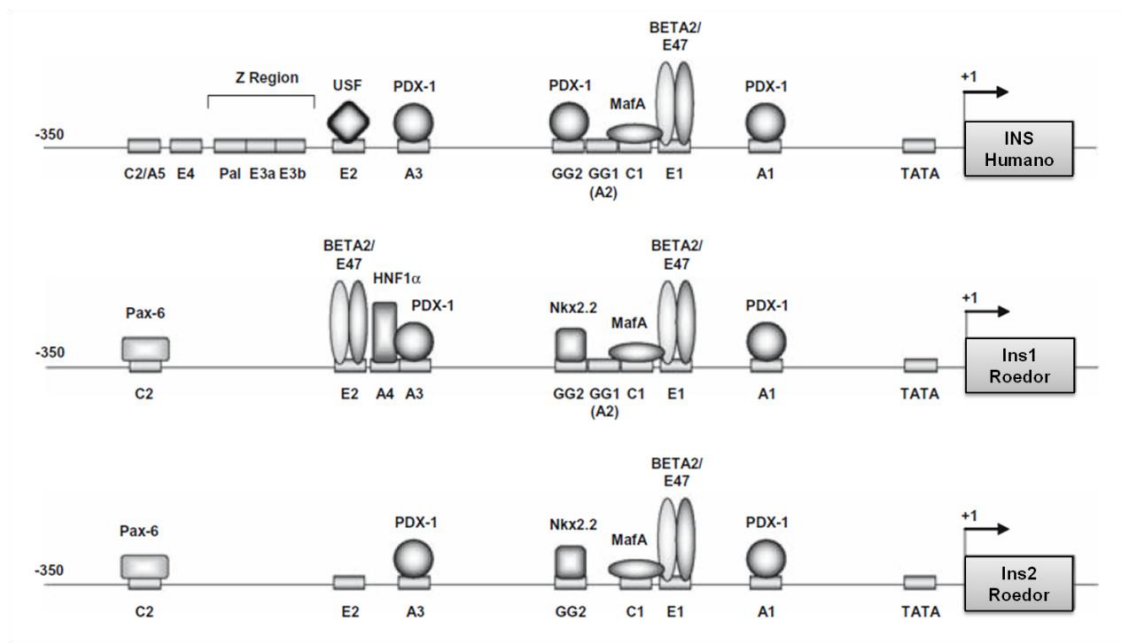


Figura 6. Regulación transcripcional del gen de la insulina.
Modificada de Artner et. al. 2008 ¹⁶.

D.3.2 La secreción de insulina

La glucosa es el nutriente más importante para la secreción de insulina. El mecanismo por el cual la glucosa promueve la secreción de insulina requiere detectar la cantidad de glucosa en sangre y el metabolismo de la glucosa dentro de la célula beta, un proceso conocido como secreción de insulina en respuesta a glucosa.

La secreción de insulina en respuesta a glucosa es pulsátil y bifásica ¹⁷. Los pulsos secretorios de la célula beta están asociados a oscilaciones sincrónicas de calcio (Ca^{2+}) en respuesta a los estímulos de glucosa ¹⁸ y se ha sugerido que estas oscilaciones están

acopladas a oscilaciones en la glucólisis dentro de la célula beta ¹⁹. Los pulsos secretorios también están regulados y sincronizados con los otros tipos celulares del islote. La insulina y el glucagón tienen patrones de secreción asincrónicos, mientras que los pulsos de somatostatina están sincronizados con la secreción de insulina ¹⁷.

La secreción de insulina en respuesta a glucosa también muestra un patrón bifásico. Poco después de que la célula beta recibe el estímulo de glucosa hay un primer pico de secreción de insulina, seguido de una disminución en la secreción. Una segunda fase sostenida de secreción de insulina sigue a este decremento, la cual puede continuar durante horas hasta que se alcance la euglicemia (Fig. 7) ²⁰. A pesar de que los mecanismos que participan en la primera fase de secreción de la insulina, (o fase de disparo) son bien conocidos, los mecanismos que regulan la segunda fase de secreción sostenida (o fase de amplificación) no han sido elucidados por completo, y se ha sugerido la participación de diversos agentes en esta fase. La mayoría de estos agentes se relacionan con el metabolismo de la glucosa al interior de la célula beta ²¹.

D.3.2.1 Primera fase de secreción de insulina: la vía de disparo

La primera fase de secreción de insulina en respuesta a glucosa es un proceso complejo de múltiples pasos que requiere de: el transporte y la oxidación de la glucosa, cambios electrofisiológicos y la fusión de gránulos secretores que contienen insulina con la membrana plasmática de la célula beta (Fig. 7). La glucosa entra a la célula por difusión facilitada mediada por un grupo de proteínas transportadoras de glucosa relacionadas, caracterizadas por 12 dominios hidrofóbicos tipo hélice. Hasta la fecha, se han descrito al menos 12 GLUTs ²². En la célula beta pancreática, la glucosa se transporta por la isoforma 2 del transportador de glucosa (GLUT2) en los roedores, y por la isoforma 1 en humanos. La glucosa es fosforilada para formar glucosa-6-fosfato por la glucocinasa. Esta enzima juega un papel crítico en la secreción de insulina en respuesta a glucosa y es considerada el sensor de glucosa de la célula beta pancreática. Debido a sus características cinéticas, la glucocinasa es un factor determinante para la fosforilación de la glucosa ²³ y por lo tanto para su metabolismo a través de la glucólisis y la oxidación.

La generación de ATP por la glucólisis y el ciclo de Krebs provoca el cierre del canal de potasio sensible a ATP (K_{ATP}) – un hetero-octámero formado por cuatro subunidades de receptor a sulfonilurea 1 (SUR1) y cuatro unidades del canal rectificador de entrada de K^+ Kir6.2 ²⁴. El cierre de estos canales permiten que la entrada de sodio (Na^+). Estos dos eventos ocasionan la despolarización de la membrana a un rango que permite la apertura

de los canales de calcio (Ca^{2+}) tipo T dependientes de voltaje y de los canales de sodio (Na^+). La entrada de sodio y calcio despolariza aún más la membrana, ocasionando que se abran los canales de calcio tipo L y otros canales de calcio dependientes de voltaje. Su activación desencadena potenciales de acción que incrementan el calcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$)²⁵. Junto con el calcio movilizado de las reservas intracelulares, este proceso lleva a la fusión de los gránulos secretores que contienen insulina con la membrana plasmática y a la liberación de la insulina hacia la circulación²⁶. Posterior al metabolismo de la glucosa, el paso limitante para la primera fase se encuentra en la cascada de transducción de señales que se encuentra entre la detección de los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la exocitosis de los gránulos de liberación inmediata²⁷.

D.3.2.2 Segunda fase de secreción de insulina: la vía de amplificación

La existencia de una segunda fase de secreción de insulina fue reportada por primera vez en los años 60. Curry et. al.²⁰ observaron que al perfundir el páncreas total con glucosa, la secreción de insulina se incrementaba rápidamente a partir de los 2 minutos posteriores a la infusión con glucosa, y alcanzaba su pico máximo a los 4 min. Una segunda fase, más lenta, seguía a este incremento y se sostenía durante todo el periodo de infusión con glucosa²⁰. Por otro lado, cuando el páncreas se perfundía con tolbutamida, una sulfonilurea que bloquea los canales de potasio, sólo se observaba el primer pico de liberación rápida de insulina, sugiriendo que la secreción bifásica de insulina sólo se genera en respuesta a glucosa²⁰. Fue hasta los años 90 que se encontraron mecanismos de secreción de insulina independientes de la acción iónica (activación de los K_{ATP})^{28,29}. A partir de entonces, se sabe que la secreción de insulina en respuesta a glucosa comprende una primera fase rápida de secreción, ocasionada por una vía de disparo (o un mecanismo independiente de K_{ATP}), seguida de una segunda fase sostenida que depende de una vía de amplificación (o un mecanismo independiente de K_{ATP})^{30,31}.

La naturaleza bifásica de la secreción de insulina ha sido explicada por la existencia de diversas pozas de gránulos de insulina al interior de la célula beta^{32,33}. Existe una poza de gránulos de reserva que se localiza en el citoplasma, la cual corresponde alrededor del 94% del total de los gránulos, y otra poza de gránulos liberables que se encuentran anclados a la membrana plasmática. Se ha sugerido que estos gránulos anclados poseen diferente habilidad para ser liberados, por lo que se dividen en dos grupos: los gránulos listos para la liberación (LL), y los gránulos de liberación inmediata (LI). Los gránulos de liberación inmediata son los primeros en secretar insulina en respuesta al incremento del

[Ca²⁺]_i durante la fase de disparo, ocasionando la primera fase de secreción de insulina. En el punto más bajo de secreción, encontrado entre las dos fases, los gránulos LL se convierten en gránulos LI, un proceso dependiente de ATP que se denomina preparación o “priming”. Se ha sugerido que esta preparación es el paso limitante para la exocitosis, y el proceso regulado por las señales que participan en la fase de amplificación que provoca la segunda fase de secreción de insulina (Fig. 7) ³³. Se ha sugerido que la mayoría de estas señales se derivan del metabolismo de la glucosa.

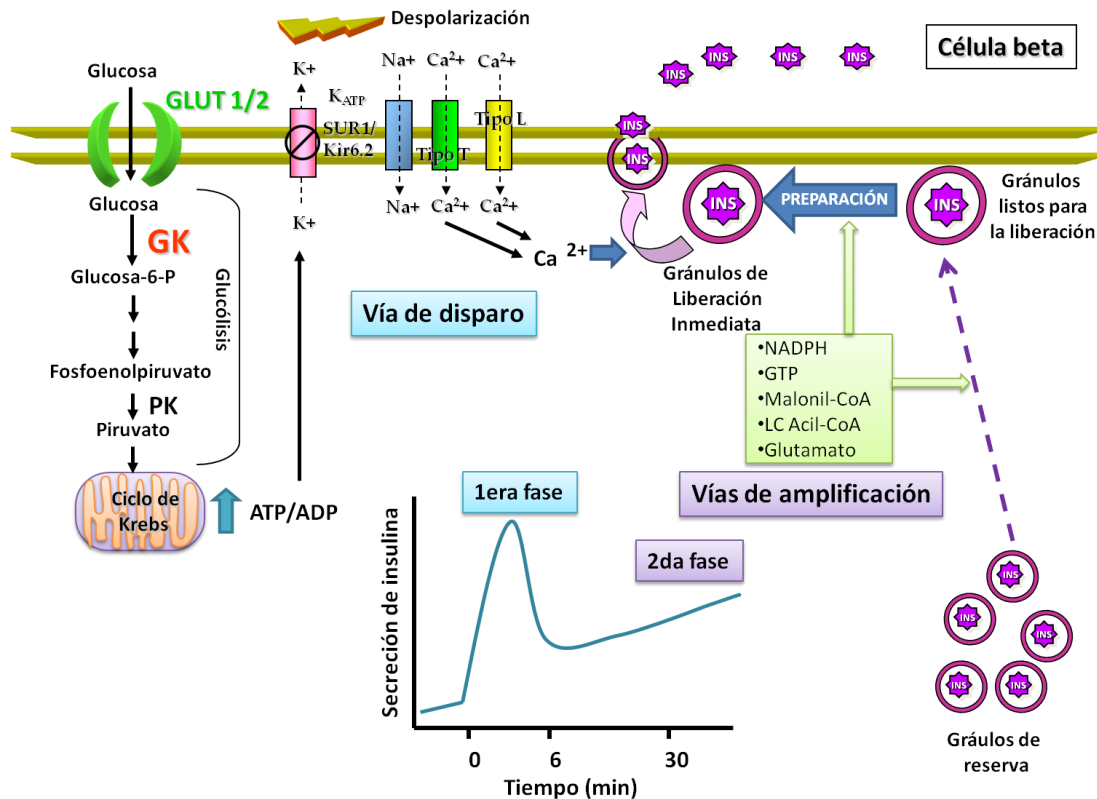


Figura 7. Mecanismos de la secreción bifásica de insulina en respuesta a glucosa.

D.3.3 Factores de acoplamiento metabólico y la secreción de insulina en respuesta a glucosa

Además de incrementar la relación ATP/ADP para la primera fase de secreción de insulina, el metabolismo de la glucosa en la célula beta puede generar una serie de señales, o factores de acoplamiento metabólico, capaces de iniciar y sostener la segunda fase de secreción de insulina, probablemente a través de la movilización de la reserva de gránulos de insulina y la reposición de los gránulos de liberación inmediata. Algunos de estos factores de acoplamiento participan en el metabolismo mitocondrial y la anaplerosis, constituyendo ciclos que involucran el NADPH, el piruvato, el malato, el citrato, el

isocitrato, los acil-CoAs y el glutamato³⁴. También existen diversas vías de señalización que al ser activadas pueden contribuir al mantenimiento o el aumento de la secreción de insulina en respuesta a glucosa, como las vías de CaMKII³⁵⁻³⁷, PKA^{38,39}, PKC^{39,40} y PKG^{41,42}. Curiosamente, la mayoría de los otros secretagogos y potenciadores de la secreción de insulina, como los nutrientes, las hormonas y los neurotransmisores, utilizan estas vías para modular la secreción de insulina (Fig. 8).

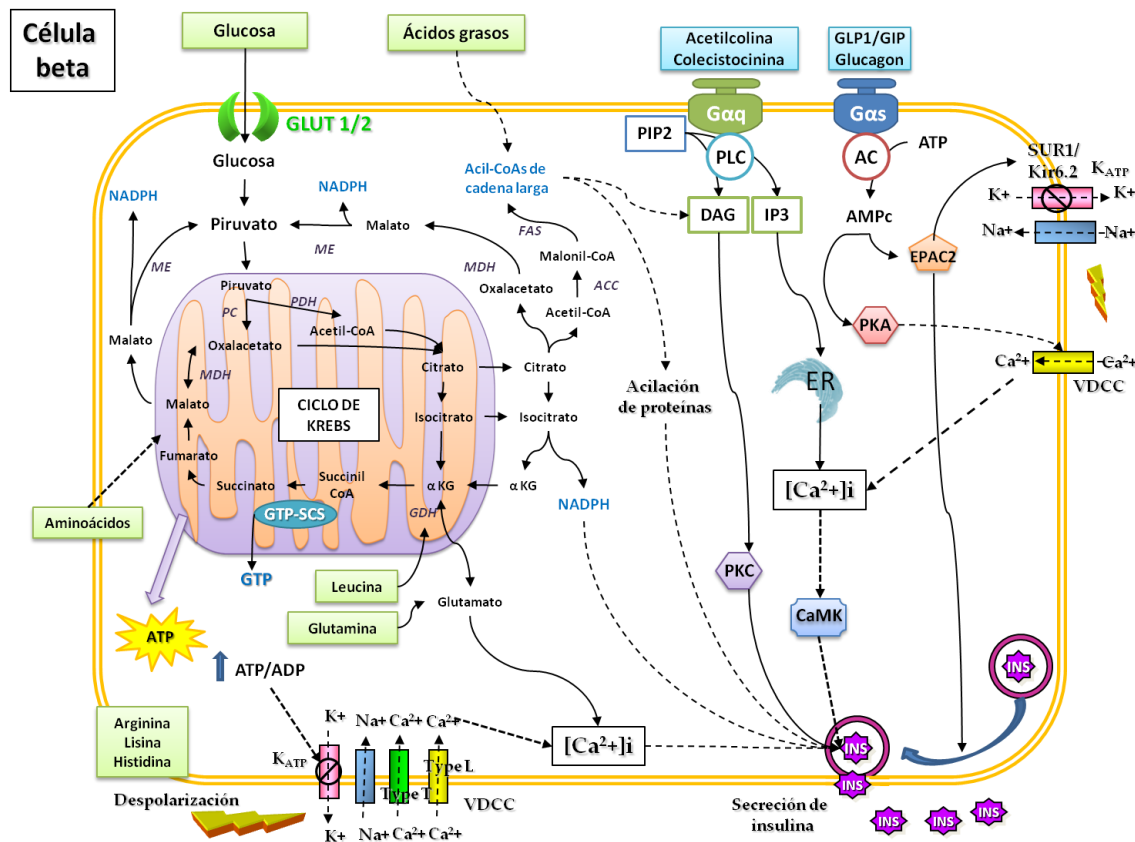


Figura 8. Regulación de la secreción de insulina en respuesta a glucosa por nutrientes, hormonas y neurotransmisores.

D.3.3.1 Modulación de la secreción de insulina por nutrientes

Las células beta pueden ser consideradas como sensores de energía, ya que continuamente monitorean y responden no sólo a las concentraciones de glucosa, sino también de otros nutrientes en la circulación, secretando insulina.

Los ácidos grasos, a pesar de no ser secretagogos de la insulina en ausencia de glucosa, son esenciales para la secreción de insulina en respuesta a glucosa⁴³. Se ha propuesto que su acción es a través de la activación de la vía de PKC por la formación de DAG, proveniente de la acumulación de Acyl-coAs de cadena larga en el citosol⁴⁴ (Fig. 8).

Los aminoácidos obtenidos de la proteína dietaria también estimula la secreción de insulina. Estos aminoácidos actúan por lo general de forma conjunta, y los mecanismos de secreción en los que participan son el incremento de ATP proveniente del ciclo de Krebs, la despolarización de la membrana o el incremento en el $[Ca^{2+}]_i$ (Fig. 8) ⁴⁵⁻⁴⁸.

Existe también evidencia de que ciertas vitaminas son capaces de potenciar la secreción de insulina, entre las que se encuentran la vitamina A, la vitamina D y la Biotina. La vitamina A es esencial para la secreción de insulina ⁴⁹, y es capaz de incrementar la expresión del RNAm de glucocinasa ⁵⁰, GLUT2 ⁵¹ y la misma insulina ⁵⁰. La vitamina D incrementa también la síntesis de insulina ⁵² e incrementa el calcio intracelular potenciando así la secreción ⁵³. Incluso, se ha sugerido que las células beta sintetizan vitamina D ⁵⁴.

Estudios realizados en nuestro y otros laboratorios han encontrado que la vitamina biotina es un estimulador de la secreción de insulina y de la expresión y actividad de la glucocinasa pancreática (ver “Efectos de la suplementación con biotina”).

D.3.3.2 Modulación de la secreción de insulina por hormonas y neurotransmisores

La secreción de insulina también está modulada por distintas hormonas (incluyendo la misma insulina) y neurotransmisores por medio de la activación de sus receptores de membrana en la célula beta ⁵⁵⁻⁵⁷. Los receptores tipo proteína G α y la vía de la adenilato ciclasa median los efectos de los agonistas adrenérgicos y de hormonas como el GLP-1, la somatostatina y el glucagon, mientras que los receptores G α_q median los efectos de acetilcolina y colecistocinina ⁶ (Fig. 8). Adicionalmente varios estudios han demostrado un papel autocrino de la insulina sobre la función y la sobrevivencia de la célula beta ⁵⁸, mediante la unión de la insulina a su receptor localizado en la membrana de la célula beta, y la posterior activación de la vía de PI3K. En los islotes humanos, la insulina posee un efecto benéfico sobre la transcripción de insulina y la proliferación de la célula beta ⁵⁹.

D.3.4 Masa de las células beta

Además de una función adecuada de las células beta, la masa total de células beta de un organismo también es importante para mantener una producción y secreción de insulina adecuadas. Está dada por el número y tamaño de células, y se incrementa progresivamente durante los periodos fetal y neonatal, alcanzando una meseta durante la etapa adulta y decayendo gradualmente con la edad ⁶⁰.

En el incremento y mantenimiento de la masa de las células beta participan diversos procesos, como neogénesis, proliferación, hipertrofia y apoptosis ⁶¹. A pesar de que se han identificado progenitores de la célula beta en el páncreas ⁶², la participación de la neogénesis durante la etapa postnatal y adulta se considera limitada⁶³ siendo la proliferación ⁶⁴ y la hipertrofia ⁶³ los principales mecanismos responsables de la expansión postnatal de la masa de las células beta ⁶³. El organismo es capaz de modificar la masa de las células beta de acuerdo a sus requerimientos de insulina. En estados de resistencia a insulina tales como el embarazo y la obesidad, la masa de las células beta se ve incrementada⁶⁵ principalmente a través de un incremento en la proliferación ⁶⁶. Algunos de los factores que regulan la proliferación de las células beta adultas son los factores de crecimiento (la hormona del crecimiento, lactógenos, la misma insulina, los factores de crecimiento similares a insulina), las incretinas, las proteínas del ciclo celular, y factores de transcripción como PDX-1 ⁶⁷.

D.4. Acciones metabólicas de la insulina

Una vez secretada hacia la circulación portal, la insulina es transportada a los tejidos periféricos, sobre los cuales ejercerá acciones principalmente anabólicas ¹. El hígado es el órgano que capta y aclara más de la mitad de la insulina secretada ⁶.

D.4.1 Mecanismos moleculares de la señalización de la insulina

La insulina comienza su acción uniéndose al receptor de insulina; esto provoca una cascada de eventos que involucra fosforilación de proteínas y fosfolípidos de membrana, proteínas de andamiaje y acoplamiento, y actividad del citoesqueleto. El receptor de insulina pertenece a una subfamilia de receptores con una actividad de tirosina cinasa de proteínas. Es una glicoproteína heterotetramérica de membrana que consiste en dos subunidades alfa y dos subunidades beta. La insulina se une a la subunidad alfa extracelular del receptor e induce un cambio conformacional que acerca a las subunidades alfa, ocasionando una autofosforilación rápida del receptor, y catalizando la fosforilación de proteínas intracelulares como: a) miembros de la familia del sustrato del receptor de insulina (IRS) b) Shc y c) Cb1. Estas proteínas actúan como sitios de anclaje para proteínas que contengan dominios SH2 (Src-homology-2), como la fosfoinositido-3-cinasa, la Grb-2 y la SHP-2, lo cual resulta en una serie de diversas vías de señalización, principalmente la vía de PI3K, la vía de las MAPK y la vía de Cb1 asociada a balsas lipídicas. Estas vías actúan de manera concertada para transmitir la señal del receptor de

insulina a blancos biológicos como el transporte de glucosa, la síntesis de proteínas, lípidos y glucógeno, el crecimiento celular, la inhibición de la lipogénesis y la producción de glucosa y la expresión de genes ⁶⁸ (Fig. 9).

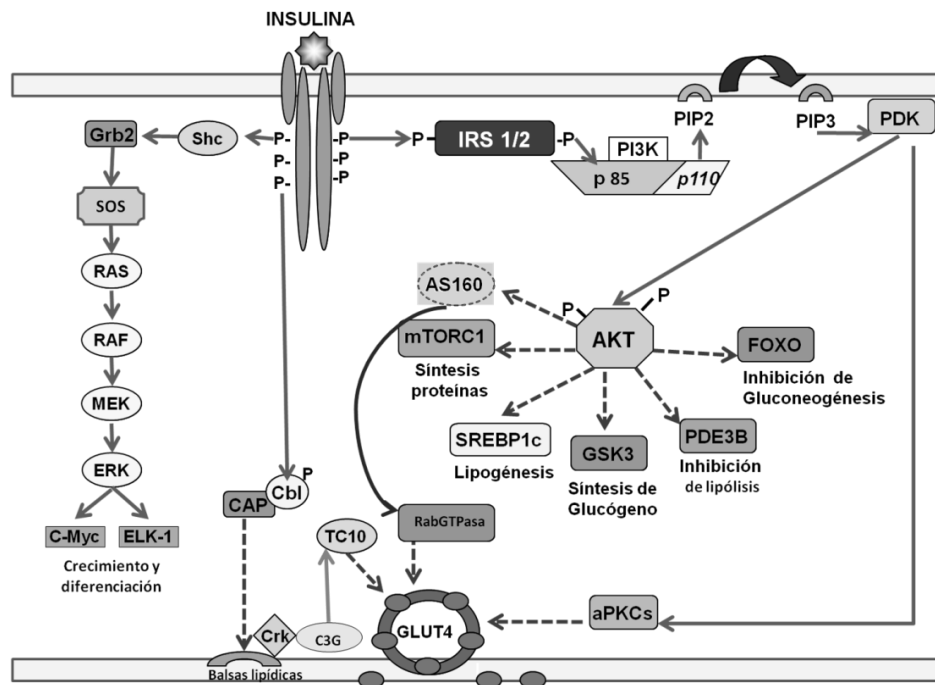


Figura 9. Mecanismos moleculares de la señalización de la insulina.

D.6. Diabetes mellitus

La diabetes mellitus es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizado por hiperglucemia resultante de defectos en la secreción de insulina, la acción de la insulina o ambos ⁶⁹.

D.6.1 Epidemiología y clasificación de la diabetes

La diabetes mellitus se ha posicionado como una de las enfermedades más importantes a nivel mundial. Durante las décadas anteriores, esta enfermedad ha sufrido un incremento explosivo, alcanzando proporciones epidémicas. Las estimaciones globales predicen que entre el año 2010 y el 2030 se incrementará en un 69% la población de adultos con diabetes en los países en desarrollo, y un 20% en los países desarrollados ⁷⁰. La prevalencia de diabetes en población mexicana es de las más altas en el mundo representando un 14.42% entre casos existentes y casos nuevos, lo que representa 7.31 millones de casos a nivel nacional ⁷¹. Se predice que, para el año 2030, cerca de doce millones de personas en México padecerán diabetes ⁷⁰.

Existen dos tipos principales de diabetes: tipo 1 y tipo 2. La diabetes tipo 1 se debe a una destrucción autoinmune de las células beta pancreáticas, ocasionando deficiencia de insulina. Los pacientes con diabetes tipo 1 requieren insulina exógena para sobrevivir. Su frecuencia es de cerca del 10% de todos los casos de diabetes. Existe una variación geográfica muy marcada en su prevalencia, siendo los países Escandinavos los que muestran los índices más altos de este padecimiento ⁷². La diabetes tipo 2 representa aproximadamente el 90% de los casos totales de diabetes, y se caracteriza por una disminución en la acción de la insulina y/o una secreción anormal de insulina. La epidemia mundial de diabetes se relaciona particularmente con la diabetes tipo 2. Además de la diabetes tipo 1 y tipo 2, existen otros tipos específicos de diabetes, como la diabetes gestacional y la diabetes MODY, entre otros (Tabla 1).

D.6.2 Resistencia a insulina y falla de la célula beta en la diabetes mellitus

La diabetes mellitus se desarrolla cuando falla la secreción de insulina y/o la acción de la insulina. Esta última se conoce como resistencia a la insulina, y consiste en una supresión o retraso en las respuestas metabólicas del músculo, el hígado y el tejido adiposo a la insulina. Esta falla se da a nivel de las vías de señalización posteriores a la unión de la insulina con su receptor ⁷³.

Por otro lado, la falla en la secreción de insulina por las células beta es un factor común entre la diabetes tipo 1 y 2, así como para la diabetes MODY ⁷⁴. Sin embargo, el origen de la falla de las células beta difiere entre los distintos tipos de diabetes.

D.6.2.1 Diabetes MODY

Existen varias formas de diabetes asociadas a defectos monogénicos en genes que participan en la función de la célula beta (Tabla 1), conocidas como diabetes del adulto de inicio juvenil (MODY por sus siglas en inglés). Se presentan generalmente antes de los 25 años de edad y se caracterizan por hiperglucemia debida a una secreción de insulina inadecuada, con defectos mínimos en la sensibilidad a la insulina. La mayoría de los subtipos de MODY, a excepción de MODY2, son causados por mutaciones en factores de transcripción, los cuales están involucrados en la regulación tejido-específica de la expresión de genes en las células beta pancreáticas ⁷⁵. Estos factores, además de regular de manera importante la producción y secreción de la insulina, establecen y mantienen el fenotipo diferenciado de la célula beta (ver anexo I).

Tabla 1. Clasificación etiológica de la diabetes mellitus.

Tomada de ADA 2009 ⁷⁵

I. DIABETES TIPO 1 (Destrucción de la célula beta, generalmente lleva a la deficiencia absoluta de insulina)

A) Mediada por inmunidad

B) Idiopática

II. DIABETES TIPO II (Puede variar desde una acción predominantemente debilitada de la insulina con deficiencia relativa en la secreción de la insulina, hasta un defecto secretor predominante con acción debilitada de la insulina)

III. OTROS TIPOS ESPECÍFICOS

A. Defectos genéticos de la célula beta, usualmente referidos como diabetes del adulto de inicio juvenil (MODY). Se hereda con un patrón dominante autonómico.

1. Cromosoma 12, HNF-1 alfa (MODY 3)
2. Cromosoma 7, glucocinasa (MODY 2)
3. Cromosoma 20, HNF-4 alfa (MODY 1)
4. Cromosoma 13, Factor promotor de la insulina-1 (IPF-1/PDX-1) (MODY 4)
5. Cromosoma 17, HNF-1 beta (MODY 5)
6. Cromosoma 2, NeuroD1 (MODY 6)
7. ADN mitocondrial
8. Otros

B. Defectos genéticos de la acción de la insulina. Algunas causas infrecuentes de diabetes se deben a anomalías genéticas de la acción de la insulina por mutaciones del receptor de insulina. Algunos individuos con estas mutaciones pueden presentar acanthosis nigricans. Las mujeres pueden presentar síndrome de ovario poliquístico. El Leprechaunismo y el síndrome de Rabson-Mendenhall son dos síndromes que muestran mutaciones en el gen del receptor de insulina con alteraciones en su función. Otras anomalías se refieren a las vías de transducción de señales post-receptor de la insulina, como la diabetes lipoatrófica resistente a la insulina.

1. Resistencia a la insulina tipo A
2. Leprechaunismo
3. Síndrome de Rabson-Mendenhall
4. Diabetes lipoatrófica
5. Otros

C. Enfermedades del páncreas exócrino. Los procesos que dañan al páncreas pueden ocasionar diabetes. Los procesos adquiridos incluyen pancreatitis, trauma, infección, pancreatectomía y carcinoma pancreático.

D. Endocrinopatías. Las patologías con cantidades excesivas de hormonas que antagonizan la secreción de insulina (p.ej. hormona del crecimiento, cortisol, glucagon y epinefrina) pueden ocasionar diabetes. Esto ocurre generalmente en individuos con defectos preexistentes en la secreción de insulina, y la hiperglucemia se resuelve habitualmente cuando el exceso de hormona es controlado.

E. Diabetes inducida por drogas o compuestos químicos. Muchas drogas, como vacor, glucocorticoides, diazóxido y tiazidas, entre otras, pueden alterar la homeostasis de la glucosa. Estas drogas pueden no ocasionar diabetes por sí mismas, pero pueden precipitarla.

F. Infecciones. La rubéola congénita, el coxsackie virus B, el citomegalovirus, el adenovirus y las paperas se han relacionado con la inducción de la diabetes.

G. Formas no comunes de diabetes mediada por inmunidad. Los ejemplos son el síndrome del hombre rígido (stiff-man syndrome) y condiciones con anticuerpos anti-receptor de insulina.

H. Otros síndromes genéticos asociados en ocasiones con diabetes. Varios síndromes genéticos se acompañan de un aumento en la incidencia de diabetes mellitus. Estos incluyen las anomalías cromosómicas de síndrome de Down, Síndrome de Klinefelter, Síndrome Prader-Willi y síndrome de Turner. El síndrome de Wolfram es un desorden autonómico recesivo caracterizado por diabetes deficiente en insulina y la ausencia de células beta en la autopsia.

IV. DIABETES MELLITUS GESTACIONAL (GDM). La GDM se define como cualquier grado de intolerancia a la glucosa que inicia o es reconocida en primer lugar durante la gestación.

D.6.2.2 Diabetes mellitus tipo 1

El diagnóstico (hiperglucemia franca) de la diabetes tipo 1 ocurre una vez que el 70-80% de la masa de las células beta ha desaparecido. Sin embargo, la pérdida progresiva de células beta ocurre a través de los años mucho antes de desarrollarse la diabetes ⁷⁶. Este daño puede ocasionar una reducción en la primera fase de secreción de insulina que se presenta en pacientes que ya tienen anticuerpos contra el islote pero que aún no desarrollan hiperglucemia ^{76,77}. El daño a la célula beta varía entre pacientes, mientras que algunos sólo cursan con hiperglucemia moderada, otros evolucionan a hiperglucemia severa o cetoacidosis debido a la función remanente de sus células beta ^{76,78,79}.

La progresión de la diabetes tipo 1 después del inicio de la respuesta autoinmune se divide en dos fases: insulinitis y diabetes franca ⁸⁰. La apoptosis de las células beta se presenta en ambas fases ⁸¹, e incluso se ha propuesto que participa en la iniciación de la respuesta autoinmune por medio de la generación de autoantígenos ⁷⁷. Estos autoantígenos son reconocidos por células presentadoras de antígenos, que llegan a los nódulos linfáticos del páncreas y son reconocidas por las células T ⁸², iniciándose el proceso inflamatorio o insulinitis ^{83,84}.

Las células beta son capaces de producir y liberar citocinas en respuesta a factores inflamatorios como IL-1 β and IFN γ ^{77,78}. Estas citocinas, además de promover la muerte de las mismas células beta, también pueden contribuir al reclutamiento y activación de otras células inmunes ^{76,84}, sosteniendo el proceso inflamatorio localizado en el medio de la célula beta ⁸⁵. Una vez establecida la insulinitis, se establece una falla en la función de las células beta y una posterior destrucción selectiva de células beta ⁸⁶.

D.6.2.3 Diabetes mellitus tipo 2

La diabetes tipo 2 es de origen multifactorial. Entre los factores que contribuyen a su desarrollo están la obesidad, la edad, el origen étnico y la historia familiar. A pesar de tener un fuerte componente genético, el genotipo sólo establece las condiciones para que el individuo sea más o menos susceptible a los efectos ambientales y el estilo de vida ⁸⁷.

La diabetes tipo 2 surge cuando las células beta no logran secretar suficiente insulina para responder a la demanda ocasionada por la resistencia a la insulina, debido a una disfunción secretora adquirida de la célula beta y/o a una disminución en su masa ⁸⁸. A excepción de los pacientes con defectos en la señalización de insulina (como aquellos con mutaciones en el receptor de la insulina), todos los pacientes con diabetes tipo 2

poseen algún defecto en la capacidad de la célula beta para producir o secretar insulina⁸⁹.

La falla progresiva de la célula beta que se presenta en la diabetes tipo 2 puede deberse tanto a factores genéticos como a factores adquiridos. Los factores genéticos comprenden defectos en la expresión de los genes del metabolismo de la glucosa en la célula beta y los factores transcripcionales, mientras que los factores adquiridos incluyen el estrés oxidativo, la glucotoxicidad, la lipotoxicidad, el incremento en los depósitos de polipéptido amiloide del islote, la disfunción mitocondrial y la inflamación por citocinas⁸⁹ en la célula beta. La masa de las células beta también juega un papel fundamental para determinar si un individuo evolucionará hacia diabetes tipo 2 o sólo cursará con resistencia a la insulina⁶⁴. Al igual que para la diabetes tipo 1, se calcula que alrededor del 50% de la masa total de células beta está disminuida al momento del diagnóstico de la diabetes tipo 2⁸⁹.

Cuando el organismo se encuentra en un estado de alta demanda metabólica, como en la obesidad, el embarazo y la resistencia a la insulina, los islotes pancreáticos responden incrementando la secreción de insulina para mantener la normoglicemia, un proceso denominado compensación de la célula beta. Este estado se caracteriza por una expansión de la masa de la célula beta y un incremento en su función⁹⁰, aunado a una modificación de la arquitectura del islote⁹¹.

Se ha propuesto un modelo de cinco etapas detallando los daños que sufre la célula beta durante la progresión de la hiperglucemia y la diabetes (Tabla 2), describiendo diversas manifestaciones funcionales, cualitativas y anatómicas de este daño asociadas a la diabetes tipo 2. En conjunto estos daños disminuyen la capacidad de la célula beta para responder a las concentraciones de glucosa, ocasionando hiperglucemia franca⁷⁴. Así se inicia un círculo vicioso en el cual la exposición prolongada de la célula beta a la hiperglucemia la desensibiliza aún más y favorece su apoptosis, disminuyendo así su masa y generando un estado diabético severo⁸⁹, el cual conlleva una serie de complicaciones micro (ceguera, nefropatía, neuropatía diabética) y macrovasculares (ateroesclerosis, infarto al miocardio)⁹².

Tabla 2. Etapas propuestas de la disfunción de la célula beta durante la progresión hacia la diabetes tipo 2.

Modificada de Weir et.al. 2004 ⁷⁴

Etapa 1: Compensación (Normoglucemia)

Hipertrofia de las células beta
Hiperplasia de las células beta
Cambio hacia la derecha en la curva de tolerancia a glucosa (menor umbral de secreción)
Secreción de insulina en respuesta a glucosa normal o incrementada
Perfil de expresión de genes normal
Aumento de actividad de piruvato carboxilasa

Etapa 2: Adaptación estable (Hiperglucemia moderada, 90-125 mg/dL)

Pérdida de la primera fase de secreción de insulina
Secreción de insulina en respuesta a otros secretagogos (arginina) preservada
Reservas de insulina cercanas a la normalidad
Desdiferenciación temprana de la célula beta (pérdida de su fenotipo especializado)
Disminución en la expresión de los genes de GLUT2, glucocinasa, mGPDH, piruvato carboxilasa, VDCC, SERCA3, IP3R-II y factores transcripcionales como PDX-1, Nkx6.1 y Pax6
Aumento en la expresión de los genes de lactato deshidrogenasa (LDH), hexocinasa, glucosa-6-fosfatasa y el factor c-Myc

Etapa 3: Descompensación inestable temprana (Hiperglucemia franca 125-270 mg/dL)

Pérdida progresiva de la segunda fase de secreción de insulina en respuesta a glucosa
Pérdida de la secreción de insulina en respuesta a otros secretagogos
Relación aumentada de proinsulina/insulina secretadas
Disminución de las reservas de insulina intracelulares (degranulación de la célula beta)
Desdiferenciación severa de la célula beta
Disminución en la expresión de los genes de insulina, IAPP, GK, Kir6.2, SERCA2B, PPAR-alfa y TFbeta2
Aumento en la expresión de la glucosa-6-Pasa, 12-lipooxigenasa, COX-1, PPAR-gamma, FAS y C/EBPbeta
Aumento de genes de estrés como la iNOS, A20 y la Hemooxigenasa-1

Etapa 4: Descompensación estable (Glucemia en 270-360 mg/dL)

Apoptosis
Depósitos de amiloide
Gotas de grasa intracelulares
Depósitos de glucógeno
Fibrosis

Etapa 5: Descompensación severa (Glucemia > 360 mg/dL)

Cetoacidosis diabética por destrucción de la célula beta (característica en diabetes tipo 1)
Necesidad de insulina exógena para sobrevivir

D.7. La Biotina

La biotina es una vitamina hidrosoluble del complejo B cuya función en el organismo es ser grupo prostético de las carboxilasas, enzimas que catalizan reacciones de carboxilación dentro del metabolismo intermediario. Los humanos y otros mamíferos no pueden sintetizar esta vitamina, de modo que deben obtenerla de la dieta y, en menor medida, de la síntesis *de novo* realizada por las bacterias intestinales^{93,94}. La biotina fue descubierta cuando se observó que las ratas alimentadas con clara de huevo cruda desarrollaban dermatitis severa, alopecia y disfunción muscular. Se aisló un factor del hígado, llamado “Factor X”, que curaba esta condición. Tiempo después se identificó este factor como biotina, y se encontró que la clara de huevo cruda posee avidina, una glicoproteína que se une covalentemente a la biotina y previene su absorción. La constante de afinidad entre avidina y biotina es de 10^{-15} M, y sus propiedades se utilizan en una gran variedad de técnicas en biología molecular⁹⁵.

D.7.1 Características fisicoquímicas

El nombre químico de la biotina es ácido hexahidro-2-oxo-1H-tieno-[3,4-d]imidazol-4-pentoico. Es un ácido monocarboxílico con peso molecular de 244.31 g/mol, estable al calor, soluble en agua (0.02% p/v) y etanol (0.08% p/v) y susceptible a la oxidación⁹⁶. La estructura química de la biotina, elucidada en los años 40s, consiste en un compuesto bicíclico. Uno de sus anillos contiene un grupo ureido (-N-CO-N-) mientras que el otro anillo contiene azufre, formando un anillo de tetrahidrotiofeno, y una cadena de ácido valérico que le confiere su naturaleza ácida (pH4.51)⁹⁵. De los ocho posibles estereoisómeros de la biotina, solo uno de ellos se encuentra en la naturaleza y es enzimáticamente activo (la D-biotina)⁹⁴.

D.7.2 Metabolismo y farmacocinética

La biotina se encuentra ampliamente distribuida en los alimentos a bajas concentraciones. La jalea real y la levadura de cerveza la contienen en grandes cantidades. La leche, el hígado, la yema de huevo y los vegetales son las principales fuentes de biotina para el ser humano^{94,97}. La biodisponibilidad de la biotina dietaria varía de una fuente a otra, siendo cerca del 100% en el maíz y tan baja como 5% en el trigo⁹⁴. Sin embargo, cuando se administra oralmente en cantidades farmacológicas, su biodisponibilidad es del 100%⁹⁵.

D.7.2.1 Digestión y absorción

La biotina en los alimentos puede encontrarse libre o unida covalentemente a proteínas por un residuo de lisina. Una vez que la biotina es ingerida en la dieta, las proteínas unidas a la biotina son digeridas por peptidasas y proteasas hasta generar la biocitina, que es la biotina con un residuo de lisina y péptidos pequeños unidos a biotina (Fig. 10). La biotinidasa, una enzima presente en el jugo pancreático, rompe el enlace entre la biotina y la lisina, y la biotina libre se absorbe por los enterocitos de la porción distal del duodeno y la proximal del yeyuno. Al pH fisiológico, el grupo carboxilo de la biotina se encuentra cargado negativamente, por lo que la biotina requiere un transportador para cruzar las membranas plasmáticas. Este transportador es el SMVT (Transportador múltiple de vitaminas dependiente de sodio), que se encuentra en la porción apical de los enterocitos⁹⁴. El transporte de biotina por SMVT es dependiente de la temperatura y acoplado a sodio: en presencia de un gradiente de sodio, el transporte ocurre en contra de un gradiente de concentración⁹⁵.

El SMVT es una proteína transmembranal de 69kD que funciona como simportador electrogénico. Transporta biotina, ácido lipoico y ácido pantoténico junto con el sodio, con una estequiometría de 2:1 sodio-sustrato, es decir, por cada molécula de vitamina que entra a la célula, dos iones de sodio son cotransportados al interior de la misma⁹⁸. La afinidad del SMVT para el ácido pantoténico y ácido lipoico es de 1~4.9µM y de 1.6~5µM respectivamente, mientras que para la biotina es de 3~20µM^{98,99}.

Una vez que la biotina cruza la membrana apical, su salida del enterocito también se da a través de un transportador. Sin embargo, este transporte es independiente de sodio y la acumula biotina en contra de un gradiente de concentración, ésta sale libremente⁹⁵.

D.7.2.2 Absorción de biotina en los tejidos

Después de ser absorbida en el intestino, la biotina pasa al plasma, en el cual se puede encontrar libre en un 81% y unida a proteínas de manera covalente (12%) o reversible (7%)¹⁰⁰. La biotinidasa se ha propuesto como la principal proteína de transporte de biotina en la sangre humana y también se encuentra en la leche materna¹⁰¹. La biotina es absorbida de la circulación por los órganos periféricos. La cantidad biotina que se encuentra dentro de las células, ya sea en forma unida o libre, depende del balance entre su absorción, su liberación de apocarboxilasas, su incorporación a las mismas, su liberación de proteínas biotiniladas y su catabolismo⁹⁵ (Fig. 10). Aún existe controversia acerca de la existencia de reservas de biotina en los tejidos. Se sabe que existen reservas

de biotina en el hígado, aunque durante la deprivación de biotina no se ven reducidas por lo que al parecer no se movilizan demasiado. La biotina en el hígado se encuentra principalmente en la mitocondria y en el citoplasma, mientras que solo el 0.7% se encuentra en el núcleo ¹⁰².

El hígado es el órgano que absorbe la mayor cantidad de biotina para su metabolismo y utilización, y lo realiza a través del SMVT. Este mecanismo de transporte dependiente de sodio, similar al que se encuentra en los enterocitos, también está presente en otros tejidos como riñón, cerebro, corazón y placenta ⁹⁴.

Hay evidencia de que la biotina puede ser transportada por más de un acarreador. Se ha sugerido que existe un transporte de biotina de alta afinidad en células mononucleares de sangre periférica. La Km estimada para este transportador es de 2.6 nM, valor cercano a los niveles de biotina reportados en plasma de individuos sanos ¹⁰³.

D.7.2.3 Transporte de biotina intracelular

La biotina libre internalizada hacia la célula es utilizada por la mitocondria en reacciones de carboxilación. El mecanismo de transporte de biotina hacia la mitocondria se ha estudiado utilizando mitocondrias aisladas de hepatocitos, y se ha sugerido que es dependiente de pH. Se cree que la biotina entra al espacio intramitocondrial en su forma protonada (neutra), para posteriormente dissociarse en su forma aniónica (pKa = 4.5) en el pH alcalino de la mitocondria, con lo cual queda atrapada dentro de ella ⁹⁴.

D.7.3 Funciones de la biotina

En los mamíferos, la biotina actúa como cofactor de cuatro carboxilasas que participan en el metabolismo intermediario (Fig. 11). Estas carboxilasas dependientes de biotina son: piruvato carboxilasa (PC, EC 6.4.1.1), propionil-CoA carboxilasa (PCC, EC 6.6.1.3), β-metilcrotonil-CoA carboxilasa (MCC, EC 6.4.1.4) y acetil-CoA-carboxilasa (ACC, EC 6.4.1.2). De la acetil-CoA-carboxilasa existen dos formas genéticamente distintas, la ACC1 que se localiza en el citosol, y la ACC2 que se encuentra en la mitocondria. Estas enzimas catalizan la incorporación de bicarbonato, en forma de un grupo carboxilo, a sus respectivos sustratos ⁹⁵.

La biotina se une a las carboxilasas inactivas (apocarboxilasas) mediante una reacción de condensación dependiente de ATP, catalizada por la enzima holocarboxilasa sintetasa (HCS) (Fig. 10). Primero, se forma un intermediario de biotina y ATP, el biotinil-5'-adenilato. Posteriormente, el grupo carboxilo de la cadena de ácido valérico de la biotina y

el grupo ϵ -amino de una lisina en una región específica de la apocarboxilasa forman un enlace covalente. Estas regiones de las apocarboxilasas contienen residuos de aminoácidos altamente conservados entre especies. Una vez unidas a la biotina, las holocarboxilasas son capaces de formar un intermediario carboxifosfato en presencia de HCO_3^- y ATP, para de esta forma trasladar el CO_2 de la biotina al sustrato ^{94,95}.

La biotina unida a las holocarboxilasas se libera en forma de biocitina por degradación proteolítica de las holocarboxilasas. Esta biocitina puede ser reutilizada por otras carboxilasas, o catalizarse hacia biotin sulfóxido o a bisnorbiotina y posteriormente excretarse en orina (Fig. 10) ^{94,95}. La vida media de la biotina en la fase de eliminación lenta ($21.9 \pm 13.6\text{h}$) coincide con el rompimiento de las carboxilasas biotiniladas ¹⁰².

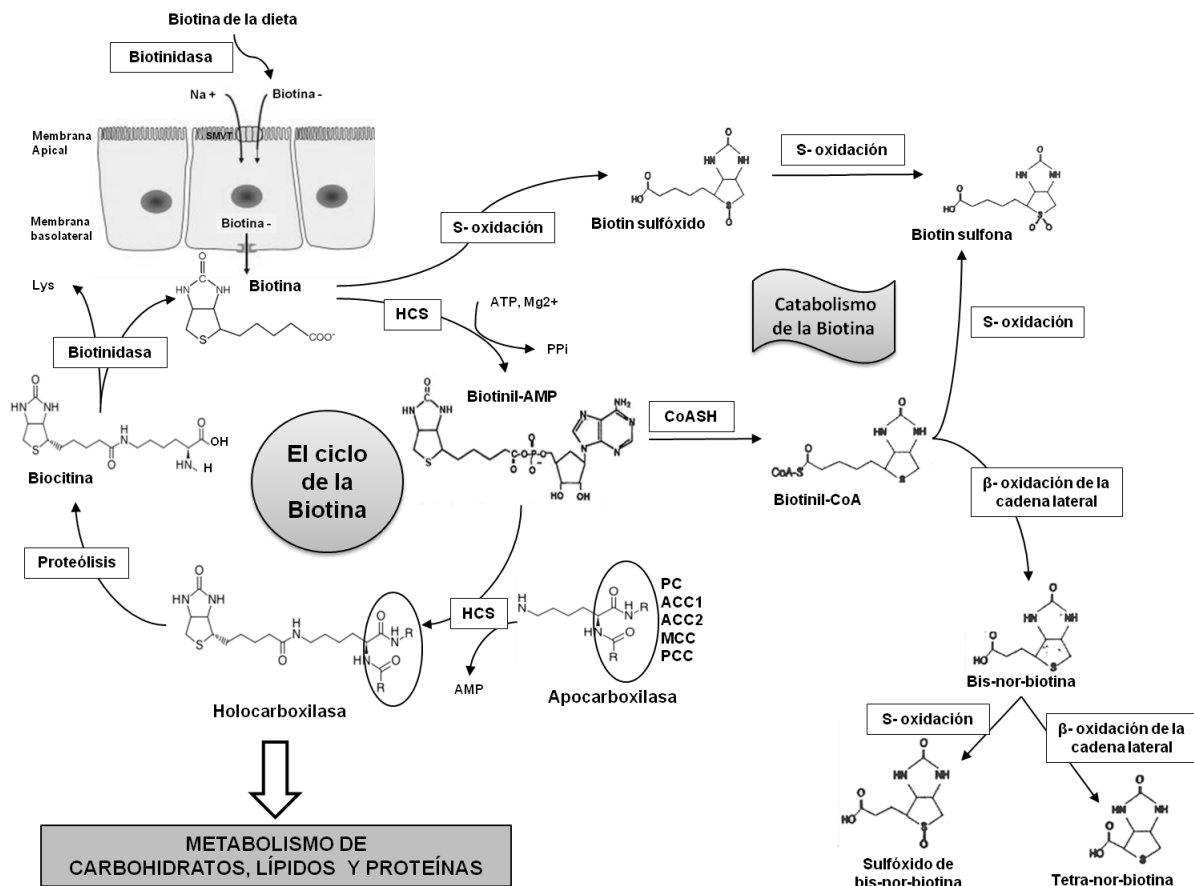


Figura 10. Transporte y metabolismo de la biotina.

D.7.4 Catabolismo de la biotina

En el organismo el catabolismo de la biotina ocurre con baja frecuencia. Una parte de la biotina libre se oxida, produciendo biotin sulfóxidos D y L, pero el anillo ureido no se degrada. La cadena lateral se metaboliza vía mitocondrial por una beta oxidación hacia bisnorbiotina y sus productos de degradación, bisnorbiotin sulfoxido y tetra nor biotina (Fig. 10)⁹⁵. La proporción de biotina libre excretada y sus metabolitos es de 3:2:1 (biotina libre, productos de oxidación de la cadena lateral y sulfóxidos). El catabolismo de biotina se ve acelerado en mujeres fumadoras¹⁰⁴ y durante el embarazo¹⁰⁵.

La biotina se excreta principalmente a través de la orina. Aproximadamente el 95% de la biotina de una dosis oral de 5mg/kg es excretada en la orina en 24 hrs. La biotina que no es absorbida va a las heces. Sin embargo, la mayoría de la biotina fecal es de origen microbiano, ya que las bacterias del intestino producen biotina y ésta también puede ser absorbida por el organismo. Debido a esta fuente bacteriana de biotina, la excreción urinaria puede llegar a exceder a la ingesta de biotina, particularmente en casos de suplementación con biotina para el tratamiento de deficiencias de esta vitamina¹⁰⁶.

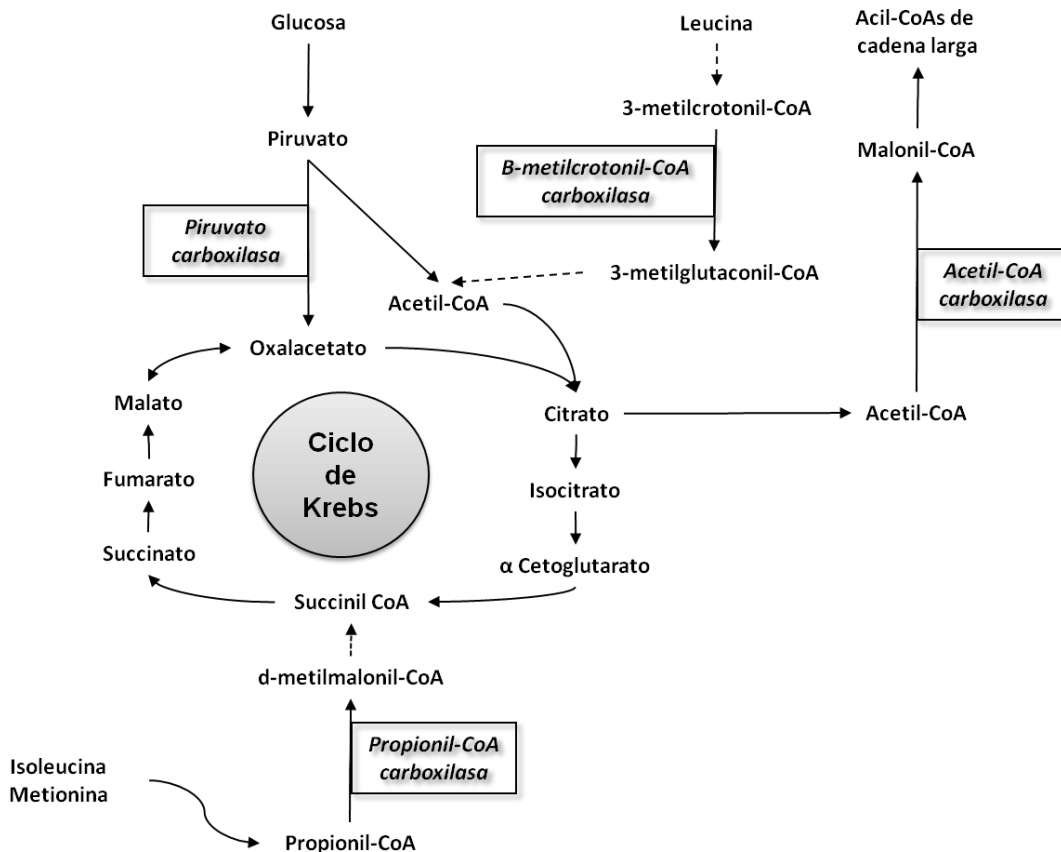


Figura 11. Las carboxilasas en el metabolismo de glucosa, lípidos y proteínas

D.7.5 Requerimientos de biotina y deficiencia de biotina

La dosis diaria recomendada de biotina no se encuentra claramente establecida debido a la incertidumbre de la contribución de la biotina sintetizada por las bacterias del intestino grueso, a la variabilidad en la evaluación de los niveles de biotina en el organismo y a la baja prevalencia de la deficiencia clínica de biotina^{94,95}. Sin embargo, se ha estimado una ingesta diaria recomendada de biotina de 35 µg para niños y 30 µg para adultos¹⁰⁷.

A excepción de los errores genéticos del metabolismo de la biotina, la deficiencia clínica de esta vitamina sólo ocurre en periodos largos de nutrición parenteral o de administración de fármacos anticonvulsivos^{94,95}. También se ha descrito deficiencia subclínica de biotina durante el embarazo¹⁰⁵, el alcoholismo¹⁰⁸ y en pacientes con enfermedad intestinal inflamatoria, dermatitis seborréica o enfermedad de Leiner⁹⁴. Se ha sugerido que en la diabetes mellitus puede existir una deficiencia, inactividad o no disponibilidad de la biotina¹⁰⁹.

Las manifestaciones clínicas de la deficiencia de biotina incluyen dermatitis periorificial, conjuntivitis, dolor muscular, alopecia, ataxia, retraso del desarrollo, actividad disminuida de carboxilasas dependientes de biotina, depresión, dermatitis descamativa, atrofia papilar lingual, erupción en ojos, nariz y boca, pérdida de pelo, cejas y pestañas y síndrome de muerte súbita del lactante. Estos síntomas mejoran con una dosis de biotina de 150-300 µg por 3 a 5 días¹⁰⁶.

Existen dos principales errores innatos del metabolismo de la biotina: la deficiencia de HCS y la deficiencia de biotinidasa. Ambos se deben a mutaciones en los respectivos genes de estas enzimas. La deficiencia de HCS o deficiencia múltiple de carboxilasas tipo neonatal se caracteriza por una capacidad limitada para biotinar las apocarboxilasas. Puede presentarse desde las primeras horas de vida postnatal hasta los 15 meses de edad. Algunos de sus síntomas son vómito, letargo e hipotonía muscular. Por otro lado, la deficiencia de biotinidasa o deficiencia múltiple de carboxilasas tipo juvenil se caracteriza por síntomas como rash, alopecia, conjuntivitis, ataxia y anormalidades en el desarrollo. Esta deficiencia de biotinidasa impide la liberación de biotina de los alimentos o de su reciclaje, y se presenta entre las 2 semanas postnatales a los 2 años de edad. El tratamiento para estos dos padecimientos son dosis farmacológicas de biotina, de entre 10 y 80 mg por día¹⁰⁶.

D.7.6 Toxicidad de la biotina

Existen pocos estudios acerca de la toxicidad de la biotina ^{108,110}. Sin embargo, la biotina no ha mostrado mutagenicidad o toxicidad en pruebas con bacterias ^{111,112}. En estudios en plantas, su potencial mutagénico fue a una dosis de 244.3 mg/ml ¹¹³. La LD₅₀ oral para ratas y ratones es de 10 g/kg de peso y 354 mg/g de peso respectivamente. La LD₅₀ intraperitoneal para ratas es de 29 mg/kg de peso, y la intravenosa para ratones es de 1g/kg ¹⁰⁸. Estudios de toxicidad subcrónica a corto plazo hasta en dosis de 353 mg/kg de peso ¹¹⁰ en roedores no han demostrado toxicidad, mientras que en humanos se han administrado dosis de hasta 50 mg/día durante 40 días sin observar efectos adversos ¹¹⁰.

A pesar de que la administración de biotina se ha considerado no tóxica ¹¹⁰, es necesario realizar estudios para reevaluar su uso como agente farmacológico, así como para caracterizar sus efectos a nivel de expresión génica y funciones fisiológicas.

D.8. Efectos de la suplementación con biotina

Independientemente de su papel como grupo prostético de las carboxilasas, en los últimos años se ha encontrado que concentraciones farmacológicas de biotina son capaces de modular la expresión génica ¹¹⁴. Además, se ha observado que posee diversos efectos sobre procesos sistémicos como el desarrollo ¹¹⁵, la reproducción ¹¹⁶⁻¹¹⁸ y el metabolismo ¹¹⁹ (ver anexo II).

D.8.1 Efectos de la suplementación con biotina sobre la expresión de genes

La biotina participa en la regulación de la transcripción de las enzimas que requieren de ella como grupo prostético o sustrato, como son la HCS, la ACC-1 y la PCC ^{120,121}. Sin embargo, estudios de microarreglos y de inmunoblotting de alto rendimiento han identificado miles de genes cuya expresión se ve modificada por concentraciones farmacológicas de biotina, tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional ^{122,123}. La mayoría de estos son proteínas que no necesitan a la biotina como cofactor, y participan en diversos procesos sistémicos.

La suplementación con biotina modula también la expresión de genes críticos en la homeostasis de la glucosa. Genes como la glucocinasa hepática ¹²⁴ y el receptor de insulina ¹²⁵ aumentan su expresión en respuesta a la suplementación con biotina, mientras que genes gluconeogénicos como la PEPCK ¹²⁶ y glucosa-6-fosfatasa, así como los factores transcripcionales HNF-4alfa y FoxO-1 ¹²⁷ disminuyen su expresión.

La biotina también aumenta la expresión de genes del islote pancreático. Estudios en nuestro grupo ^{128,129} han encontrado que la suplementación con biotina incrementa la actividad y la expresión de la glucocinasa pancreática en islotes aislados de rata. Esta enzima es el paso limitante en la secreción de insulina en respuesta a los cambios en las concentraciones de glucosa sanguínea ²³ y un factor determinante en la masa y la regeneración de la célula beta ¹³⁰. Efectos similares sobre la glucocinasa fueron observados en la línea celular de insulinoma RIN 1046-38 ¹³¹. La expresión del gen de la insulina ¹²⁹ y del factor transcripcional PDX-1, determinante en el desarrollo pancreático ¹³², también se incrementan con la suplementación con biotina.

Estudios recientes en nuestro grupo encontraron que el mecanismo por el cual la suplementación con biotina incrementa la expresión de glucocinasa involucra un aumento en la secreción de insulina por la vía de señalización GMPc/PKG, la cual aumenta el ATP, despolarizando la membrana. La secreción de insulina aumenta el mRNA de la glucocinasa por medio de la señalización autocrina de la insulina, mediada por la vía de PI3K/Akt ¹²⁸.

D.8.2 Efectos de la suplementación con biotina sobre la secreción de insulina

En estudios *in vitro* realizados por nuestro grupo ^{128,129} y otros ^{133,134} se ha encontrado de manera consistente que la exposición aguda a dosis farmacológicas de biotina incrementa la secreción de insulina en respuesta a glucosa. Este efecto se ha observado tanto en cultivos primarios de islotes ¹²⁹, como en perfusión de páncreas total ¹³⁴ o islotes pancreáticos ¹³³. El cultivo de islotes con una dosis de 1 a 10 $\mu\text{mol/l}$ de biotina durante un tiempo de 30 min a 24 hr incrementa la secreción de insulina tanto a concentraciones basales (5.5 mmol/l) como estimulatorias (16 mmol/l) de glucosa ^{128,129,133}. La biotina es la única vitamina del complejo B que incrementa la secreción de insulina ¹³³, efecto que ha demostrado ser dependiente de la dosis de biotina ¹³⁴.

D.8.3 Efectos de la suplementación con biotina en diabetes

En concordancia con sus efectos sobre el metabolismo de glucosa y la secreción de insulina, diversos estudios han encontrado que la administración de dosis farmacológicas de biotina disminuye la hiperglucemia tanto en pacientes ¹³⁵⁻¹³⁷ como en modelos diabéticos ¹³⁸⁻¹⁴⁰, aunque estos efectos no se han observado en todos los estudios ¹⁴¹⁻¹⁴³.

En pacientes con diabetes tipo 1 sin complicaciones clínicas a los cuales se suplementó con 16 mg/día de biotina durante una semana, suspendiendo la administración de insulina

exógena, la glucosa en ayuno disminuyó de forma significativa.¹³⁵ En estudios en pacientes japoneses con diabetes tipo 2, la administración oral de 9 mg/día de biotina durante un mes mejoró la tolerancia a la glucosa y disminuyó la hiperglucemia en ayuno, efecto que se revirtió al suspender la administración de biotina¹³⁶. En pacientes de hemodiálisis, dosis de 50 mg/día de biotina por 2 meses mejoraron también la tolerancia a la glucosa¹³⁷. Estudios en nuestro laboratorio encontraron que la administración de 15 mg/día de biotina durante 28 días a pacientes con diabetes tipo 2 (hiperglucemia moderada) no produjo cambios en las concentraciones de glucosa en ayuno^{142,143}. La discrepancia entre los estudios puede deberse a la variabilidad genética y/o a diferencias en la dosis de biotina suministrada, el tipo de diabetes, o complicación clínica de las poblaciones de pacientes en las que fueron realizados.

La suplementación con biotina también disminuye la hiperglucemia en modelos animales de diabetes. En ratones de la cepa KK no obesos, un modelo animal de diabetes tipo 2 moderada caracterizado por resistencia a la insulina, el tratamiento con 2 y 4 mg/kg de peso de biotina durante 10 semanas disminuyó la glucemia post-prandial, mejorando la tolerancia a la glucosa. Además, a las dosis de 4 mg/Kg se observó una disminución de la insulina plasmática. Estos estudios también encontraron que el tratamiento con biotina aumenta la sensibilidad a la insulina¹³⁹. Otro estudio encontró que la tolerancia a la glucosa de las ratas con diabetes inducida con estreptozotocina mejora parcialmente con el tratamiento durante 15 días con biotina (100 µg/día)¹³⁸. Efectos similares se observaron en las ratas OLETF, una cepa que desarrolla características de diabetes tipo 2 espontáneamente, como obesidad moderada, polidipsia, poliuria e hiperglucemia en etapas tardías. En este modelo, la suplementación con biotina (7.44 mg/kg de alimento) durante 9 semanas también mejoró la tolerancia a la glucosa¹⁴⁰. Sin embargo, otros estudios no han encontrado efectos de la suplementación con biotina (60µg/kg de peso) sobre la tolerancia a la glucosa ni en ratas diabéticas ni en un modelo de ratas con hipertensión espontánea¹⁴¹. Las bajas concentraciones de biotina usadas en este estudio pueden ser la razón de las diferencias observadas en comparación con otros estudios.

La evidencia de que la biotina tiene efectos favorables sobre el metabolismo de glucosa ha llevado al desarrollo de medicamentos que contienen biotina recomendados para el tratamiento de la diabetes tipo 2¹⁴⁴⁻¹⁴⁸. Estos productos contienen concentraciones farmacológicas de biotina que representan de 40 a 166 veces más la ingesta de biotina recomendada¹⁰⁷.

E. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E IMPACTO DEL TRABAJO

La diabetes mellitus se ha posicionado como una de las enfermedades con mayor prevalencia no sólo en México, sino también a nivel mundial, alcanzando proporciones epidémicas. Esta enfermedad se ha convertido en un grave problema de salud pública, representando un alto costo personal y económico no sólo para los enfermos y sus familias, sino también para los sistemas de salud. Por estas razones, el estudio de nuevas estrategias para la prevención y el tratamiento de la diabetes es indispensable.

La investigación en el campo de las vitaminas ha llevado al desarrollo de nuevos agentes terapéuticos para diferentes enfermedades ^{149,150} incluyendo la diabetes ¹⁵¹. La vitamina biotina es un agente prometedor que podría generar nuevas perspectivas en el desarrollo de agentes terapéuticos para combatir a la diabetes.

El efecto de la biotina a concentraciones farmacológicas sobre el incremento en la expresión de genes que favorecen la captación ¹²⁵ y el metabolismo de la glucosa ¹²⁴, así como la reducción en la expresión de genes de acción hiperglucemiante ¹²⁶, sugiere que esta vitamina modifica funciones reguladoras en los diferentes tejidos que participan en la homeostasis de la glucosa. Estos efectos concuerdan con varias observaciones que indican que a dosis farmacológicas, la biotina disminuye la hiperglucemia y mejora el estado diabético ¹³⁵⁻¹⁴⁰.

Actualmente existen en el mercado suplementos vitamínicos que contienen cantidades farmacológicas de biotina y han sido utilizados como coadyuvantes en el tratamiento de la diabetes ¹⁴⁴⁻¹⁴⁸. Sin embargo, aún es necesario caracterizar y profundizar sobre los efectos que esta vitamina pudiese tener sobre la regulación de la homeostasis de la glucosa y evaluar la utilidad de la biotina para su uso dentro del tratamiento de la diabetes.

Existen pocos estudios acerca del efecto de la biotina sobre el páncreas endocrino, uno de los tejidos participantes en la regulación de las concentraciones de glucosa sanguíneas. Estudios hechos por nuestro grupo ^{128,129} y otros ^{133,134} han encontrado que la biotina a concentraciones farmacológicas incrementa la secreción de insulina en respuesta a glucosa. No obstante, dichos estudios se han realizado en sistemas *in vitro* y con suplementación con biotina de manera aguda.

Dada la importancia de las células beta para el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa, así como para la prevención y el desarrollo de diabetes, en el presente trabajo se

investigaron los efectos *in vivo* de una suplementación crónica con biotina en la dieta sobre la homeostasis de la glucosa y los factores que determinan el funcionamiento de la célula beta: la secreción de insulina, la expresión de genes y la masa de las células beta.

Con los resultados del presente trabajo nos proponemos ahondar en el conocimiento de los mecanismos y los efectos de la biotina sobre el metabolismo de la glucosa a nivel de las células beta, generando bases científicas que apoyen el uso potencial de la biotina como un coadyuvante tanto en la prevención como en el tratamiento de la diabetes mellitus.

F. HIPOTESIS

La suplementación crónica *in vivo* con dosis farmacológicas de biotina mejora la homeostasis de la glucosa en ratones, a través de un incremento en la funcionalidad de las células beta.

G. OBJETIVO GENERAL

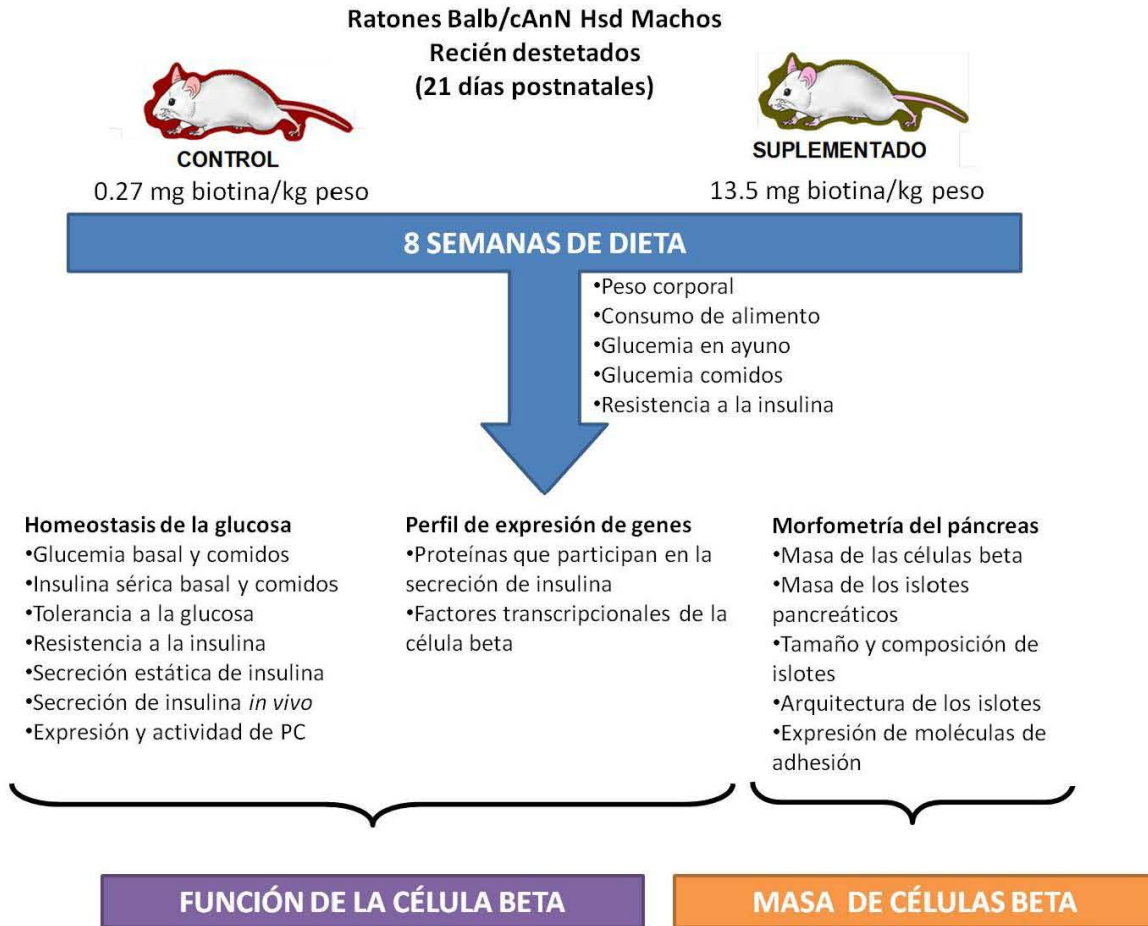
Determinar los efectos de la suplementación con biotina en la dieta sobre la homeostasis de la glucosa y la funcionalidad de las células beta en un modelo de ratones sanos.

H. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar los efectos de una suplementación crónica con biotina en la dieta sobre la homeostasis de la glucosa.

2. Determinar el efecto de la suplementación con biotina sobre la funcionalidad de las células beta, evaluando:
 - a) La secreción de insulina en respuesta a glucosa
 - b) La expresión de genes que participan en el funcionamiento de las células beta y factores transcripcionales que mantienen el fenotipo diferenciado de éstas
 - c) La masa de las células beta y la morfología de los islotes pancreáticos

I. DISEÑO EXPERIMENTAL



J. MATERIAL Y MÉTODOS

J.1. Modelo animal

Ratones macho de la cepa BALB/cAnN de tres semanas de edad recién destetados se mantuvieron en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM bajo ciclos de luz-obscuridad de 12 h, con libre acceso a agua y alimento durante todo el periodo experimental, a excepción de los periodos de ayuno. Los procedimientos fueron aprobados por el comité de Ética y Experimentación del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Diez lotes de 10 a 20 ratones por grupo experimental de distintas camadas recibieron una dieta control o una dieta suplementada durante ocho semanas. El grupo control recibió una dieta con 1.76 mg de biotina/kg alimento (TD-01362, Harlan Teklad); el grupo suplementado recibió la misma dieta conteniendo 97.7 mg de biotina/kg de alimento (TD-01363, Harlan Teklad). La información completa de la dieta ha sido publicada previamente ¹⁵² (anexo X). La dieta control proporciona suficiente cantidad de biotina para cubrir las necesidades metabólicas de los ratones ¹⁵³, mientras que la dieta suplementada contiene una cantidad de biotina 55.6 veces la concentración del control, proporción comparable a la que aportan los suplementos vitamínicos de biotina recomendados para diabetes ^{144,148}.

El peso corporal y el consumo de alimento se determinaron cada semana en todos los lotes de ratones. Posterior a las ocho semanas de alimentación con las dietas, los ratones se ayunaron por 16 h, se anestesiaron con Sevoflurano (Sevorane, Abbott) y se les extrajo sangre y el páncreas, este último para su fijación en paraformaldehído o para la aislamiento de islotes pancreáticos. Al finalizar la extracción, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical.

J.2. Medición de biotina en suero

Al término de las ocho semanas de administración con las dietas de biotina, se colectaron muestras de sangre de la vena de la cola de 4 ratones por grupo experimental de un lote. La sangre se colocó en tubos de polipropileno y se centrifugaron a 10000xg a 4°C durante 10 min. El suero se recuperó y almacenó a -20°C. Las concentraciones de biotina en suero se cuantificaron utilizando un kit comercial de ELISA EIA para biotina (ALPCO Diagnostics) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. La absorbancia se midió utilizando un espectrofotómetro para microplacas Labsystems Multiskan MS plate reader (Labsystems). Todas las muestras se midieron por duplicado.

J.3. Medición de glucosa en sangre

Se midieron las concentraciones de glucosa en sangre a lo largo del periodo de administración de biotina durante cada semana para glucosa en animales alimentados de un lote. En otro lote de ratones, se cuantificó cada dos semanas la glucosa en ratones en ayuno, para evitar periodos consecutivos de ayuno. Estas mediciones se realizaron en muestras de la vena de la cola utilizando un sistema portátil de medición de glucosa (glucómetro) (Precision QID, MediSense, Inc., Abbott Laboratories).

J.4. Medición de insulina en plasma

Al término de las ocho semanas de alimentación, se colectaron muestras de sangre de un lote de ratones en tubos de polipropileno con 5 μ l de heparina y 5 μ l de inhibidor de proteasas Complete® (Roche). Los tubos se centrifugaron a 10000 x g durante 10 min a 4°C. El plasma se separó y se almacenó a -20° C. Las concentraciones de insulina se midieron por ELISA, usando un kit ALPCO (ALPCO Diagnosis), de acuerdo al protocolo de 25 μ l proporcionado por el proveedor. La absorbancia se midió usando un lector de placas de ELISA Labsystems Multiskan MS (Labsystems). Todas las mediciones se hicieron por duplicado. Los rangos de detección se encontraban entre 3.47-173.6 pmol/l.

J.5. Curvas de tolerancia a la glucosa y secreción de insulina

Al finalizar el periodo de ocho semanas de administración de las dietas, en tres lotes de ratones se realizaron curvas de tolerancia a la glucosa. Los ratones se mantuvieron en ayuno durante 16 h y se les inyectó glucosa intraperitoneal a una dosis de 2 g/kg peso. Se midieron las concentraciones de glucosa en sangre de la vena de la cola utilizando un glucómetro (Precision QID, MediSense, Inc., Abbott Laboratories) antes de la inyección y a los 15, 30, 60 y 120 minutos posteriores a la inyección de glucosa. El área bajo la curva se determinó utilizando el software Microcal Origin 6.0 software (Microcal Software, Inc.). Las curvas se realizaron.

Adicionalmente, en tres lotes de ratones se colectaron muestras de la vena de la cola durante la curva de tolerancia a glucosa para la medición insulina en plasma antes (tiempo 0) y a los 15, 30 y 45 minutos posteriores a la inyección de glucosa. La concentración de insulina se determinó mediante un kit comercial de ELISA (ALPCO Diagnostics).

J.6. Curvas de tolerancia a la insulina

Cada semana, y al finalizar el periodo experimental de ocho semanas, se llevaron a cabo curvas de tolerancia a la insulina en tres lotes de ratones. Los ratones se encontraban alimentados *ad libitum* al inicio de la curva. Las concentraciones de glucosa se midieron en muestras de sangre de la cola antes de la inyección intraperitoneal (tiempo 0) y a los 15, 30, 60 y 90 minutos posteriores a la inyección de 1 IU/kg de Insulina regular humana (Humulin, Laboratorios Eli Lilly). Las concentraciones de glucosa se determinaron usando un glucómetro (Precision QID, MediSense, Inc., Abbott Laboratories).

J.7. Aislamiento de islotes pancreáticos

El páncreas extirpado se limpió de grasa y sangre. Se colocaron de 3 a 5 páncreas en un vaso de precipitados con 10 mL de solución de Hank's con BSA y antibiótico (Gibco) y se fragmentaron con tijeras. Posteriormente, se digirieron con colagenasa IV (Sigma) (0.3 mg por cada páncreas), en un baño de agua durante aprox. 10 min a 37°C con agitación constante. Los islotes pancreáticos se separaron del tejido acinar utilizando un gradiente de Ficoll. La fracción de islotes se lavó con solución de Hank's, y los islotes se recolectaron del medio bajo un microscopio estereoscópico.

J.8. Medición de la secreción estática de insulina

Grupos de 20 a 30 islotes de tamaños similares, aislados de tres lotes de ratones, se cultivaron toda la noche a 37°C y 5% de CO₂ en medio DMEM libre de biotina (11 mmol/l glucosa, 400 U/ml penicilina, 200 mg/l estreptomycin y 10% SBF dializado, Gibco). Posteriormente, los islotes se preincubaron por 30 min en una solución de Hank's con 0.5% de BSA (p/v) y 3 mmol/l de glucosa. Los islotes se incubaron después por una hora en solución de Hank's con 5.6 mmol/l (baja glucosa) o 15.6 mmol/l de glucosa (alta glucosa). El medio se recuperó y se midió la insulina en él usando un kit de ELISA para insulina comercial de ELISA (ALPCO Diagnostics).

J.9. Medición de expresión relativa de mRNA

El RNA total de 8 grupos de 200 islotes aislados de 4 lotes de ratones se extrajo utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen). La cantidad y pureza del RNA fueron determinadas por espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 280 y a 260 nm. La integridad de las muestras fue analizada por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%. Se evaluó la abundancia del mRNA del gen de la insulina, así como de genes cuyas proteínas participan en el mecanismo de secreción de insulina (Glut2, Glucocinasa, Cacna1d, Sur1)

o en la respuesta autocrina de la insulina (receptor de insulina). Se evaluaron también factores transcripcionales que regulan la transcripción del gen de insulina de manera importante, como Pdx1, Foxa2 y Hnf4alfa. Los genes de la piruvato carboxilasa y la acetil coA carboxilasa, enzimas dependientes de biotina y que participan en la secreción de insulina independiente de K_{ATP} también fueron analizados. Asimismo, se evaluaron otros factores transcripcionales cuya expresión alterada se asocia a disfunción de la célula beta (PPARs, SREBP1c). La información de las sondas utilizadas se encuentra en tabla 3. La expresión relativa del mRNA se evaluó por RT-PCR en tiempo real con los materiales y métodos proporcionados por Applied Biosystems. Las muestras se analizaron por triplicado. La expresión relativa de los genes de interés se analizó con el método $\Delta\Delta Ct$ ¹⁵⁴, usando la subunidad 18S del RNA ribosomal como control interno y normalizando los resultados con respecto a la expresión en el grupo control.

Tabla 3. Sondas Taqman utilizadas para la determinación de la expresión de RNAm en islotes de ratón por medio de RT-PCR en tiempo real.

Nombre del gen	Símbolo	Número de sonda
Insulin 2	<i>Ins2</i>	Rn01774648_g1
Pancreatic and duodenal homeobox 1	<i>Pdx1</i>	Mn00435565_m1
Hepatic nuclear factor 4, alpha	<i>Hnf4a</i>	Mm00433964_m1
Forkhead box A2	<i>Foxa2</i>	Mm00839704_mH
Solute carrier family 2 (Glut2)	<i>Slc2a2</i>	Rn00563565_m1
Glucokinase	<i>Gck</i>	Rn00561265_m1
Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit	<i>Cacna1d</i>	Mm00551384_m1
ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 8 (Sur1)	<i>Abcc8</i>	Mm00803450_m1
Acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha (ACC1)	<i>Acaca</i>	Rn00672936_g1
Pyruvate carboxylase	<i>Pcx</i>	Mm00500992_m1
Insulin Receptor	<i>Insr</i>	Mm00439693_m1
Peroxisome proliferator activated receptor alpha	<i>Ppara</i>	Mm00440939_m1
Peroxisome proliferator activated receptor gamma	<i>Pparg</i>	Rn00440945_m1
Sterol regulatory element binding transcription factor 1 (SREBP1c)	<i>Srebf1</i>	ATOVARPE1-PE1
Neural cell adhesion molecule 1	<i>Ncam1</i>	Mn00456815_m1
Cadherin 1 (E-cadherin)	<i>Cdh1</i>	Mm01247357_m1
Beta-Actin	<i>Actb</i>	Rn00667869_m1

J.10. Inmunohistoquímica y análisis morfométricos

Los páncreas extraídos de dos ratones de tres lotes diferentes se fijaron durante 24 h en paraformaldehído al 4% en PBS 2x, se deshidrataron en una serie de concentraciones crecientes de etanol y xilol (etanol al 50°, 70°, 90°, 96° y 100°, etanol 100°/xilol y xilol puro, 1h en cada uno), y se embebieron en parafina (Paraplast, Sherwood Medical Co.) durante 1 h. Los páncreas se montaron en cassetes para histología y se hicieron cortes

consecutivos de 5 μm de grosor. Los cortes se montaron en laminillas tratadas con polilisina-L (Sigma-Aldrich).

Las laminillas se desparafinaron y rehidrataron con una serie de xilol y etanol en el orden inverso al utilizado en la deshidratación durante 4 min en cada dilución y se lavaron con PBS 1x por 5 min. Se realizó la recuperación de antígeno hirviendo las laminillas en buffer de citratos (pH6) durante 10 min a 90°C. Posteriormente se permeabilizaron con suero normal de cabra al 3% y Tritón X-100 al 0.3% durante 30 min, y se incubaron durante toda la noche con los anticuerpos: cobayo anti-insulina (1:1000, Linco) y/o ratón anti-glucagon (1:6000, Sigma), diluidos en PBS 1x con suero normal de cabra al 1%. Para el análisis de proliferación se utilizó el anticuerpo conejo anti-PHH3 (1:250, Cell Signaling), un marcador de mitosis¹⁵⁵. Después de la incubación las laminillas lavaron 3 veces con PBS1x durante 3 min y se incubaron por 1 hr con los anticuerpos secundarios: anti- IgG de cobayo conjugado con FITC (1:200) ó Cy3 (1:800) para la detección de insulina, anti- IgG de ratón conjugado con Cy3 (1:800) para la detección de glucagon y anti- IgG de conejo conjugado con FITC (1:200) para la detección de PHH3. (Jackson Immunoresearch). Los núcleos se tiñeron con DAPI durante 1 min. Finalmente, se lavaron las laminillas con PBS1x por 5 min tres veces y se cubrieron con cubreobjetos montados con medio para montaje fluorescente (Dako).

El análisis morfométrico se realizó en 2 laminillas de cada ratón, en un total de 5 ratones por grupo. Las laminillas se analizaron utilizando un microscopio Olympus 1X70 (Tokyo, Japón) acoplado a una lámpara de halógeno y se adquirieron las imágenes de todos los islotes observados en el corte con una cámara Hammamatsu (Hammamatsu City, Japan) utilizando los mismos parámetros de configuración para todas las laminillas. Se cuantificaron las áreas de los islotes y las células positivas a insulina (células beta) así como el área total del corte, usando el software Image J 1.40 (Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD). La distribución de las células en el islote (arquitectura) se evaluó mediante la cuantificación del porcentaje de los islotes con una o más células alfa alejadas a más de tres capas celulares de la periferia del islote¹⁵⁶.

J.11. Medición de la actividad de Piruvato carboxilasa

Para los ensayos a corto plazo, grupos de 200 islotes de ratón adulto (11 semanas) se cultivaron durante 24 hrs en placas de 24 pozos con medio DMEM conteniendo 50 ó 500 nM de biotina, equivalente a las concentraciones de biotina en suero encontradas en los ratones control y suplementados (13.46 y 144.11 ng/mL respectivamente). Para la

medición de actividad de piruvato carboxilasa en islotes de ratones a los cuales se administraron las dietas de biotina, grupos de 100 islotes recién aislados de dos lotes de ratones se congelaron a -80° hasta su uso.

La actividad de la piruvato carboxilasa (PC) se realizó por un método radioenzimático de acuerdo a Burri et. al.¹⁵³, que consiste en la incorporación de $H^{14}CO_3$ en el producto de la PC, ^{14}C -ácido oxaloacético, que se transforma posteriormente a ácido cítrico. El $H^{14}CO_3$ que no reaccionó se elimina de la muestra como CO_2 por acidificación y desecación. Para realizar el ensayo, las muestras se homogenizaron en buffer de lisis (Hepes 10 mmol/l, Sacarosa 250 mmol/l, EDTA 25 mmol/l, L-cisteína 2 nmol/l y BSA 0.02% p/v). Posteriormente se sonicaron con un ultrasonificador (4710 Series; Cole Parmer Instruments Co.) y se determinó la actividad de PC en 10 μ L de cada muestra por duplicado usando $NaH^{14}CO_3$, contenido en 10 μ L de una mezcla de reacción con concentraciones finales de 100 mM Tricina pH 8, 0.5 mM Na_2EDTA , 50 mM KCl, 6 mM $MgCl_2$, 2.5 mM Glutación, 3.3 mM ATP, 10 mM $NaH^{14}CO_3$ (0.265 GBq/mmol), 0.9 mM Acetil-CoA, 4.5 mM Piruvato de Sodio y 23.25 IU/mL de citrato sintasa. Los resultados se reportan como nmol de CO_2 fijado/min/mg proteína total. El contenido de proteína se cuantificó por el método de Bradford¹⁵⁷.

J.12. Análisis de crecimiento y proliferación celular

Para evaluar el crecimiento y la proliferación celular en respuesta a biotina, se utilizó la línea de células beta de ratón MIN6, proporcionada por el Dr. Michael German. Para su mantenimiento, la línea celular se creció en medio DMEM de alta glucosa (16mM) suplementado con Penicilina-estreptomicina (100 U/l – 100 mg/l), 2-mercaptoetanol (71.5 μ M) y SBF al 15% (Gibco). Se sembraron 5×10^4 células en frascos de 25 mL y se mantuvieron a $37^{\circ}C$ con 5% de CO_2 . Para los experimentos se utilizaron células de entre 30 y 35 pasajes. Con el fin de evaluar la funcionalidad de la línea celular y el efecto de la biotina sobre la misma, se evaluó la secreción de insulina en placas con 3×10^5 células MIN6, como se describe anteriormente.

Para los ensayos de crecimiento celular, 5×10^4 células MIN6 se sembraron en placas de 12 pozos con medio DMEM conteniendo 0, 10, 50 y 500 nM de biotina. El crecimiento celular se evaluó a las 24, 48 y 72 hrs de cultivo con biotina, mediante el conteo de células viables en el hemocitómetro utilizando azul de Tripano (Gibco), el cual es excluido de las células vivas.

Para determinar el índice de proliferación celular, se sembraron 1.5×10^6 células MIN6 sobre cubreobjetos circulares tratados con gelatina de cola de cerdo al 0.1% en placas de 24 pozos. Se incubaron 24 horas para dejar que se adhirieran al cubreobjetos, y se incubaron 72 hrs en medio DMEM con 0, 0.75, 10, 50 y 10 nM de Biotina. Posteriormente, se fijaron las células sobre el cubreobjeto con paraformaldehído al 4% y se incubaron con anticuerpos primarios para insulina y PHH3 durante toda la noche a 4°C. Después de lavar con PBS1x, se incubaron con anticuerpos secundarios anti- IgG de cobayo conjugado con FITC (1:200) para la detección de PHH3, y anti- IgG de ratón conjugado con Cy3 (1:800) para la detección de insulina (Jackson Immunoresearch,). Los núcleos se tiñeron con DAPI durante 1 min. Los cubreobjetos se adhirieron con medio de montaje a portaobjetos, y se dejaron secar toda la noche a 4°C. El porcentaje de proliferación celular se determinó contando todas las células positivas para PHH3 en 10 campos del cubreobjetos, y dividiéndolo entre el total de núcleos. Cada tratamiento se cuantificó por triplicado.

J.13. Análisis estadístico

Los datos representan la media \pm ES. n es el número de muestras o sujetos evaluados. El análisis estadístico se realizó utilizando del software Statview V.4.5 (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA). Los datos se analizaron por medio de una prueba de t de Student o un ANOVA de dos vías. Los valores de p menores a 0.05 son considerados como estadísticamente significativos.

K. RESULTADOS

K.1. Efectos de la suplementación con biotina sobre la ingesta de alimento, el consumo de biotina y las concentraciones de biotina en sangre

La suplementación con biotina no modificó el peso corporal de los ratones (control: 24.7 ± 0.2 g, suplementado: 25.1 ± 0.5 g). Al finalizar el periodo de ocho semanas de administración de las dietas de biotina, la ingesta diaria promedio de alimento fue de 0.12 ± 0.015 g de alimento/g peso corporal para el grupo control y 0.12 ± 0.003 g de alimento/g peso corporal para el grupo suplementado. De manera que la ingesta diaria de biotina correspondió a 0.84 ± 0.1 μ mol de biotina/kg peso corporal para el grupo control y 48.16 ± 1.1 μ mol de biotina/kg peso corporal para el grupo suplementado. Como se esperaba, en respuesta al incremento de biotina en la dieta, las concentraciones de biotina circulantes en el suero de los ratones del grupo suplementado se incrementó de manera significativa comparada con el grupo control (Fig.12).

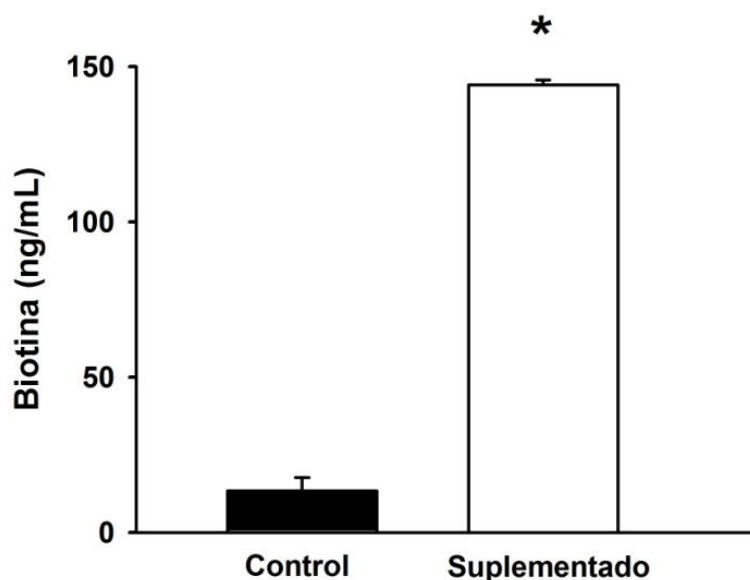


Figura 12. La suplementación con biotina en la dieta incrementa la concentración de biotina en suero.

Concentraciones de biotina en suero a las ocho semanas de suplementación con biotina en la dieta, medidas por ELISA. Los datos representan la media \pm ES. $n=4$ ratones por grupo. * $p < 0.0001$ comparado con el control.

K.2. Efectos de la suplementación con biotina sobre la secreción estática de insulina

Para evaluar si la suplementación con biotina *in vivo* es capaz de incrementar la secreción de insulina, tal como se ha observado en los estudios *in vitro* ^{128,129,133,134}, se midió la secreción de insulina estática en respuesta a glucosa de islotes aislados de ratones control y suplementados con biotina. De acuerdo con una secreción adecuada en respuesta a la glucosa por parte de los islotes control, la secreción de insulina a alta glucosa duplicó la secreción basal o a baja glucosa. En los islotes de ratones suplementados con biotina, la secreción de insulina aumentó significativamente, tanto a concentraciones de baja como de alta glucosa (Fig. 13).

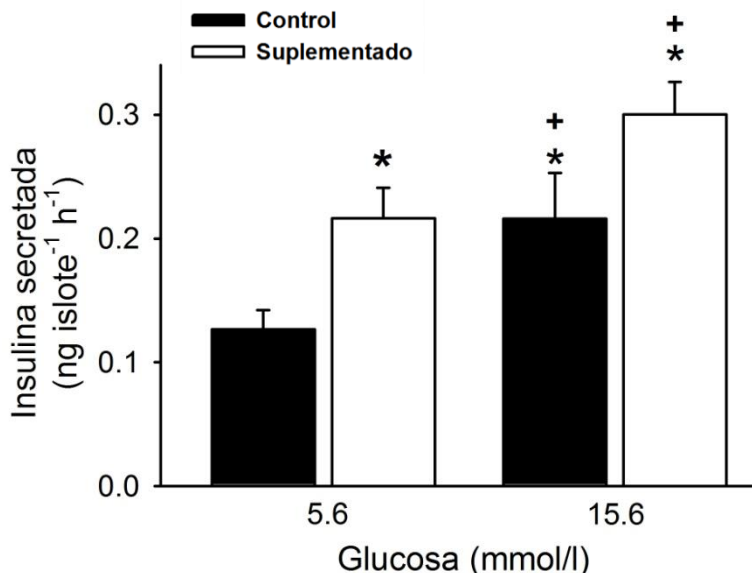


Figura 13. La suplementación con biotina en la dieta incrementa la secreción de insulina.

Secreción de insulina en respuesta a glucosa en grupos de 20-30 islotes pancreáticos de ratones control (barras negras) y suplementados (barras blancas) en cultivo. Los datos representan la media \pm ES de cuatro experimentos independientes. * $p \leq 0.05$ comparado con la secreción basal del control (5.6 mmol/l). + $p \leq 0.05$ comparado con la secreción a 5.6 mmol/l del mismo grupo.

K.3. Perfil de expresión de genes de la función de la célula beta en respuesta a la suplementación con biotina

Se ha propuesto que muchos de los efectos que ejerce la biotina a nivel sistémico y de manera independiente de las carboxilasas se deben a la capacidad de la biotina para modificar la expresión de genes ^{102,114}. Para analizar más a fondo los efectos de la suplementación con biotina sobre la función de la célula beta, examinamos la expresión del gen de la insulina, así como la de diversos genes que participan en la transcripción de la insulina, el proceso de detección y metabolismo de glucosa, y la secreción de insulina en respuesta a glucosa.

K.3.1 Genes que participan en la secreción de insulina

La suplementación con biotina en la dieta ocasionó un incremento del doble (1.9 ± 0.3 veces más que el control) en la expresión del gen de la insulina (*Ins2*) y aumentó en un 70% la expresión de la glucocinasa (*Gck*). Asimismo, los niveles de RNAm del gen del canal de calcio *Cacna1d* y de la enzima dependiente de biotina Acetil-CoA carboxilasa (*Acc-1*) también se incrementaron. La expresión de los RNAm del transportador de glucosa Glut2 (*Slc2a2*), el receptor a sulfonilureas SUR1 (*Abcc8*), y el receptor a insulina (*Insr*) no se modificó con la suplementación de biotina (Fig. 14).

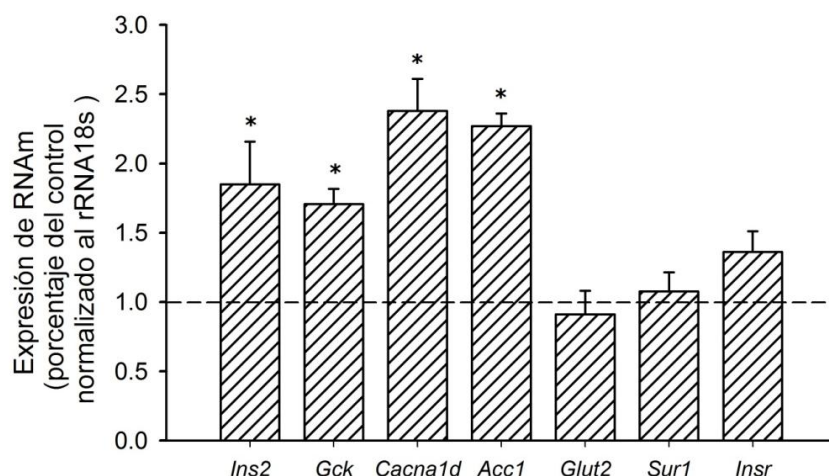


Figura 14. La suplementación con biotina incrementa la expresión de genes que participan en la secreción de insulina.

Se midió la expresión de mRNA de genes que participan en la secreción de insulina, en islotes de ratones control y suplementados con biotina. Los resultados representan el porcentaje de cambio con respecto a la expresión del control (línea punteada). Los datos son la media \pm ES. * $p \leq 0.05$ comparado con la expresión del control. $n=5-8$ grupos de 200 islotes por condición experimental.

K.3.2 Factores transcripcionales que regulan la maquinaria de síntesis y secreción de insulina

Dada la importancia de los factores transcripcionales en la regulación de la expresión tanto del gen de la insulina como de los otros componentes de la secreción de insulina ¹⁵⁸, decidimos también analizar la expresión de diversos factores transcripcionales de la célula beta. La suplementación con biotina en la dieta incrementó significativamente el RNAm de los factores *Pdx1*, *Foxa2* y *HNF4alfa* (Fig. 15), los cuales regulan de manera importante la expresión de la insulina y de otras proteínas de la célula beta. Por otro lado, la expresión de los factores *Srebf1* (también conocido como *Srebp1c*), *Ppar-alfa* y *Ppar-gamma* no se modificó con la suplementación de esta vitamina (Fig. 15).

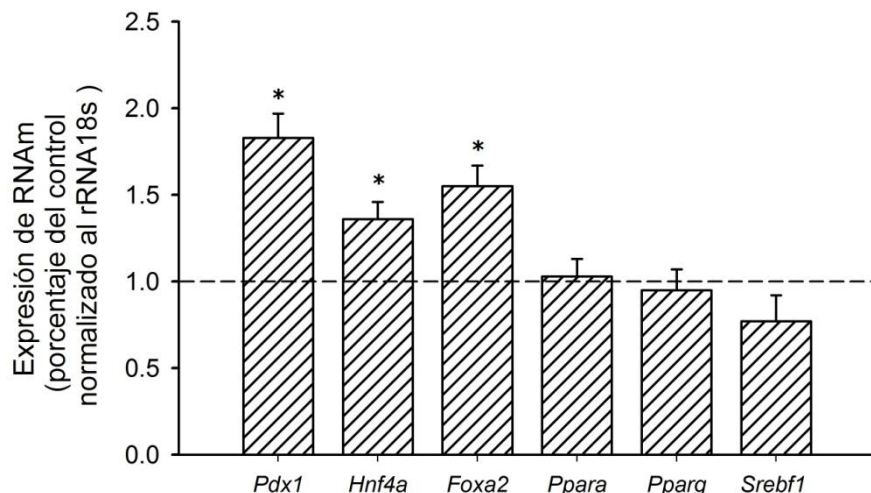


Figura 15. La suplementación con biotina incrementa la expresión de factores transcripcionales de la célula beta.

Se midió la expresión de mRNA de genes que regulan la expresión del gen de la insulina y de otros participantes de la secreción de insulina por medio de RT-PCR en tiempo real, en islotes de ratones control y suplementados con biotina. Los niveles de expresión se presentan como porcentaje de cambio con respecto a la expresión del control (línea punteada). Los datos representan la media \pm ES. * $p \leq 0.05$ comparado con la expresión del control. n=5-8 grupos de 200 islotes por condición experimental.

K.4. Efectos de la suplementación con biotina sobre la homeostasis de la glucosa y la secreción de insulina *in vivo*

Con base en los resultados anteriores, analizamos si el incremento de secreción de insulina y el aumento en la expresión de genes que participan en la síntesis y secreción de insulina ocasionados por la suplementación con biotina podrían repercutir en el mantenimiento de homeostasis de la glucosa a nivel sistémico. Para este fin, se midieron las concentraciones de glucosa e insulina en sangre, y se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa.

No se encontraron diferencias entre las concentraciones de glucosa ni insulina en ratones tanto en condiciones de ayuno como en ratones alimentados *ad libitum* (Fig. 16). Sin embargo, en la curva de tolerancia a la glucosa intraperitoneal observamos una disminución en las concentraciones de glucosa a los 30 y los 60 min posteriores a la inyección de glucosa en los ratones suplementados con biotina (Fig. 17-A). Por otro lado, al evaluar el área bajo la curva de glucosa, encontramos que los ratones suplementados con biotina presentaban una menor área bajo la curva (Fig. 17-B), indicativo de una mejor tolerancia a la glucosa.

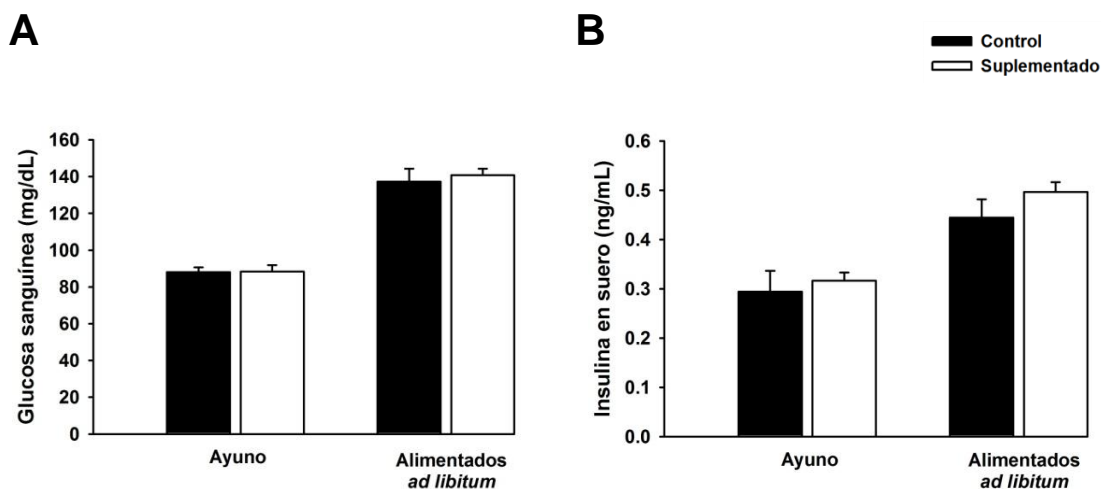


Figura 16. La suplementación con biotina no modifica la glucosa ni la insulina en sangre.

Concentraciones de glucosa (A) e insulina (B) en sangre de ratones control (barras negras) y suplementados (barras blancas), en condiciones de ayuno o alimentados *ad libitum*. Los datos representan la media \pm ES. $n=10$ para glucosa y $n=4-5$ para insulina.

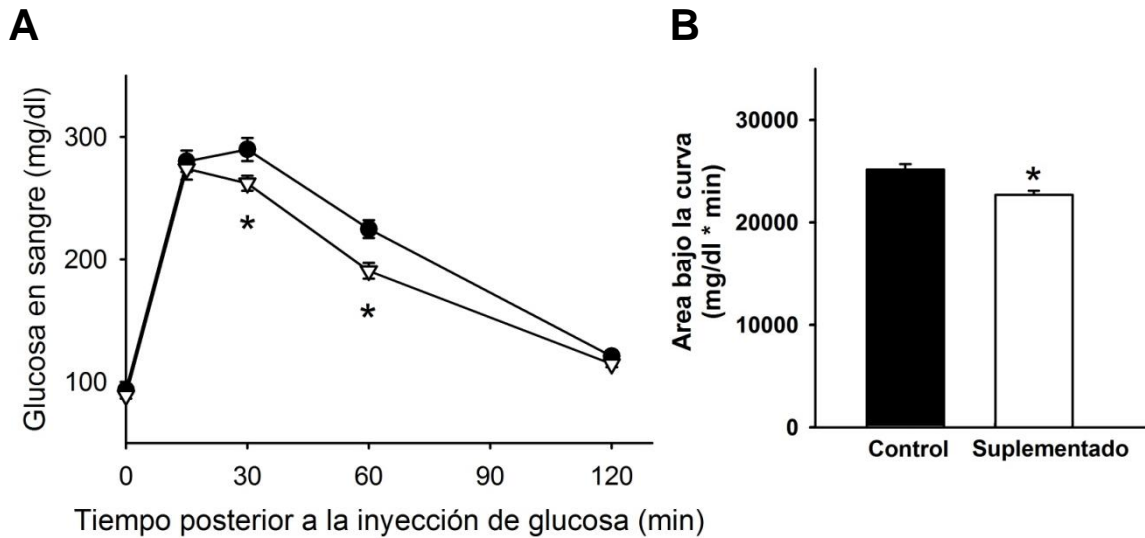


Figura 17. La suplementación con biotina mejora la tolerancia a la glucosa.

Concentraciones de glucosa (A) y área bajo la curva (B) durante la curva intraperitoneal de tolerancia a la glucosa de ratones control (círculos/barra en negro) y ratones suplementados con biotina (triángulos/barra en blanco). Los datos representan la media \pm ES. * $p \leq 0.05$ comparado con el control. $n=18$ ratones por grupo experimental.

La tolerancia a la glucosa depende principalmente de dos componentes: la secreción de insulina en respuesta a la glucosa administrada, y la sensibilidad a la insulina, esto es, la capacidad de los tejidos periféricos para captar la glucosa. Para identificar cuál de estos componentes estaba participando en la mejora en la tolerancia a la glucosa observada en el grupo de ratones suplementado con biotina, realizamos una curva de tolerancia a la insulina. No encontramos diferencias en la sensibilidad a la insulina exógena administrada durante esta prueba entre los dos grupos (Fig. 18). Este resultado sugiere que la suplementación con biotina mejora la tolerancia a la glucosa por medio de un incremento en la secreción de insulina.

Para probar esta hipótesis, medimos las concentraciones de insulina en sangre durante la prueba de tolerancia a la glucosa. Como se esperaba, los ratones suplementados con biotina mostraron un incremento en las concentraciones de insulina a los 5, 25, 45 y 90 minutos posteriores a la administración intraperitoneal de glucosa, comparados con los ratones control (Fig. 19).

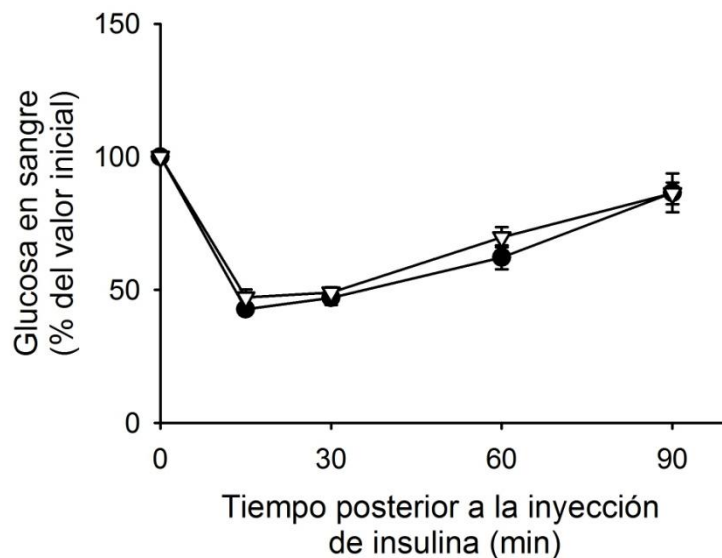


Figura 18. La suplementación con biotina no modifica la sensibilidad a la insulina.

Concentraciones de glucosa durante la curva intraperitoneal de tolerancia a la insulina de ratones control (círculos negros) y ratones suplementados con biotina (triángulos blancos). Los datos representan la media \pm ES. n=18 ratones por grupo experimental.

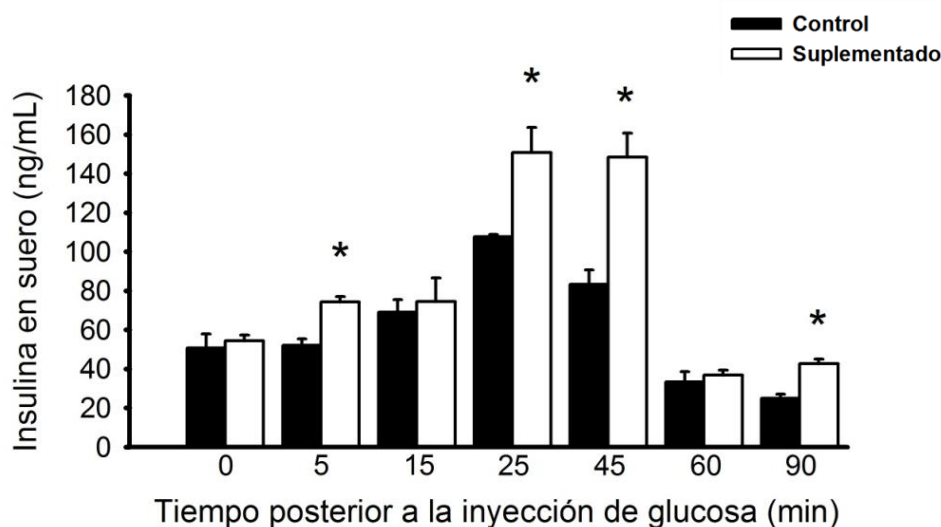


Figura 19. La suplementación con biotina incrementa la secreción de insulina en respuesta a la administración de glucosa.

Concentraciones de insulina en suero durante la prueba intraperitoneal de tolerancia a la glucosa en ratones control (barras negras) y ratones suplementados con biotina (barras blancas). Los datos representan la media \pm ES. * $p \leq 0.05$ comparado con el control. n=3-4 ratones por grupo experimental.

K.5. Efectos de la suplementación con biotina sobre la masa de las células beta y alfa y la morfología del islote pancreático

Además de la función de las células beta, la masa total de éstas también es un factor importante para una producción y secreción de insulina adecuadas⁶⁰. Por este motivo analizamos si la suplementación con biotina, además de mejorar la función de las células beta, modifica también la masa total de las células del islote.

Cuantificamos el área inmunopositiva a insulina (células beta) y el área inmunopositiva a glucagon (células alfa) en cortes de páncreas de ratones control y suplementados con biotina, teñidos por medio de inmunohistoquímica. Encontramos que la suplementación con biotina ocasionó un incremento de aproximadamente el doble del volumen relativo de células beta (insulina) y alfa (glucagon), expresado como el área total de células beta dividido entre el área total del corte (Fig. 20). La suplementación con biotina también incrementó el área total de islotes por área total de páncreas. Dado que no se encontraron diferencias en el peso del páncreas entre el grupo control y el grupo suplementado (166 ± 7 mg y 163 ± 6 mg respectivamente) estos resultados sugieren que la suplementación con biotina aumenta la masa total de células alfa y beta.

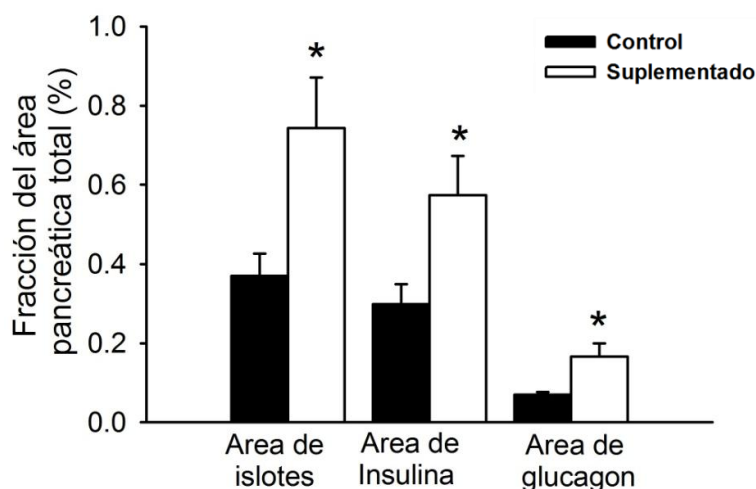


Figura 20. La suplementación con biotina incrementa la masa total de células alfa y beta.

Morfometría en cortes de páncreas de ratones control (barra negra) y suplementados con biotina (barra blanca) después de ocho semanas de administración con las dietas. Los valores representan la media \pm ES, expresados como porcentaje con respecto al área total del páncreas. * $p\leq 0.05$ comparado con el control. $n=5-6$ ratones por grupo experimental.

Con el fin de determinar si este incremento en la masa total de las células del islote observado en los ratones suplementados se debe a cambios en el tamaño, número o composición de los islotes, medimos dichos parámetros en los cortes de páncreas de ambos grupos experimentales. La suplementación con biotina no modificó el número de islotes por área total de páncreas (Fig. 21-A). Sin embargo, encontramos un incremento aproximadamente del 75% en el tamaño promedio de los islotes pancreáticos de los ratones suplementados (Fig. 22). En un análisis de la distribución de frecuencia de los tamaños de los islotes, observamos que la proporción de islotes de tamaño grande mayor a $10000 \mu\text{m}^2$ se veía incrementada en el grupo suplementado (Fig. 22-C). A pesar de este aumento en su tamaño, los islotes de los ratones suplementados con biotina no presentaron diferencias en cuanto a su composición, siendo las proporciones de células alfa y beta dentro del islote similares a las reportadas en la literatura ⁸, y a las encontradas en los ratones control (control: $77. \pm 1.1\%$ células beta y $21.7 \pm 1.1\%$ células alfa, suplementados: $74.4 \pm 1.1\%$ células beta y $24.0 \pm 1.2\%$ células alfa) (Fig. 21-B).

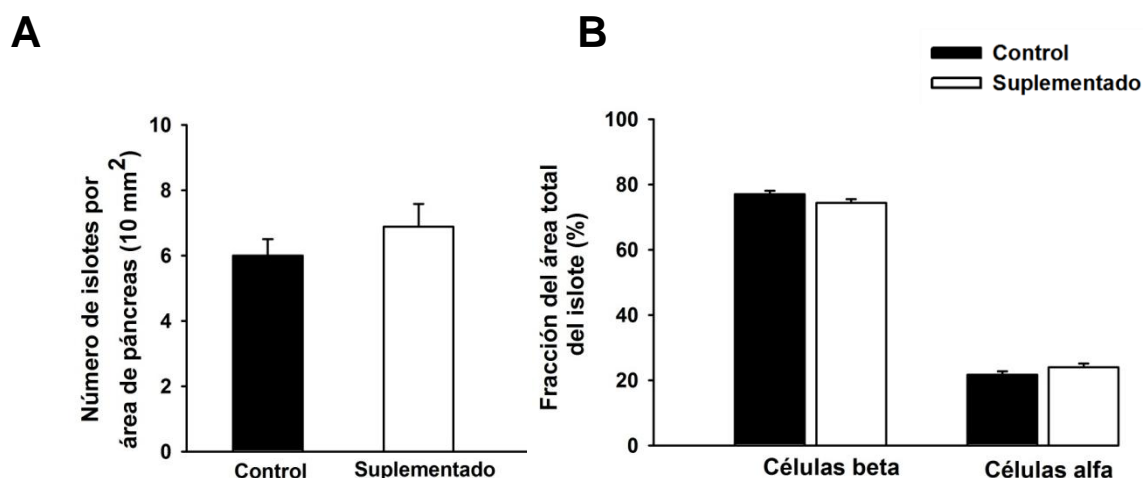


Figura 21. La suplementación con biotina no modifica el número ni la composición de islotes pancreáticos.

Morfometría en cortes de páncreas de ratones control (barras negras) y suplementados con biotina (barras blancas) después de ocho semanas de administración con las dietas. El número de islotes (A) se normalizó al área total del corte. La composición de los islotes (B) se analizó midiendo el área de células alfa y beta dentro del área total de cada islote de manera individual. Los valores representan la media \pm ES, expresados como porcentaje con respecto al área total del páncreas. n=5-6 ratones por grupo experimental.

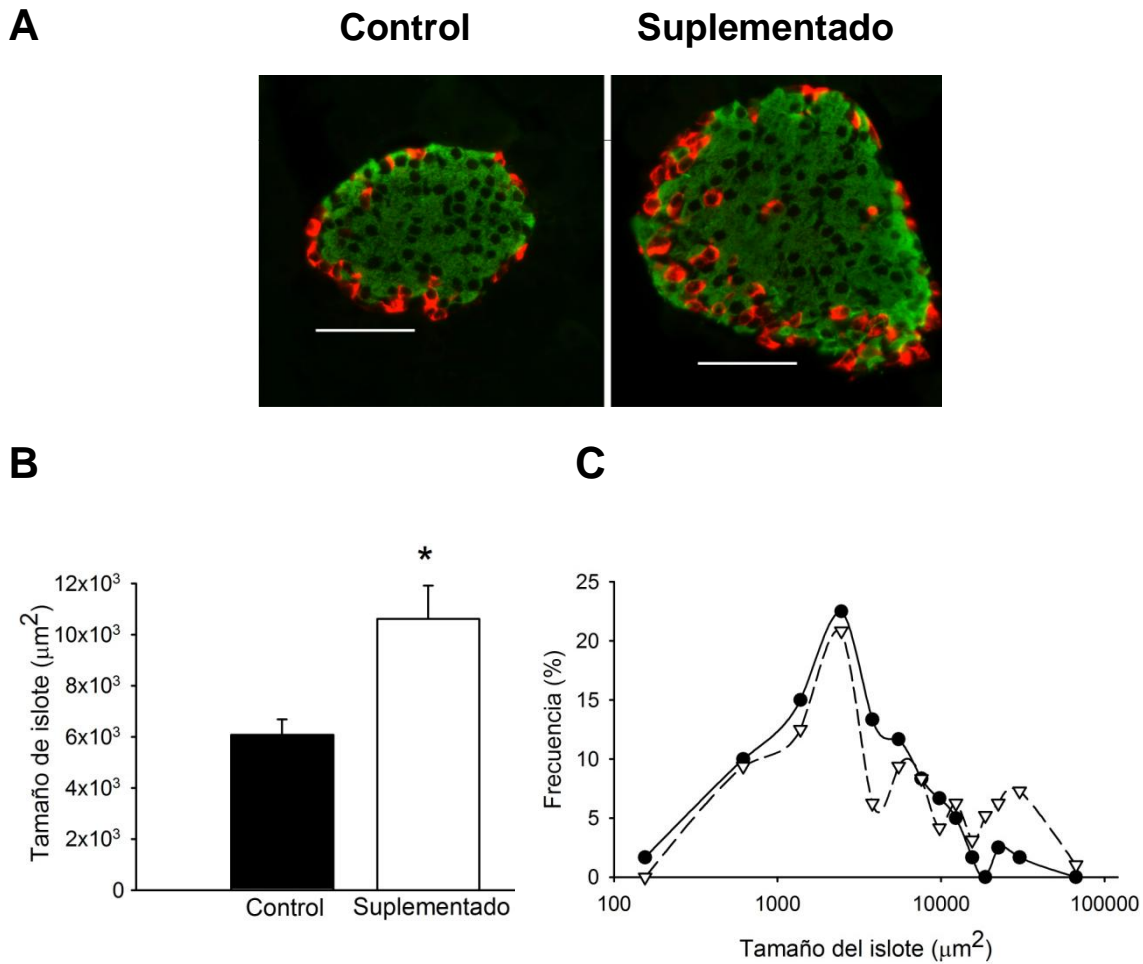


Figura 22. La suplementación con biotina incrementa la masa de las células beta por un aumento en el tamaño de los islotes pancreáticos.

(A) Imágenes de inmunofluorescencia de islotes pancreáticos de ratones control (izquierda) y suplementados con biotina (derecha) teñidos para insulina (verde) y glucagon (rojo). La escala equivale a 50 μm. (B) Tamaño promedio de islotes (media ± ES). * $p \leq 0.05$ comparado con el control. (C) Distribución de frecuencias del tamaño de los islotes, expresado como el porcentaje del número total de islotes medidos. Ratones control (círculos blancos) y suplementados con biotina (triángulos blancos). Los valores representan la media ± ES. $n=120$ islotes (control) y 96 islotes (suplementados con biotina).

K.6. Efectos de la suplementación con biotina sobre la proliferación celular

El tamaño de los islotes es determinado por dos factores principales: la cantidad y el tamaño de las células que los componen. Un aumento en la proliferación, o una

disminución en la apoptosis de las células alfa y/o beta, así como la hipertrofia de las mismas, pueden ser los causantes de un incremento en el tamaño de los islotes ⁶³. Existen algunos reportes que indican que la biotina tiene efectos sobre la proliferación y la apoptosis en diferentes tejidos ^{159,160}. Para determinar si un incremento en la proliferación estaba participando en el incremento en el tamaño de los islotes, evaluamos la proliferación en cortes de páncreas de los ratones control y suplementados. Sin embargo, dado que el recambio de células beta en el adulto es muy baja ¹⁶¹, no fue posible encontrar indicios de una proliferación abundante, ni observamos diferencias cualitativas en el índice de proliferación entre los ratones control y suplementados con biotina.

Para abordar la posibilidad de que la suplementación con biotina fuese capaz de incrementar la proliferación de las células beta en etapas más tempranas, utilizamos la línea de células beta de ratón MIN6. En primer lugar, evaluamos el efecto de la biotina sobre la secreción de insulina de MIN6 con el fin de corroborar que las células MIN6 responden a la suplementación con biotina de manera similar a como lo hacen los islotes pancreáticos. Para ello suplementamos a las células MIN6 durante 24 hr con medio sin biotina (control) o con dosis de 10 nM, 50 nM y 500 nM de biotina. La dosis de 10 nM ha sido previamente utilizada como dosis suprafisiológica de biotina en estudios de secreción de insulina *in vitro* ¹²⁸, mientras que 50 nM y 500 nM corresponden a los niveles en suero de biotina que alcanzan los ratones control y suplementados con biotina, respectivamente, en el presente estudio. En concordancia con observaciones previas ^{128,129,133}, la suplementación con biotina en cultivo incrementó la secreción de insulina de manera dosis-dependiente a baja glucosa (5.6 mM), mientras que a concentraciones altas de glucosa (15.6 mM) sólo la dosis de 500 nM aumentó la secreción de insulina de manera significativa (Fig. 23).

A continuación, evaluamos el efecto de la suplementación con biotina sobre el crecimiento celular, medido con azul de tripano, con el fin de determinar el tiempo de cultivo necesario para observar el efecto potencial de un incremento en la proliferación celular. Encontramos que la suplementación con biotina incrementa de manera significativa el crecimiento celular a partir de las 48 hrs de suplementación, observándose un mayor efecto de las dosis de 50 nM y 500 nM tanto a 48 como a 72 hrs (Fig. 24). Con base en estos resultados, concluimos que la suplementación con biotina sí incrementa el crecimiento celular. Asimismo, consideramos un tiempo de 72 hrs de suplementación con biotina para analizar su efecto sobre la proliferación celular.

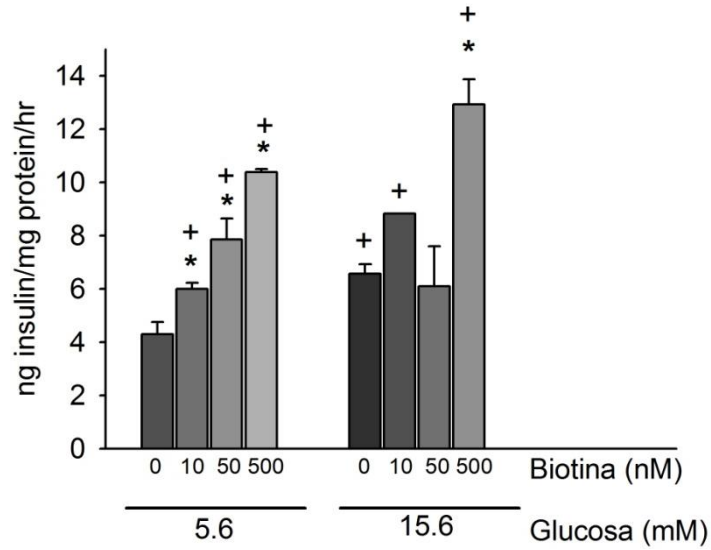


Figura 23. La biotina incrementa la secreción de insulina en células MIN6.

Secreción de insulina en respuesta a glucosa de células MIN6 cultivadas con diferentes cantidades de biotina. Los valores representan la media \pm ES de un experimento por triplicado. * $p \leq 0.05$ comparado con el control sin biotina. + $p \leq 0.05$ comparado con la secreción basal a 5.6 nM de glucosa del control.

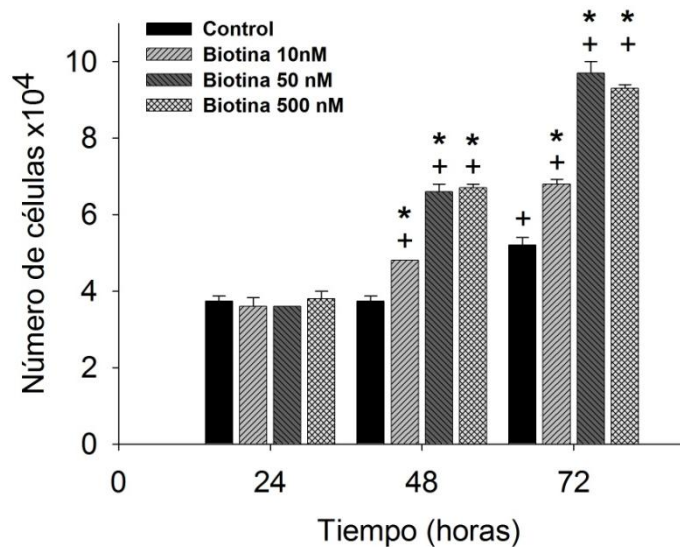


Figura 24. La suplementación con biotina aumenta el crecimiento celular de MIN6.

Crecimiento celular evaluado por conteo de células viables mediante azul de tripano. Los valores representan la media \pm ES de un experimento medido por triplicado. * $p \leq 0.05$ comparado con el control en el mismo tiempo. + $p \leq 0.05$ comparado con la misma concentración en el tiempo anterior.

Examinamos el índice de proliferación por medio de inmunocitoquímica de PHH3 en las células MIN6, cultivadas por 72 hrs con las diferentes concentraciones de suplementación con biotina utilizadas en los ensayos de crecimiento celular. Adicionalmente, evaluamos también si una concentración de 0.75 nM (concentración fisiológica según lo reportado por Zempleni et. al. para cultivos de línea celular HepG2¹⁶²) pudiera tener algún efecto en la proliferación celular. Este análisis reveló que la biotina, a dosis encontradas en nuestros ratones suplementados durante 8 semanas, es capaz de incrementar significativamente la proliferación de las células beta (Fig. 25). Estos resultados sugieren que la suplementación con biotina pudiera estar incrementando el tamaño de los islotes pancreáticos mediante un aumento en la proliferación celular.

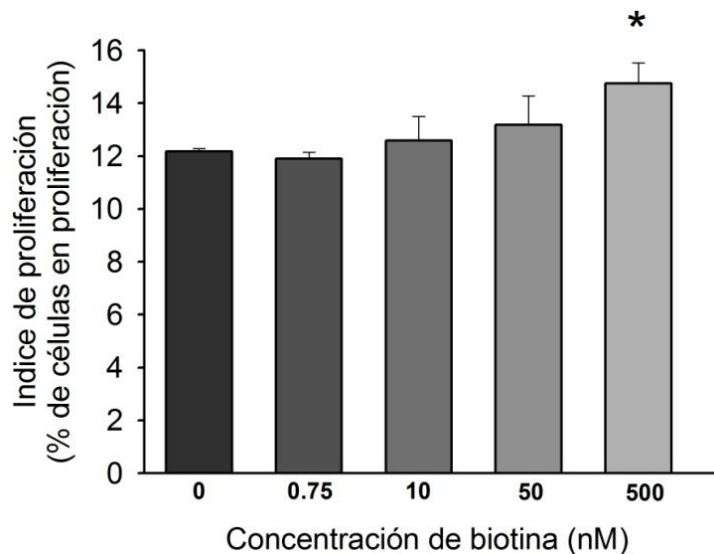


Figura 25. La suplementación con biotina aumenta la proliferación de las células beta.

Índice de proliferación celular en células MIN6 cultivadas con diferentes cantidades de biotina durante 72 hr. Los valores representan la media \pm ES de un experimento hecho por triplicado. * $p \leq 0.05$ comparado con el control (0.75nM).

K.7. Efectos de la suplementación con biotina sobre la arquitectura del islote pancreático

Sorprendentemente, el análisis morfométrico realizado en cortes de páncreas reveló que los islotes de los ratones suplementados con biotina poseen una arquitectura modificada comparada con la de los islotes control (Fig. 26). En lugar de presentar la arquitectura típica de los islotes de roedor, con las células beta localizadas hacia el centro del islote y las células alfa hacia la periferia, los islotes de ratones suplementados presentaron un incremento en la proporción de islotes (40% más que el control) con células alfa hacia el centro del islote (Fig. 27).

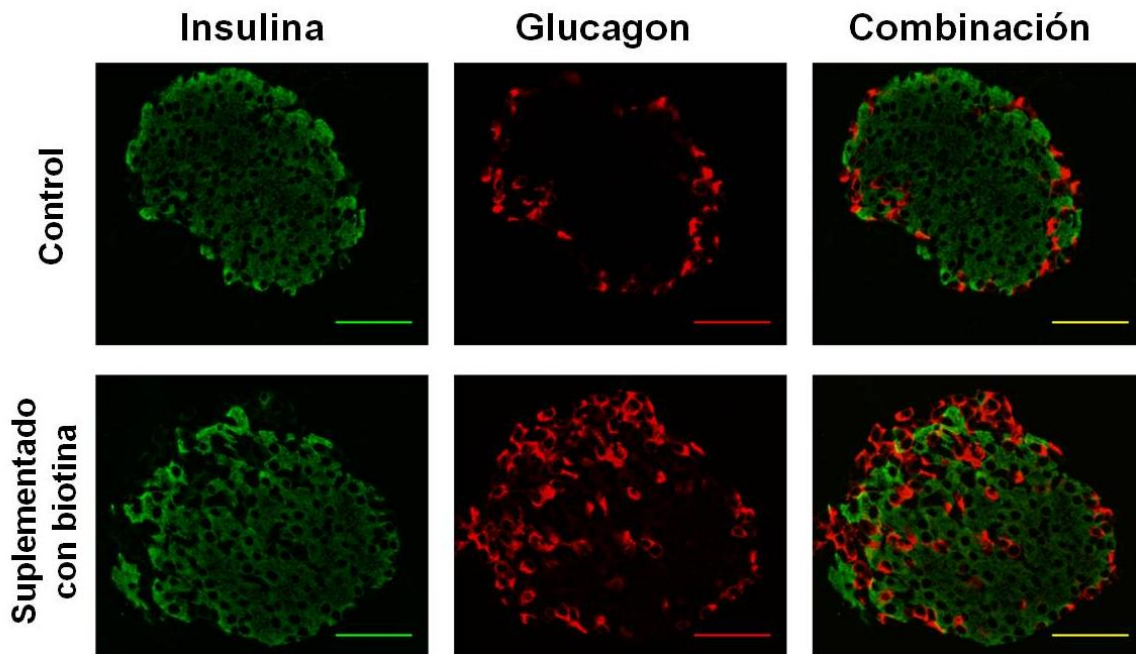


Figura 26. La suplementación con biotina modifica la arquitectura de los islotes pancreáticos.

Cortes de páncreas de ratones alimentados durante 8 semanas con dieta control (páneos superiores) o dieta suplementada con biotina (páneos inferiores) se tiñeron por inmunofluorescencia con anticuerpos anti-insulina (verde) y anti-glucagon (rojo) para localizar a los islotes pancreáticos. Las células positivas a glucagon (células alfa) se encuentran esparcidas en los islotes de ratones suplementados con biotina. Las fotografías corresponden a islotes representativos de los encontrados en 5-6 individuos de cada grupo experimental. Las barras equivalen a 50 μ m.

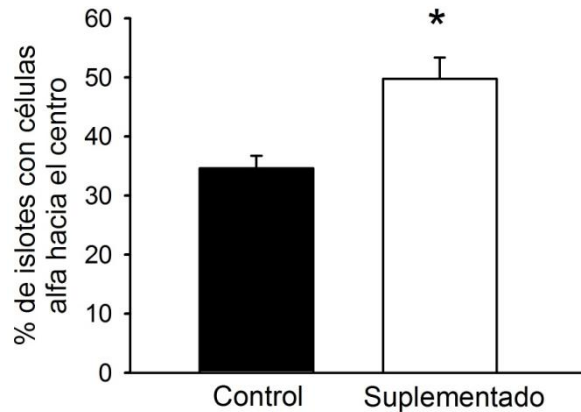


Figura 27. La suplementación con biotina incrementa la cantidad de islotes con células alfa hacia el centro.

Porcentaje (media \pm ES) de islotes con más de una célula positiva a glucagon hacia el centro (cuarta capa de células alejada de la periferia o más) del islote. * $p \leq 0.05$ comparado con el control. $n=5-6$ ratones por grupo experimental.

Con el fin de analizar los mecanismos que pudieran estar participando en estos efectos sobre la arquitectura del islote, examinamos diversos aspectos que han sido asociados con los cambios en la arquitectura del islote: un incremento en la demanda metabólica de insulina⁹¹, cambios en la actividad de la piruvato carboxilasa¹⁶³ y cambios en la expresión de moléculas de adhesión^{156,164,165}.

K.8. Efectos de la suplementación con biotina sobre la demanda metabólica de insulina

La masa, la composición y la arquitectura del islote pancreático pueden verse afectadas en ciertos estados fisiológicos y patológicos que incrementan la demanda metabólica de insulina, tales como la obesidad^{91,166}, el embarazo^{167,168} y la diabetes^{163,169}. Para evaluar si los cambios en el tamaño y la arquitectura de los islotes que observamos en los ratones suplementados con biotina pudieran deberse a un incremento en la demanda metabólica de insulina, determinamos el peso corporal, los niveles de glucosa y la tolerancia a la insulina a lo largo de las ocho semanas de administración de la dieta de biotina.

No encontramos cambios en las concentraciones de glucosa sanguínea ni en condiciones de ayuno (Fig. 28-A) ni en ratones alimentados (Fig. 28-B). Los ratones suplementados no mostraron diferencias en el peso corporal comparados con los ratones control (Fig. 28-C).

Asimismo, la resistencia a la insulina, evaluada a través de curvas de tolerancia a la insulina, no difirió entre los ratones control y los ratones suplementados (Fig. 28-D). Estos resultados indican que los ratones suplementados con biotina no cursan con un proceso de obesidad ni con un incremento en la demanda metabólica de insulina.

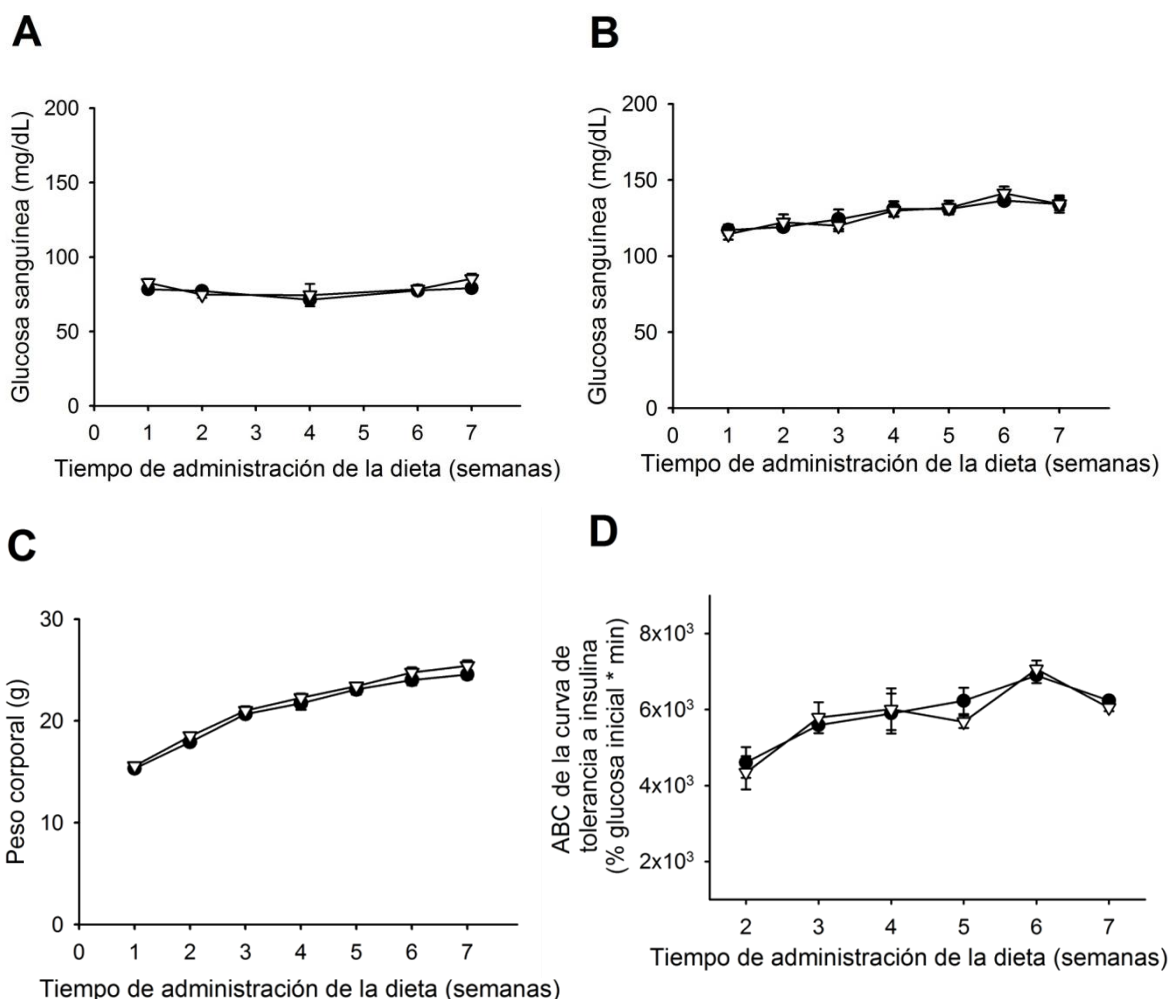


Figura 28. La suplementación con biotina no modifica la glucosa, el peso corporal ni la resistencia a la insulina.

Se analizaron las concentraciones de glucosa en sangre de ratones en ayuno (A) y alimentados (B), el peso corporal (C) y la tolerancia a la insulina (expresada como área bajo la curva) (D) a lo largo del periodo de ocho semanas de administración de las dietas control (círculos negros) y suplementada con biotina (triángulos blancos). n=7-11 ratones para cada grupo en las mediciones de glucosa y peso, n=4-8 ratones para las curvas de tolerancia a la insulina. Los datos representan la media \pm ES.

K.9. Efectos de la suplementación con biotina sobre la piruvato carboxilasa

En estudios recientes se ha observado que un aumento de la actividad de la piruvato carboxilasa es parte de los mecanismos iniciales que se presentan en el estado de compensación del islote pancreático. Cuando la actividad de la piruvato carboxilasa se incrementa, independientemente de su masa protéica, hay un aumento en la secreción de insulina *in vitro*, un aumento en la masa de la célula beta, y en etapas posteriores, una modificación de la arquitectura del islote ¹⁶³. Siendo la piruvato carboxilasa una enzima que requiere de biotina para su funcionamiento, analizamos la expresión del gen de la piruvato carboxilasa y su actividad enzimática en los islotes pancreáticos de ratones control y suplementados con biotina.

No observamos diferencias significativas en la expresión del RNAm (Fig. 29-A) ni en la actividad enzimática de la piruvato carboxilasa (Fig. 29-B).

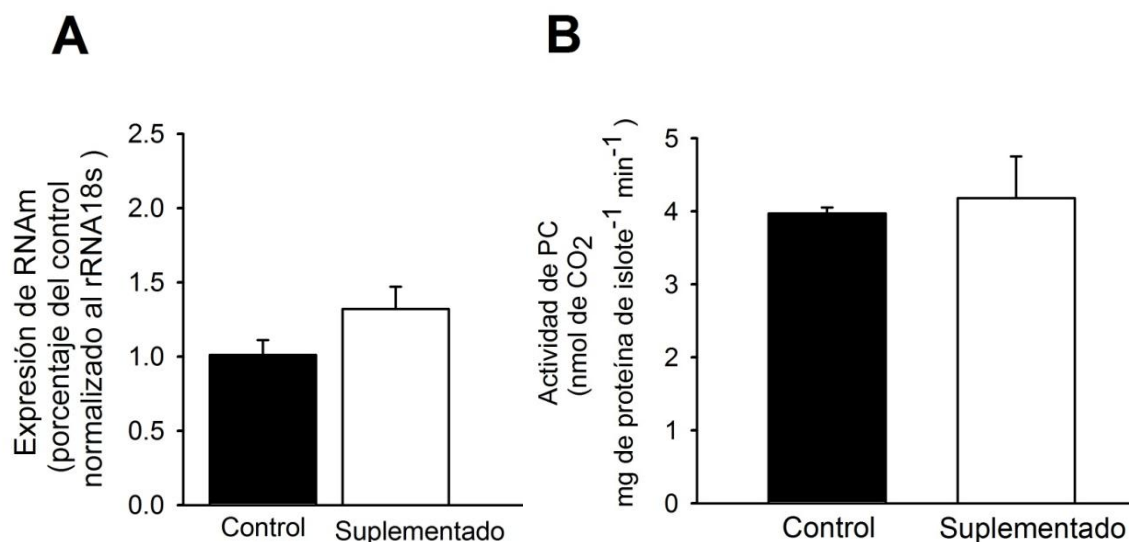


Figura 29. La suplementación con biotina en la dieta no modifica la expresión ni la actividad de la piruvato carboxilasa.

(A) Expresión del mRNA de la PC por medio de RT-PCR en tiempo real en islotes de ratones control (barra negra) y suplementados con biotina (barra blanca). n=6-8 grupo de 200 islotes por condición experimental. (B) Actividad enzimática de PC en islotes de ratones control (barra negra) y suplementados con biotina (barra blanca). n=5 grupos de 100 islotes por condición experimental. Los datos representan la media \pm ES.

K.10. Efectos de la suplementación con biotina sobre la expresión de moléculas de adhesión

Los resultados anteriores sugieren que la modificación en la arquitectura de los islotes pancreáticos de los ratones suplementados no se debe ni a un incremento en la demanda metabólica de insulina ni a un cambio en la actividad de la piruvato carboxilasa. Por ello investigamos los efectos de la suplementación con biotina sobre la expresión de RNAm de genes que participan en el mantenimiento de la morfología y la arquitectura del islote. Se ha encontrado que la molécula de adhesión NCAM-1 juega un papel crucial en la distribución celular dentro del islotes, y participa en la distribución subcelular de cadherinas y la remodelación de las redes de actina (F-actina) submembranales ¹⁵⁶ Estas redes de actina pueden participar en el proceso de exocitosis durante secreción de insulina ^{170,171}. Por otro lado, la Cadherina 1 (*Cdh1*, también llamada E-cadherina) participa en la agregación de las células del islote ¹⁶⁴.

Al evaluar la expresión de estas proteínas encontramos que la suplementación con biotina disminuyó de manera significativa la expresión de *Ncam1* ($27\pm 5\%$ por debajo del control), mientras que no se encontró diferencia en la abundancia del RNAm de *Cdh1* entre el grupo suplementado y el grupo control. Asimismo, al evaluar el mRNA de b-actina (*Actb*), encontramos un incremento en su expresión (Fig. 31).

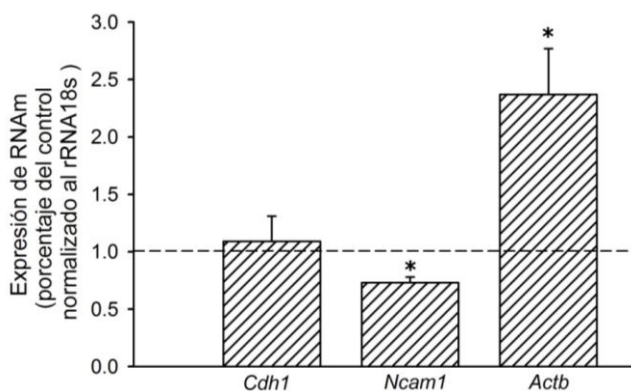


Figura 30. La suplementación con biotina modifica la expresión de Ncam1 y beta-Actina

Se midió la expresión por medio de RT-PCR en tiempo real del mRNA de genes que codifican para moléculas de adhesión del islote pancreático, en islotes de ratones control y suplementados con biotina. Los niveles de expresión se presentan como porcentaje de cambio con respecto a la expresión del control (línea punteada). Los datos representan la media \pm ES. * $p \leq 0.05$ comparado con la expresión del control. $n=5-6$ grupos de 200 islotes por condición experimental.

L. DISCUSIÓN

Una función correcta y una masa adecuada de las células beta son esenciales para la prevención del desarrollo de diabetes ⁸⁸. Aquellas estrategias que favorezcan ambos atributos ayudarán en gran medida a la prevención y tratamiento esta enfermedad. Diversos estudios *in vitro* han demostrado que las concentraciones farmacológicas de biotina incrementan la secreción de insulina ^{128,129,133,134} y la expresión de *Glucocinasa* ^{128,129} y *Pdx1* ¹³², proteínas que favorecen la función y preservan la masa de las células beta ^{23,130,172}. En el presente trabajo utilizamos un modelo de ratones, el cual nos permite determinar los efectos directamente sobre la masa de las células beta y la secreción de insulina en los islotes pancreáticos. En dicho modelo estudiamos si la suplementación crónica *in vivo* de biotina en la dieta es capaz de producir cambios que promuevan el funcionamiento adecuado de las células beta, explorando los mecanismos moleculares que participan en estos cambios con el fin de determinar su potencial terapéutico para la prevención y el tratamiento de la diabetes.

Los datos obtenidos en este trabajo demuestran que la suplementación con biotina *in vivo* incrementa la secreción de insulina. Este hallazgo corrobora los estudios *in vitro* previamente realizados por nuestro grupo ^{128,129} y otros ^{133,134}, en los que se observó que la biotina es capaz de aumentar la secreción de insulina en respuesta a glucosa. El incremento en la secreción de insulina fue mayor a concentraciones de glucosa basales (5.6 mM), lo cual indica que la biotina es un potenciador de la secreción de insulina, mas no un secretagogo, pues no es capaz de aumentar la secreción de insulina más allá de la capacidad secretora de la glucosa.

Aunado al efecto positivo de la biotina sobre la secreción de insulina, la suplementación con biotina también incrementó la expresión del gen de esta hormona, así como la de diversos genes que participan en el mecanismo de secreción de insulina en respuesta a glucosa. Tal como nuestro grupo había demostrado previamente en estudios *in vitro* a corto plazo ^{128,129}, en el presente trabajo la suplementación con dosis farmacológicas de biotina aumentó la expresión del RNAm de *Glucocinasa*, una enzima que es considerada como el sensor de glucosa de la célula beta ²³. En el presente estudio también encontramos que la suplementación con biotina incrementa de manera sustancial la expresión de *Cacna1d*, un gen que codifica para la subunidad $\alpha 1d$ del canal de calcio tipo L dependiente de voltaje. Este canal controla de manera importante la entrada de calcio a la célula beta durante la secreción de insulina ²⁵. Además, la biotina aumentó el RNAm de

Acc1, una enzima que participa en el acoplamiento metabólico que ocurre durante la segunda fase de secreción de insulina ³⁴. En conjunto, estos resultados sugieren que, además de un posible incremento de la producción de insulina y del flujo metabólico de glucosa en la célula beta por un aumento en la glucocinasa, la biotina podría estar potenciando la secreción de insulina por medio de la modulación de la entrada de calcio y la activación de las señales que mantienen y amplifican la secreción de insulina. El incremento en la glucocinasa también pudiera estar participando en el aumento de la secreción de insulina a baja glucosa, pues se ha demostrado que un incremento en la actividad de glucocinasa disminuye el umbral al cual la glucosa y estimula la secreción de insulina sin alterar la capacidad secretora máxima de la célula beta ¹⁷³.

El mantenimiento de un fenotipo altamente especializado es esencial para la función de las células beta ⁸⁸. Los factores transcripcionales *Foxa2*, *Pdx-1* y *Hnf4alfa* constituyen una parte importante de las redes transcripcionales de la célula beta, las cuales son esenciales para la expresión y regulación de genes que participan en la síntesis y secreción de insulina, así como en el mantenimiento y la proliferación de las células beta (revisado en ¹⁵⁸). Durante la falla de las células beta que lleva al desarrollo de diabetes, la expresión de estos tres factores transcripcionales se ve disminuida ⁸⁸. Dado que la suplementación con biotina incrementó la expresión de *Foxa2*, *PDX-1* y *HNF4alfa*, nuestros datos sugieren que la suplementación con biotina podría favorecer la capacidad de las células beta para soportar la demanda metabólica de la insulina, manteniendo su fenotipo y su masa. El aumento en la expresión de estos genes y factores transcripcionales constituye un mecanismo por el cual la biotina puede potenciar la secreción de insulina.

Es importante hacer notar que la suplementación con biotina no tuvo efectos sobre la abundancia del RNAm de factores transcripcionales cuya expresión alterada se ha asociado a la glucotoxicidad y la falla de la célula beta, como *SREBP1c*, *PPARalfa* y *PPARGamma*. Se sabe que un incremento en *SREBP1c* aumenta la acumulación de lípidos, disminuye la masa de las células beta y la secreción de insulina, además de mediar las respuestas de la célula beta al estrés del retículo endoplásmico y la glucolipototoxicidad ^{174,175}. Asimismo, durante la falla de la célula beta, dos de las modificaciones a nivel de genes que se observan comprenden la disminución en *PPARalfa* ^{88,176} y el incremento en *PPARGamma* ^{88,176}.

Acorde con el incremento en la secreción de insulina y el aumento en la expresión de genes que participan en ella, nuestros estudios revelaron que el área bajo la curva en la prueba de tolerancia a la glucosa disminuye en respuesta a la suplementación con biotina en la dieta. No obstante, las concentraciones sanguíneas de glucosa e insulina en ayuno y en ratones alimentados no se modificaron. A pesar de estos resultados, y de los estudios *in vitro*^{128,129,133,134} que han demostrado que la biotina es capaz de potenciar la secreción de insulina en respuesta a glucosa, ningún estudio ha logrado demostrar que la suplementación con biotina incremente los niveles séricos de insulina^{136,139,140}. Utilizando la estrategia de analizar la secreción de insulina después de administrar una carga de glucosa, fuimos capaces de revelar que la suplementación con biotina induce el aumento de la insulina en suero. Estos resultados demuestran por primera vez que la suplementación con dosis farmacológicas de biotina aumenta las concentraciones sanguíneas de insulina en respuesta a glucosa en condiciones *in vivo*.

En estudios en ratones KK, un modelo diabético de hiperglucemia moderada y resistencia a la insulina, Reddi et. al. también encontraron que la suplementación con biotina incrementa la tolerancia a la insulina, sin observar cambios en la secreción de insulina¹³⁹. Contrario a estos resultados, nosotros encontramos que la suplementación con biotina mejora la tolerancia a la glucosa a través del incremento en la secreción de insulina, y no aumentando la sensibilidad de los tejidos periféricos a la insulina. Las razones de esta discrepancia podrían radicar en que la secreción de insulina en el estudio de ratones KK se midió hasta los minutos 60 y 120 posteriores a la inyección de glucosa, cuando el incremento que observamos en este estudio tiene sus picos máximos a los 25 y 45 minutos después de la administración de glucosa. Más aún, Reddi et. al. utilizaron un modelo genéticamente susceptible al desarrollo de resistencia a la insulina y diabetes, y comenzaron la administración de biotina una vez que los ratones ya presentaban hiperglucemia¹³⁹. Por el contrario, nuestro modelo comprende ratones sanos con sensibilidad a la insulina normal.

Aunado a los efectos positivos de la biotina sobre la expresión de genes y la tolerancia a la glucosa, mediante el análisis morfológico encontramos que la suplementación con biotina en la dieta incrementó notablemente la masa de las células beta. Este incremento se debe al aumento en el tamaño de los islotes pancreáticos, dado que no encontramos cambios en el peso del páncreas total, el número de islotes o la composición de los mismos. La biotina incrementó la proporción de islotes de gran tamaño (>10000 μm^2).

Existe evidencia de que los islotes de distintos tamaños poseen funciones y propiedades diferentes ¹⁷⁷. Asimismo, en estudios recientes se ha encontrado que existe una pérdida en la frecuencia relativa de los islotes de gran tamaño en pacientes con diabetes tipo 2 ¹⁶⁹, la cual contribuye de manera importante a la reducción de la masa total de las células beta. Sería interesante determinar si el incremento selectivo de tamaño es indicativo de una sensibilidad diferencial a los efectos de la suplementación con biotina, pregunta que requerirá de nuevos estudios.

Por otro lado, se sabe que tanto la acción autocrina de la insulina ^{55,57,58} como la expresión de PDX1 ¹⁷⁸⁻¹⁸⁰ aumentan la sobrevivencia de las células beta, modulando su proliferación y apoptosis, mientras que un aumento en la actividad de la glucocinasa puede ocasionar incrementos en la proliferación de las células beta ^{130,181} y el tamaño de los islotes pancreáticos ¹⁸¹. El hallazgo de que la suplementación con biotina incrementa la expresión de los genes *Pdx1* y *Glucocinasa*, aunado a nuestras observaciones previas de que la biotina aumenta la acción autocrina de la insulina ¹²⁸ y la actividad de la glucocinasa pancreática ¹²⁹, sugiere que estos mecanismos participan en conjunto no solamente en el incremento de la secreción de insulina, sino también en los efectos favorables de la biotina sobre la masa de las células beta.

Además de los efectos benéficos de la suplementación con biotina sobre las células beta, nuestro estudio reveló que la biotina modificó la arquitectura de los islotes pancreáticos. Un incremento en la secreción de insulina, junto con un aumento en la masa de las células beta y una modificación de la arquitectura del islote pancreático ocurren de manera fisiológica cuando se incrementa la demanda metabólica de insulina, como en estados de obesidad ^{91,166}, embarazo ^{167,168} y resistencia a insulina ^{163,169}. Asimismo, un estudio reciente demostró que la actividad de la piruvato carboxilasa, enzima dependiente de biotina, se encuentra disminuida en modelos de ratones diabéticos, y que esta disminución se asocia a cambios en la arquitectura de los islotes y a un aumento en la masa de las células beta ¹⁶³. Sin embargo nuestros resultados indican que ninguna de estas condiciones está participando en los cambios producidos por la suplementación con biotina sobre la arquitectura, la masa y la secreción de insulina, puesto que los ratones suplementados no presentan cambios en el peso corporal, las concentraciones de glucosa, ni la sensibilidad a la insulina en ningún momento a lo largo del periodo de administración de la dieta de biotina.

Tampoco los efectos de la suplementación con biotina están relacionados ni con la expresión ni con la actividad de la piruvato carboxilasa, dado que no encontramos cambios en ninguno de estos parámetros. Estos resultados apoyan la teoría de que la biotina tiene efectos a nivel sistémico por mecanismos independientes de su acción sobre las carboxilasas, particularmente, a través de la modulación de la expresión génica.

Existe evidencia de que las moléculas de adhesión juegan un papel importante en la citoarquitectura del islote, principalmente la E-cadherina y N-CAM1. En ratones transgénicos donde la expresión de E-cadherina es bloqueada en células beta, la agregación de éstas células y la formación del islote se encuentran alteradas ¹⁶⁴. Por otro lado en ratones knockout homo y heterocigotos para N-CAM1 la citoarquitectura del islote se modifica, encontrándose células alfa dispersas en el área total del islote en lugar de encontrarse solamente hacia la periferia. Se ha sugerido que N-CAM1 posee además un efecto dominante sobre otras cadherinas en cuanto a la formación del islote, ^{156,165} y la alteración en su expresión también conlleva cambios en la polaridad de las células del islote ¹⁵⁶, la tolerancia a la glucosa, la secreción de insulina y glucagon, y la exocitosis ¹⁷⁰.

Las modificaciones sobre la arquitectura del islote producidas por la suplementación con biotina podrían estar relacionadas con la disminución en la expresión de *Ncam1*. Dado que un decremento incluso moderado (50%) en la expresión de *Ncam1* es capaz de generar un aumento sustancial en el porcentaje de islotes con arquitectura alterada ¹⁵⁶, es posible que la disminución ocasionada por la biotina (27%) ocasione las modificaciones en la arquitectura de los islotes de ratones suplementados. Sin embargo, en contraste con los efectos detrimentales que tiene la ablación de *Ncam1* en el organismo sobre la tolerancia a la glucosa y la secreción de insulina ¹⁵⁶, la suplementación con biotina no parece tener efectos desfavorables para la célula beta.

Un dato interesante encontrado en este trabajo fue que la expresión del RNAm de beta-actina se incrementó en respuesta a la suplementación con biotina. Se ha reportado que la agregación de la actina ¹⁵⁶ y la reorganización de las redes de actina durante la exocitosis ¹⁷⁰ se encuentran alteradas en las células beta de ratones knockout para *Ncam1*. Sin embargo, con respecto al presente estudio, la relación que exista entre incremento en la expresión de *Actb* y la modificación de la arquitectura del islote, así como el efecto de la suplementación con biotina sobre las redes de actina, son preguntas que pretendemos sean abordadas en estudios posteriores.

Los hallazgos de que la suplementación con biotina incrementa la secreción de insulina y la masa de las células beta, aunados a la modificación de la arquitectura de los islotes pancreáticos, semejan en conjunto un estado de adaptación y compensación del islote pancreático^{88,91,163,166-169}. Sin embargo, los efectos de la suplementación con biotina sobre el islote no se deben a un proceso de compensación, puesto que los ratones suplementados no mostraron indicios de un incremento en la demanda metabólica de insulina durante el periodo de administración de las dietas de biotina. Esto sugiere que los efectos de la suplementación con biotina se realizan de manera directa sobre el islote, a través de la expresión de genes cruciales para la producción y secreción de insulina, y el mantenimiento de la masa de las células beta. Dado que una función robusta y una masa adecuada de las células beta son esenciales para la prevención del desarrollo de diabetes, nuestra investigación indica que la suplementación con biotina podría incrementar la capacidad del islote pancreático para hacer frente a alteraciones metabólicas como hiperglucemia o resistencia a la insulina. Estudios a futuro determinarán la capacidad de la biotina para prevenir el desarrollo de hiperglucemia en modelos diabéticos, así como la posible reversión de la hiperglucemia una vez establecida la diabetes.

La evidencia de que la suplementación con biotina posee efectos sobre la masa y la función de las células beta, junto con otros reportes de sus efectos hipotrigliceridémiantes^{143,182}, sugiere que la biotina podría ser utilizada para la prevención y/o tratamiento no solamente de la diabetes, sino también de otros padecimientos como el síndrome metabólico. Es generalmente aceptado que las dosis farmacológicas de biotina son inocuas¹¹⁰. Los estudios que han analizado la genotoxicidad de la biotina encontraron que esta vitamina no es mutagénica en bacterias¹¹⁰. Por otro lado, en estudios de micronúcleos en la planta *Tradescantia* se observó que la biotina sólo posee un potencial genotóxico cuando se administra a concentraciones de 4 ó 5 órdenes de magnitud mayores que las concentraciones en suero alcanzadas con la suplementación con dosis farmacológicas de biotina¹¹⁰. En pacientes con errores innatos del metabolismo se administran dosis de biotina de entre 20 y 200 mg/día, sin existir reportes de efectos secundarios⁹⁵. Respecto a su uso en otros pacientes, Maebashi y cols.¹³⁶ administraron dosis farmacológicas de biotina durante 2 meses a pacientes con diabetes, y encontraron que las concentraciones de glucosa en ayuno que se alcanzaron en ese periodo se mantuvieron en un rango constante durante un periodo de hasta 48 meses sin que se observaran efectos secundarios no deseados. A pesar de que estas evidencias apoyan la

idea de que el uso de concentraciones farmacológicas de biotina es seguro, el hecho de que la suplementación con biotina produzca un aumento en la masa de las células beta, requiere ser estudiados para determinar si el uso de la suplementación con biotina a largo plazo podría ser usado como una estrategia terapéutica.

M. CONCLUSIONES

La suplementación con dosis farmacológicas de biotina durante ocho semanas induce cambios favorables para el funcionamiento y la masa de las células beta a través de un incremento en la expresión de genes, mejorando con ello la tolerancia a la glucosa.

La suplementación con biotina aumenta la secreción de insulina en respuesta a glucosa en islotes aislados. Este incremento es consistente con un aumento en la expresión de diversos genes que participan en el mecanismo de secreción de insulina, así como de factores transcripcionales esenciales para la modulación de este mecanismo, y para el mantenimiento del fenotipo diferenciado de las células beta.

Los efectos de la suplementación con biotina tienen un impacto a nivel fisiológico, ya que los ratones suplementados con biotina poseen mejor tolerancia a la glucosa, debido a un aumento de la insulina durante la curva de tolerancia a la glucosa

La suplementación con biotina también incrementa la masa de las células beta, consecuencia de un aumento en el tamaño de los islotes pancreáticos. Es probable que este efecto de la biotina esté mediado tanto por el incremento de genes que mantienen la masa de las células beta como por la acción autocrina de la insulina, mecanismos que favorecen la proliferación de las células beta. Inesperadamente, la suplementación con biotina modificó la arquitectura de los islotes pancreáticos, observación que pudiera estar relacionada con una disminución en la expresión de *Ncam1*.

Los efectos de la suplementación con biotina observados en este trabajo semejan un proceso de adaptación que sufre el islote en respuesta a un incremento en la demanda metabólica de insulina y durante la progresión hacia la diabetes. Sin embargo, los ratones suplementados con biotina no presentaron datos de obesidad, hiperglucemia, resistencia a insulina o modificación en la actividad de PC. Estos hallazgos demuestran que no existe en los ratones suplementados alguna alteración del metabolismo a la cual los islotes pancreáticos pudieran estar respondiendo con una compensación, indicando que los efectos observados en el islote pancreático se deben directamente a la suplementación con biotina.

En conclusión, la suplementación con biotina en un modelo de ratón produce cambios *in vivo* a través de la modulación de la expresión de genes en los islotes pancreáticos, lo cual incrementa la secreción de insulina, la tolerancia a la glucosa y la masa de las células beta, atributos que se encuentran disminuidos durante la progresión hacia la diabetes mellitus ^{63,88}. En conjunto, nuestros resultados indican que la biotina podría ayudar a conservar la función de las células beta y a mantener una masa adecuada de las mismas, lo cual constituye una estrategia primordial no sólo para el tratamiento de la diabetes, sino también para su prevención.

N. REFERENCIAS

1. Lazo-de-la-Vega-Monroy, M.L. & Fernandez-Mejia, C. Bases moleculares de la diabetes tipo 2. in *Diabetes* (eds. Morales-González, J.A. et al.) (Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca, Hidalgo, México., 2010).
2. Klip, A. & Paquet, M.R. Glucose transport and glucose transporters in muscle and their metabolic regulation. *Diabetes Care* **13**, 228-43 (1990).
3. Barthel, A. & Schmoll, D. Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **285**, E685-92 (2003).
4. Shakur, Y. et al. Regulation and function of the cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE3) gene family. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **66**, 241-77 (2001).
5. Marino, C.R. & Gorelick, F.S. Pancreatic and Salivary Glands. in *Medical Physiology. A cellular and molecular approach* (eds. Boron, W.F. & Boulpaep, E.L.) (Elsevier, Philadelphia, PA, USA, 2005).
6. Barrett, E.J. The Endocrine Pancreas. in *Medical Physiology. A cellular and molecular approach* (eds. Boron, W.F. & Boulpaep, E.L.) (Elsevier, Philadelphia, PA, USA, 2005).
7. Kim, S.K. & Hebrok, M. Intercellular signals regulating pancreas development and function. *Genes Dev* **15**, 111-27 (2001).
8. Brissova, M. & Powers, A.C. Architecture of Pancreatic Islets. in *Pancreatic Beta Cell in Health and Disease* (eds. Seino, S. & Graeme, I.B.) (Springer, Japan, 2008).
9. Brissova, M. et al. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem* **53**, 1087-97 (2005).
10. Cabrera, O. et al. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2334-9 (2006).
11. Hellerstrom, C. The life story of the pancreatic B cell. *Diabetologia* **26**, 393-400 (1984).
12. Weir, G.C., Sharma, A., Zangen, D.H. & Bonner-Weir, S. Transcription factor abnormalities as a cause of beta cell dysfunction in diabetes: a hypothesis. *Acta Diabetol* **34**, 177-84 (1997).
13. Oyer, P.E., Cho, S., Peterson, J.D. & Steiner, D.F. Studies on human proinsulin. Isolation and amino acid sequence of the human pancreatic C-peptide. *J Biol Chem* **246**, 1375-86 (1971).
14. Steiner, D.F. The Biosynthesis of Insulin. in *Pancreatic Beta Cell in Health and Disease* (eds. Seino, S. & Graeme, I.B.) (Springer, Japan, 2008).
15. Eliasson, L. et al. Novel aspects of the molecular mechanisms controlling insulin secretion. *J Physiol* **586**, 3313-24 (2008).
16. Artner, I. & Stein, R. Transcriptional Regulation of Insulin Gene Expression. in *Pancreatic Beta Cell in Health and Disease* (eds. Seino, S. & Graeme, I.B.) (Springer, Japan, 2008).

17. Stagner, J.I., Samols, E. & Weir, G.C. Sustained oscillations of insulin, glucagon, and somatostatin from the isolated canine pancreas during exposure to a constant glucose concentration. *J Clin Invest* **65**, 939-42 (1980).
18. Bergsten, P., Grapengiesser, E., Gylfe, E., Tengholm, A. & Hellman, B. Synchronous oscillations of cytoplasmic Ca²⁺ and insulin release in glucose-stimulated pancreatic islets. *J Biol Chem* **269**, 8749-53 (1994).
19. Kar, S. & Shankar Ray, D. Sustained simultaneous glycolytic and insulin oscillations in beta-cells. *J Theor Biol* **237**, 58-66 (2005).
20. Curry, D.L., Bennett, L.L. & Grodsky, G.M. Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas. *Endocrinology* **83**, 572-84 (1968).
21. Henquin, J.C. Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation. *Diabetologia* **52**, 739-51 (2009).
22. Joost, H.G. et al. Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**, E974-6 (2002).
23. Matschinsky, F.M. Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes* **45**, 223-41 (1996).
24. Aguilar-Bryan, L. et al. Toward understanding the assembly and structure of KATP channels. *Physiol Rev* **78**, 227-45 (1998).
25. Hiriart, M. & Aguilar-Bryan, L. Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic beta-cell. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **295**, E1298-306 (2008).
26. Rorsman, P. & Renstrom, E. Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia* **46**, 1029-45 (2003).
27. Straub, S.G. & Sharp, G.W. Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. *Diabetes Metab Res Rev* **18**, 451-63 (2002).
28. Aizawa, T., Komatsu, M., Asanuma, N., Sato, Y. & Sharp, G.W. Glucose action 'beyond ionic events' in the pancreatic beta cell. *Trends Pharmacol Sci* **19**, 496-9 (1998).
29. Gembal, M., Gilon, P. & Henquin, J.C. Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K⁺ channels in mouse B cells. *J Clin Invest* **89**, 1288-95 (1992).
30. Henquin, J.C. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* **49**, 1751-60 (2000).
31. Aizawa, T., Sato, Y. & Komatsu, M. Importance of nonionic signals for glucose-induced biphasic insulin secretion. *Diabetes* **51 Suppl 1**, S96-8 (2002).
32. Aizawa, T. & Komatsu, M. Rab27a: a new face in beta cell metabolism-secretion coupling. *J Clin Invest* **115**, 227-30 (2005).
33. Straub, S.G. & Sharp, G.W. Hypothesis: one rate-limiting step controls the magnitude of both phases of glucose-stimulated insulin secretion. *Am J Physiol Cell Physiol* **287**, C565-71 (2004).
34. Jitrapakdee, S., Wutthisathapornchai, A., Wallace, J.C. & MacDonald, M.J. Regulation of insulin secretion: role of mitochondrial signalling. *Diabetologia* **53**, 1019-32 (2010).

35. Krueger, K.A., Bhatt, H., Landt, M. & Easom, R.A. Calcium-stimulated phosphorylation of MAP-2 in pancreatic betaTC3-cells is mediated by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II. *J Biol Chem* **272**, 27464-9 (1997).
36. Nielander, H.B. et al. Phosphorylation of VAMP/synaptobrevin in synaptic vesicles by endogenous protein kinases. *J Neurochem* **65**, 1712-20 (1995).
37. Easom, R.A. CaM kinase II: a protein kinase with extraordinary talents germane to insulin exocytosis. *Diabetes* **48**, 675-84 (1999).
38. Sharp, G.W. The adenylate cyclase-cyclic AMP system in islets of Langerhans and its role in the control of insulin release. *Diabetologia* **16**, 287-96 (1979).
39. Jones, P.M. & Persaud, S.J. Protein kinases, protein phosphorylation, and the regulation of insulin secretion from pancreatic beta-cells. *Endocr Rev* **19**, 429-61 (1998).
40. Doyle, M.E. & Egan, J.M. Pharmacological agents that directly modulate insulin secretion. *Pharmacol Rev* **55**, 105-31 (2003).
41. Laychock, S.G., Modica, M.E. & Cavanaugh, C.T. L-arginine stimulates cyclic guanosine 3',5'-monophosphate formation in rat islets of Langerhans and RINm5F insulinoma cells: evidence for L-arginine:nitric oxide synthase. *Endocrinology* **129**, 3043-52 (1991).
42. Russell, M.A. & Morgan, N. Expression and functional roles of guanylate cyclase isoforms in BRIN-BD11 beta-cells. *Islets* **2**, 23-31 (2010).
43. Salehi, A. et al. Free fatty acid receptor 1 (FFA(1)R/GPR40) and its involvement in fatty-acid-stimulated insulin secretion. *Cell Tissue Res* **322**, 207-15 (2005).
44. Nolan, C.J., Madiraju, M.S., Delghingaro-Augusto, V., Peyot, M.L. & Prentki, M. Fatty acid signaling in the beta-cell and insulin secretion. *Diabetes* **55 Suppl 2**, S16-23 (2006).
45. McClenaghan, N.H., Barnett, C.R. & Flatt, P.R. Na⁺ cotransport by metabolizable and nonmetabolizable amino acids stimulates a glucose-regulated insulin-secretory response. *Biochem Biophys Res Commun* **249**, 299-303 (1998).
46. Newsholme, P., Gaudel, C. & McClenaghan, N.H. Nutrient regulation of insulin secretion and beta-cell functional integrity. *Adv Exp Med Biol* **654**, 91-114 (2010).
47. Newsholme, P., Bender, K., Kiely, A. & Brennan, L. Amino acid metabolism, insulin secretion and diabetes. *Biochem Soc Trans* **35**, 1180-6 (2007).
48. Odegaard, M.L. et al. The mitochondrial 2-oxoglutarate carrier is part of a metabolic pathway that mediates glucose- and glutamine-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem* **285**, 16530-7 (2010).
49. Chertow, B.S. et al. Effects of vitamin A deficiency and repletion on rat insulin secretion in vivo and in vitro from isolated islets. *J Clin Invest* **79**, 163-9 (1987).
50. Cabrera-Valladares, G., German, M.S., Matschinsky, F.M., Wang, J. & Fernandez-Mejia, C. Effect of retinoic acid on glucokinase activity and gene expression and on insulin secretion in primary cultures of pancreatic islets. *Endocrinology* **140**, 3091-6 (1999).
51. Blumentrath, J., Neye, H. & Verspohl, E.J. Effects of retinoids and thiazolidinediones on proliferation, insulin release, insulin mRNA, GLUT 2

- transporter protein and mRNA of INS-1 cells. *Cell Biochem Funct* **19**, 159-69 (2001).
52. Boursolon, P.M., Billaudel, B. & Faure-Dussert, A. Influence of vitamin D3 deficiency and 1,25 dihydroxyvitamin D3 on de novo insulin biosynthesis in the islets of the rat endocrine pancreas. *J Endocrinol* **160**, 87-95 (1999).
 53. Norman, A.W. Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinology* **147**, 5542-8 (2006).
 54. Bland, R. et al. Expression of 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase in pancreatic islets. *J Steroid Biochem Mol Biol* **89-90**, 121-5 (2004).
 55. Aikin, R. et al. Autocrine insulin action activates Akt and increases survival of isolated human islets. *Diabetologia* **49**, 2900-9 (2006).
 56. Xu, G.G. & Rothenberg, P.L. Insulin receptor signaling in the beta-cell influences insulin gene expression and insulin content: evidence for autocrine beta-cell regulation. *Diabetes* **47**, 1243-52 (1998).
 57. Navarro-Tableros, V., Sanchez-Soto, M.C., Garcia, S. & Hiriart, M. Autocrine regulation of single pancreatic beta-cell survival. *Diabetes* **53**, 2018-23 (2004).
 58. Persaud, S.J., Muller, D. & Jones, P.M. Insulin signalling in islets. *Biochem Soc Trans* **36**, 290-3 (2008).
 59. Ahren, B., Nobin, A. & Schersten, B. Insulin and C-peptide secretory responses to glucagon in man: studies on the dose-response relationships. *Acta Med Scand* **221**, 185-90 (1987).
 60. Dor, Y., Brown, J., Martinez, O.I. & Melton, D.A. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* **429**, 41-6 (2004).
 61. Meier, J.J. et al. Beta-cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of beta-cell mass in humans. *Diabetes* **57**, 1584-94 (2008).
 62. Montanya, E., Nacher, V., Biarnes, M. & Soler, J. Linear correlation between beta-cell mass and body weight throughout the lifespan in Lewis rats: role of beta-cell hyperplasia and hypertrophy. *Diabetes* **49**, 1341-6 (2000).
 63. Ackermann, A.M. & Gannon, M. Molecular regulation of pancreatic beta-cell mass development, maintenance, and expansion. *J Mol Endocrinol* **38**, 193-206 (2007).
 64. Rhodes, C.J. Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? *Science* **307**, 380-4 (2005).
 65. Parnaud, G. et al. Proliferation of sorted human and rat beta cells. *Diabetologia* **51**, 91-100 (2008).
 66. Perl, S. et al. Significant human beta-cell turnover is limited to the first three decades of life as determined by in vivo thymidine analog incorporation and radiocarbon dating. *J Clin Endocrinol Metab* **95**, E234-9 (2010).
 67. Bjornholm, M. & Zierath, J.R. Insulin signal transduction in human skeletal muscle: identifying the defects in Type II diabetes. *Biochem Soc Trans* **33**, 354-7 (2005).
 68. Withers, D.J. et al. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* **391**, 900-4 (1998).

69. Association., A.D. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care* **29**, S43-S48 (2006).
70. Shaw, J.E., Sicree, R.A. & Zimmet, P.Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* **87**, 4-14 (2010).
71. Villalpando, S. et al. Prevalence and distribution of type 2 diabetes mellitus in Mexican adult population. A probabilistic survey. *Salud pública de México* **52**(2010).
72. Jarret, J.R. *The epidemiology of diabetes mellitus. Insulin-dependent diabetes mellitus.*, 47-53 (Blackwell Science, Oxford, 1991).
73. Zick, Y. Uncoupling insulin signalling by serine/threonine phosphorylation: a molecular basis for insulin resistance. *Biochem Soc Trans* **32**, 812-6 (2004).
74. Weir, G.C. & Bonner-Weir, S. Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes* **53 Suppl 3**, S16-21 (2004).
75. ADA. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care* **32**, S62-7 (2009).
76. Mathis, D., Vence, L. & Benoist, C. beta-Cell death during progression to diabetes. *Nature* **414**, 792-8 (2001).
77. Eizirik, D.L., Colli, M.L. & Ortis, F. The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes. *Nat Rev Endocrinol* **5**, 219-26 (2009).
78. Kaminitz, A., Stein, J., Yaniv, I. & Askenasy, N. The vicious cycle of apoptotic beta-cell death in type 1 diabetes. *Immunol Cell Biol* **85**, 582-9 (2007).
79. Filippi, C.M. & von Herrath, M.G. Islet beta-cell death - fuel to sustain autoimmunity? *Immunity* **27**, 183-5 (2007).
80. Finegood, D.T., Scaglia, L. & Bonner-Weir, S. Dynamics of beta-cell mass in the growing rat pancreas. Estimation with a simple mathematical model. *Diabetes* **44**, 249-56 (1995).
81. Kassem, S.A., Ariel, I., Thornton, P.S., Scheimberg, I. & Glaser, B. Beta-cell proliferation and apoptosis in the developing normal human pancreas and in hyperinsulinism of infancy. *Diabetes* **49**, 1325-33 (2000).
82. Cardozo, A.K. et al. IL-1beta and IFN-gamma induce the expression of diverse chemokines and IL-15 in human and rat pancreatic islet cells, and in islets from pre-diabetic NOD mice. *Diabetologia* **46**, 255-66 (2003).
83. Cardozo, A.K. et al. A comprehensive analysis of cytokine-induced and nuclear factor-kappa B-dependent genes in primary rat pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* **276**, 48879-86 (2001).
84. Cnop, M. et al. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes* **54 Suppl 2**, S97-107 (2005).
85. Strandell, E., Eizirik, D.L. & Sandler, S. Reversal of beta-cell suppression in vitro in pancreatic islets isolated from nonobese diabetic mice during the phase preceding insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* **85**, 1944-50 (1990).
86. Akirav, E., Kushner, J.A. & Herold, K.C. Beta-cell mass and type 1 diabetes: going, going, gone? *Diabetes* **57**, 2883-8 (2008).

87. Permutt, M.A., Wasson, J. & Cox, N. Genetic epidemiology of diabetes. *J Clin Invest* **115**, 1431-9 (2005).
88. Weir, G.C., Laybutt, D.R., Kaneto, H., Bonner-Weir, S. & Sharma, A. Beta-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. *Diabetes* **50 Suppl 1**, S154-9 (2001).
89. Leahy, J.L., Hirsch, I.B., Peterson, K.A. & Schneider, D. Targeting beta-cell function early in the course of therapy for type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* **95**, 4206-16 (2010).
90. Prentki, M. & Nolan, C.J. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* **116**, 1802-12 (2006).
91. Kim, A. et al. Islet architecture: A comparative study. *Islets* **1**, 129-136 (2009).
92. Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* **414**, 813-20 (2001).
93. McMahon, R.J. Biotin in metabolism and molecular biology. *Annu Rev Nutr* **22**, 221-39 (2002).
94. Said, H.M. Biotin: Biochemical, Physiological and Clinical Aspects. in *Water Soluble Vitamins. Clinical Research and Future Application* (ed. Stanger, O.) 1-20 (Springer, London, UK, 2012).
95. Mock, D.M. Biotin. in *Modern Nutrition in Health and Disease* (eds. Shils, M.E., Shike, M., Ross, A.C., Caballero, B. & Cousins, R.J.) 498-506 (Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA, 2006).
96. Dakshinamurti, K. & Chauhan, J. Biotin. *Vitam Horm* **45**, 337-84 (1989).
97. Ensminger, M.E., Ensminger, A.H., Konlande, J.E. & Robson, J.R. Biotin. in *Foods & Nutrition Encyclopedia*, Vol. 1 210-213 (CRC Press Nutrition/ Encyclopedias, USA, 1993).
98. Prasad, P.D. et al. Cloning and functional expression of a cDNA encoding a mammalian sodium-dependent vitamin transporter mediating the uptake of pantothenate, biotin, and lipoate. *J Biol Chem* **273**, 7501-6 (1998).
99. Prasad, P.D., Ramamoorthy, S., Leibach, F.H. & Ganapathy, V. Characterization of a sodium-dependent vitamin transporter mediating the uptake of pantothenate, biotin and lipoate in human placental choriocarcinoma cells. *Placenta* **18**, 527-33 (1997).
100. Mock, D.M. & Malik, M.I. Distribution of biotin in human plasma: most of the biotin is not bound to protein. *Am J Clin Nutr* **56**, 427-32 (1992).
101. Zemleni, J. & Mock, D.M. Biotin biochemistry and human requirements. *J Nutr Biochem* **10**, 128-38 (1999).
102. Zemleni, J. Uptake, localization, and noncarboxylase roles of biotin. *Annu Rev Nutr* **25**, 175-96 (2005).
103. Zemleni, J. & Mock, D.M. Uptake and metabolism of biotin by human peripheral blood mononuclear cells. *Am J Physiol* **275**, C382-8 (1998).
104. Sealey, W.M., Teague, A.M., Stratton, S.L. & Mock, D.M. Smoking accelerates biotin catabolism in women. *Am J Clin Nutr* **80**, 932-5 (2004).

105. Mock, D.M., Stadler, D.D., Stratton, S.L. & Mock, N.I. Biotin status assessed longitudinally in pregnant women. *J Nutr* **127**, 710-6 (1997).
106. Combs, G.F. *Biotin*. In: *The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health*, 329-343 (Academic Press Inc., U.S.A., 1992).
107. Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. 374-389 (National Academy Press, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, Washington, DC, 1998).
108. Bonjour, J. Biotin. in *Handbook of Vitamins: Nutritional, Biochemical and Clinical Aspects* (ed. Machlin, L.) 403 (Marcel Dekker, New York, 1991).
109. Koutsikos, D., Agroyannis, B. & Tzanatos-Exarchou, H. Biotin for diabetic peripheral neuropathy. *Biomed Pharmacother* **44**, 511-4 (1990).
110. Fiume, M.Z. Final report on the safety assessment of biotin. *Int J Toxicol* **20 Suppl 4**, 1-12 (2001).
111. SRI-International. Microbial mutagenesis testing of substances compound report:F76-041, D-Biotin. NTIS Report No. PB89-169072. (1979).
112. Hayes, S., Gordon, A., Sadowski, I. & Hayes, C. RK bacterial test for independently measuring chemical toxicity and mutagenicity: short-term forward selection assay. *Mutat Res* **130**, 97-106 (1984).
113. Ma, T.H. et al. Tradescantia-Micronucleus (Trad-MCN) tests on 140 health-related agents. *Mutat Res* **138**, 157-67 (1984).
114. Rodriguez-Melendez, R. & Zemleni, J. Regulation of gene expression by biotin (review). *J Nutr Biochem* **14**, 680-90 (2003).
115. Watanabe, T. Morphological and biochemical effects of excessive amounts of biotin on embryonic development in mice. *Experientia* **52**, 149-54 (1996).
116. Baez-Saldana, A. et al. Biotin deficiency and biotin excess: effects on the female reproductive system. *Steroids* **74**, 863-9 (2009).
117. Paul, P.K. & Duttagupta, P.N. The effect of an acute dose of biotin at a post-implantation stage and its relation with female sex steroids in the rat. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **22**, 181-6 (1976).
118. Simmins, P.H. & Brooks, P.H. Supplementary biotin for sows: effect on reproductive characteristics. *Vet Rec* **112**, 425-9 (1983).
119. Fernandez-Mejia, C. Pharmacological effects of biotin. *J Nutr Biochem* **16**, 424-7 (2005).
120. Rodriguez-Melendez, R., Cano, S., Mendez, S.T. & Velazquez, A. Biotin regulates the genetic expression of holocarboxylase synthetase and mitochondrial carboxylases in rats. *J Nutr* **131**, 1909-13 (2001).
121. Solorzano-Vargas, R.S., Pacheco-Alvarez, D. & Leon-Del-Rio, A. Holocarboxylase synthetase is an obligate participant in biotin-mediated regulation of its own expression and of biotin-dependent carboxylases mRNA levels in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 5325-30 (2002).

122. Wiedmann, S., Rodriguez-Melendez, R., Ortega-Cuellar, D. & Zempleni, J. Clusters of biotin-responsive genes in human peripheral blood mononuclear cells. *J Nutr Biochem* **15**, 433-9 (2004).
123. Rodriguez-Melendez, R., Griffin, J.B., Sarath, G. & Zempleni, J. High-throughput immunoblotting identifies biotin-dependent signaling proteins in HepG2 hepatocarcinoma cells. *J Nutr* **135**, 1659-66 (2005).
124. Chauhan, J. & Dakshinamurti, K. Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats. *J Biol Chem* **266**, 10035-8 (1991).
125. De La Vega, L.A. & Stockert, R.J. Regulation of the insulin and asialoglycoprotein receptors via cGMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol Cell Physiol* **279**, C2037-42 (2000).
126. Dakshinamurti, K. & Li, W. Transcriptional regulation of liver phosphoenolpyruvate carboxykinase by biotin in diabetic rats. *Mol Cell Biochem* **132**, 127-32 (1994).
127. Sugita, Y., Shirakawa, H., Sugimoto, R., Furukawa, Y. & Komai, M. Effect of biotin treatment on hepatic gene expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biosci Biotechnol Biochem* **72**, 1290-8 (2008).
128. Vilches-Flores, A., Tovar, A.R., Marin-Hernandez, A., Rojas-Ochoa, A. & Fernandez-Mejia, C. Biotin increases glucokinase expression via soluble guanylate cyclase/protein kinase G, adenosine triphosphate production and autocrine action of insulin in pancreatic rat islets. *J Nutr Biochem* (2009).
129. Romero-Navarro, G. et al. Biotin regulation of pancreatic glucokinase and insulin in primary cultured rat islets and in biotin-deficient rats. *Endocrinology* **140**, 4595-600 (1999).
130. Porat, S. et al. Control of pancreatic beta cell regeneration by glucose metabolism. *Cell Metab* **13**, 440-9 (2011).
131. Borboni, P. et al. Effect of biotin on glucokinase activity, mRNA expression and insulin release in cultured beta-cells. *Acta Diabetol* **33**, 154-8 (1996).
132. Yoshikawa, H. et al. Effects of biotin on glucotoxicity or lipotoxicity in rat pancreatic islets. *Metabolism* **51**, 163-8 (2002).
133. Sone, H. et al. Characteristics of the biotin enhancement of glucose-induced insulin release in pancreatic islets of the rat. *Biosci Biotechnol Biochem* **64**, 550-4 (2000).
134. Sone, H. et al. Biotin enhances glucose-stimulated insulin secretion in the isolated perfused pancreas of the rat. *J Nutr Biochem* **10**, 237-43 (1999).
135. Coggeshall, J.C., Heggors, J.P., Robson, M.C. & Baker, H. Biotin Status and Plasma Glucose in Diabetics. *Ann N Y Acad Sci* **447**, 389-392 (1985).
136. Maebashi, M. et al. Therapeutic Evaluation of the Effect of Biotin on Hyperglycemia in Patients with Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus. *J Clin Biochem Nutr* **14**, 211-218 (1993).
137. Koutsikos, D. et al. Oral glucose tolerance test after high-dose i.v. biotin administration in normoglycemic hemodialysis patients. *Ren Fail* **18**, 131-7 (1996).
138. Zhang, H., Osada, K., Sone, H. & Furukawa, Y. Biotin administration improves the impaired glucose tolerance of streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **43**, 271-80 (1997).

139. Reddi, A., DeAngelis, B., Frank, O., Lasker, N. & Baker, H. Biotin supplementation improves glucose and insulin tolerances in genetically diabetic KK mice. *Life Sci* **42**, 1323-30 (1988).
140. Zhang, H. et al. A high biotin diet improves the impaired glucose tolerance of long-term spontaneously hyperglycemic rats with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **42**, 517-26 (1996).
141. Watanabe-Kamiyama, M. et al. Antihypertensive effect of biotin in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Br J Nutr* **99**, 756-63 (2008).
142. Baez-Saldana, A. et al. Effects of biotin on pyruvate carboxylase, acetyl-CoA carboxylase, propionyl-CoA carboxylase, and markers for glucose and lipid homeostasis in type 2 diabetic patients and nondiabetic subjects. *Am J Clin Nutr* **79**, 238-43 (2004).
143. Revilla-Monsalve, C. et al. Biotin supplementation reduces plasma triacylglycerol and VLDL in type 2 diabetic patients and in nondiabetic subjects with hypertriglyceridemia. *Biomed Pharmacother* **60**, 182-5 (2006).
144. Albarracin, C., Fuqua, B., Geohas, J., Finch, M. & Komorowski, J. Improvement in glycemic control, lipids and insulin sensitivity with the combination of chromium picolinate and biotin in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes care* **54**, A428 (2005).
145. Albarracin, C.A., Fuqua, B.C., Evans, J.L. & Goldfine, I.D. Chromium picolinate and biotin combination improves glucose metabolism in treated, uncontrolled overweight to obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* (2007).
146. Fuhr, J.P., Jr., He, H., Goldfarb, N. & Nash, D.B. Use of chromium picolinate and biotin in the management of type 2 diabetes: an economic analysis. *Dis Manag* **8**, 265-75 (2005).
147. Geohas, J., Daly, A., Juturu, V., Finch, M. & Komorowski, J.R. Chromium picolinate and biotin combination reduces atherogenic index of plasma in patients with type 2 diabetes mellitus: a placebo-controlled, double-blinded, randomized clinical trial. *Am J Med Sci* **333**, 145-53 (2007).
148. Singer, G.M. & 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* **8**, 636-43 (2006).
149. Passage, E. et al. Ascorbic acid treatment corrects the phenotype of a mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Med* **10**, 396-401 (2004).
150. Hinds, T.S., West, W.L. & Knight, E.M. Carotenoids and retinoids: a review of research, clinical, and public health applications. *J Clin Pharmacol* **37**, 551-8 (1997).
151. Larrieta, E. et al. Effects of biotin deficiency on pancreatic islet morphology, insulin sensitivity and glucose homeostasis. *J Nutr Biochem* (2011).
152. Baez-Saldana, A. & Ortega, E. Biotin deficiency blocks thymocyte maturation, accelerates thymus involution, and decreases nose-rump length in mice. *J Nutr* **134**, 1970-7 (2004).

153. Burri, B.J., Sweetman, L. & Nyhan, W.L. Heterogeneity of holocarboxylase synthetase in patients with biotin-responsive multiple carboxylase deficiency. *Am J Hum Genet* **37**, 326-37 (1985).
154. Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-8 (2001).
155. Brenner, R.M. et al. Immunocytochemical assessment of mitotic activity with an antibody to phosphorylated histone H3 in the macaque and human endometrium. *Hum Reprod* **18**, 1185-93 (2003).
156. Esni, F. et al. Neural cell adhesion molecule (N-CAM) is required for cell type segregation and normal ultrastructure in pancreatic islets. *J Cell Biol* **144**, 325-37 (1999).
157. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54 (1976).
158. Lazo-de-la-Vega-Monroy, M.L. & Fernandez-Mejia, C. Transcription factors in the adult beta cell. *Rev Invest Clin* **61**, 428-46 (2009).
159. Crisp, S.E. et al. Biotin supply affects rates of cell proliferation, biotinylation of carboxylases and histones, and expression of the gene encoding the sodium-dependent multivitamin transporter in JAr choriocarcinoma cells. *Eur J Nutr* **43**, 23-31 (2004).
160. Valenciano, A.I., Mayordomo, R., de La Rosa, E.J. & Hallbook, F. Biotin decreases retinal apoptosis and induces eye malformations in the early chick embryo. *Neuroreport* **13**, 297-9 (2002).
161. Teta, M., Long, S.Y., Wartschow, L.M., Rankin, M.M. & Kushner, J.A. Very slow turnover of beta-cells in aged adult mice. *Diabetes* **54**, 2557-67 (2005).
162. Mall, G.K., Chew, Y.C. & Zempleni, J. Biotin requirements are lower in human Jurkat lymphoid cells but homeostatic mechanisms are similar to those of HepG2 liver cells. *J Nutr* **140**, 1086-92 (2010).
163. Han, J. & Liu, Y.Q. Reduction of islet pyruvate carboxylase activity might be related to the development of type 2 diabetes mellitus in Agouti-K mice. *J Endocrinol* **204**, 143-52 (2010).
164. Dahl, U., Sjodin, A. & Semb, H. Cadherins regulate aggregation of pancreatic beta-cells in vivo. in *Development* Vol. 122 2895-902 (1996).
165. Cirulli, V. et al. Expression of neural cell adhesion molecule (N-CAM) in rat islets and its role in islet cell type segregation. *J Cell Sci* **107 (Pt 6)**, 1429-36 (1994).
166. Pick, A. et al. Role of apoptosis in failure of beta-cell mass compensation for insulin resistance and beta-cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes* **47**, 358-64 (1998).
167. Parsons, J.A., Brelje, T.C. & Sorenson, R.L. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. *Endocrinology* **130**, 1459-66 (1992).
168. Kim, H. et al. Serotonin regulates pancreatic beta cell mass during pregnancy. *Nat Med* **16**, 804-8 (2010).

169. Kilimnik, G. et al. Altered islet composition and disproportionate loss of large islets in patients with type 2 diabetes. *PLoS One* **6**, e27445 (2011).
170. Olofsson, C.S. et al. Impaired insulin exocytosis in NCAM^{-/-} mice due to defective reorganization of the submembrane F-actin network. *Endocrinology* (2009).
171. Jewell, J.L., Luo, W., Oh, E., Wang, Z. & Thurmond, D.C. Filamentous actin regulates insulin exocytosis through direct interaction with Syntaxin 4. *J Biol Chem* **283**, 10716-26 (2008).
172. Babu, D.A., Deering, T.G. & Mirmira, R.G. A feat of metabolic proportions: Pdx1 orchestrates islet development and function in the maintenance of glucose homeostasis. *Mol Genet Metab* **92**, 43-55 (2007).
173. Matschinsky, F.M. Assessing the potential of glucokinase activators in diabetes therapy. *Nat Rev Drug Discov* **8**, 399-416 (2009).
174. Wang, H., Kouri, G. & Wollheim, C.B. ER stress and SREBP-1 activation are implicated in beta-cell glucolipototoxicity. *J Cell Sci* **118**, 3905-15 (2005).
175. Takahashi, A. et al. Transgenic mice overexpressing nuclear SREBP-1c in pancreatic beta-cells. *Diabetes* **54**, 492-9 (2005).
176. Ravnskjaer, K. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) potentiates, whereas PPARgamma attenuates, glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic beta-cells. *Endocrinology* **146**, 3266-76 (2005).
177. Aizawa, T. et al. Size-related and size-unrelated functional heterogeneity among pancreatic islets. *Life Sci* **69**, 2627-39 (2001).
178. Kushner, J.A. et al. Pdx1 restores beta cell function in Irs2 knockout mice. *J Clin Invest* **109**, 1193-201 (2002).
179. Holland, A.M., Gonez, L.J., Naselli, G., Macdonald, R.J. & Harrison, L.C. Conditional expression demonstrates the role of the homeodomain transcription factor Pdx1 in maintenance and regeneration of beta-cells in the adult pancreas. *Diabetes* **54**, 2586-95 (2005).
180. Johnson, J.D. et al. Insulin protects islets from apoptosis via Pdx1 and specific changes in the human islet proteome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 19575-80 (2006).
181. Kassem, S. et al. Large islets, beta-cell proliferation, and a glucokinase mutation. *N Engl J Med* **362**, 1348-50 (2010).
182. Larrieta, E. et al. Pharmacological concentrations of biotin reduce serum triglycerides and the expression of lipogenic genes. *Eur J Pharmacol* **644**, 263-8 (2010).



FELLOWS CORNER

Transcription factors in the adult β -cell

María Luisa Lazo-de-la-Vega-Monroy,* Cristina Fernández-Mejía*

* Unidad de Genética de la Nutrición, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México/Instituto Nacional de Pediatría.

ABSTRACT

Insulin secretion by the pancreatic β -cell is critical to maintain glucose homeostasis, and it is found impaired in type 1 diabetes by β -cell autoimmune destruction, in type 2 diabetes by β -cell inherent multifactorial failure, and in monogenic diabetes (MODY) by mutations in specific genes. During the last two decades, several β -cell-specific transcription factors regulating insulin synthesis and secretion have been identified. Knockout mice studies for these genes, as well as MODY phenotype reveal their importance for normal development and function of the β -cell. These factors participate in physiologically important signaling pathways of the β -cell, being regulated not only in their expression by other genes, but also in their activity by other proteins and by post-translational modifications. Their study will help to understand normal β -cell function, essential knowledge in the development of new therapies for diabetes.

Key words. β -cell. Transcription factors. Insulin secretion. Diabetes mellitus.

INTRODUCTION

Diabetes mellitus has become one of the most prevalent diseases worldwide.¹ It is a group of metabolic diseases characterized by hyperglycemia, resulting from defects in insulin secretion, insulin action or both. The American Diabetes Association classifies this disease as: type 1 (DM1), type 2 (DM2), other diabetes forms included MODY, and gestational diabetes.²

Type 1 diabetes is originated by an autoimmune destruction of pancreatic β -cells, causing insulin deficiency, while type 2 diabetes is characterized by im-

Factores transcripcionales en la célula β adulta

RESUMEN

La secreción de insulina por la célula β pancreática es crítica para mantener la homeostasis de la glucosa. Dicha secreción se encuentra alterada en la diabetes tipo 1, por destrucción autoinmune de la célula β ; en la diabetes tipo 2, por fallas multifactoriales aún no bien determinadas; y en las formas monogénicas de diabetes (MODY), por mutaciones en genes específicos. En los últimos años se han encontrado factores transcripcionales, varios de ellos específicos de la célula β , que modulan la síntesis y secreción de insulina en respuesta a glucosa. Estudios en ratones knockout para estos genes, así como las formas de diabetes MODY, demuestran su importancia para el desarrollo y funcionamiento normales de la célula β . Estos factores transcripcionales se regulan no solamente en su expresión por otros genes, sino también en su actividad por otras proteínas y modificaciones postranscripcionales, participando así en vías de señalización importantes dentro de la fisiología de la célula β . El estudio de estos factores transcripcionales es esencial en la comprensión del funcionamiento normal de la célula β , conocimiento necesario para el desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento de la diabetes.

Palabras clave. Célula β . Factor transcripcional. Secreción de insulina. Diabetes mellitus.

paired insulin action (termed insulin resistance), abnormal insulin secretion, or both.³ β -cell function and survival fails both in type 1 and type 2 diabetes, thus affecting insulin production and secretion.

Transcription factors that determine and maintain the β -cell phenotype by regulating insulin production and secretion have been identified. The importance of these factors in glucose metabolism regulation became evident in the diseases caused by mutations in their genes, better known as maturity onset diabetes of the young or MODY² (Table 1).

Expression and activity of these transcription factors are regulated at different levels:

Table 1. Characteristics, pancreatic expression, and mutation-associated phenotypes of adult β -cell transcription factors.

Transcription Factor	Other names	Homeodomain in pancreas	Expression	Mutation-associated phenotypes in human
FOXO1 PDX1	FKHR Ipf-1, Stf-1, Iuf-1, Idx-1	FOX (Forkhead Box) Parahox	β β and some δ	MODY 4
FOXA2	HNF3 β , Lhx1, Lim1	FOX (Forkhead Box)	All the endocrine islet cells	PHHI
MafA	RIPE3b1	bZip, <i>basic leucine zipper</i>	β	
NeuroD1 HNF1 α	BETA2 TCF-1	bHLH Nuclear receptor superfamily	β , few α and few δ β	MODY 6 MODY 3
HNF4 α	TCF14	Nuclear receptor superfamily	β	MODY 1
Pax4 Pax6		Paired-homeodomain	β and δ	MODY9, DM2
Nkx2.2 Nkx6.1		Paired-homeodomain NK-homeodomain NK-homeodomain	All the endocrine islet cells α , β and PP β	Aniridia, DM2

- Transcriptional.
- By synergy with other proteins.
- By post-transcriptional modifications.

Among the factors regulating their expression and activity there are: oxidative stress,⁴ nutrients such as fatty acids,⁵ glucose,^{4, 6-10} and vitamins.¹¹

In the present article we review the role of some of the main transcription factors of the β -cell in the function and maintenance of its adult phenotype, aiming to integrate the current knowledge about their transcriptional and post-translational regulation, the signaling pathways participating in their activity and expression, the transcriptional networks in which they are involved, and their role in diabetes.

FUNCTION AND SIGNALLING OF THE B-CELL

The pancreas is an endocrine and exocrine gland. The exocrine portion corresponds to acinar tissue, responsible for secreting digestive enzymes into the pancreatic juice, while the endocrine portion comprises the pancreatic islets, which consist of several cell types secreting different hormones: β -cells (insulin), α -cells (glucagon), δ -cells (somatostatin), PP-cells (pancreatic polypeptide) and ϵ -cells (ghrelin). The endocrine pancreas represents only 1% to 5% of the total pancreatic mass.¹² In the islet, β -cells are approximately 70% to 80% of the total islet cells. Most of the studies about transcription factors and

their function in pancreatic islets are focused on β -cells owing to the difficulty in evaluating other islet cell types less represented in the pancreas.

The adult β -cell is a highly specialized cell which controls insulin production, processing, storage and secretion in response to metabolic changes, circulating hormones and neurotransmitters. A group of transcription factors participate in the control of these functions, regulating in concert the expression of insulin and other key components of the coupling process of insulin synthesis and secretion in adequate amounts for covering the organism's metabolic demands.^{13,14} Alterations to this processes are causes of disease, for example, type 2 diabetes, which develops when the β -cell, as a result of an acquired secretory dysfunction and/or a decrease in the β -cell population, can no longer secrete enough insulin to compensate the increased demand originated by insulin resistance.¹⁵ These failures may occur either by primary defects of the β -cell, mainly in the expression of transcription factors, or by secondary defects, caused by glucotoxicity, free fatty acid increases, cytokines, mitochondrial dysfunction or metabolic stress.

The molecular mechanism by which insulin is secreted in response to plasmatic concentrations of glucose is a complex process involving transport and oxidation of glucose, electrophysiological changes, and fusion of insulin-containing secretory granules with the β -cell plasma membrane (Figure 1). Glucose enters the β -cell by GLUT2, in rodents, and main-

ly by GLUT1 in humans.¹⁶ Once inside the cell, glucose is phosphorylated to form glucose-6-phosphate by the enzyme hexokinase IV or glucokinase, this being the rate-limiting step for glycolysis in the pancreatic β -cell. Increases in the ATP/ADP ratio due to ATP generation by glycolysis and the mitochondrial metabolism close the ATP-sensitive K^+ channel (formed by four units of the sulfonylurea receptor (SUR1), and four units of the inward rectifying K^+ channel (Kir6.2)). This event causes depolarization of the plasma membrane, opening of voltage-dependent Ca^{2+} channels and a flux of calcium into the cell, leading to the fusion of insulin granules with the plasma membrane and, consequently, insulin release.¹⁷ Sodium channels also participate in membrane depolarization in the β -cell, and therefore in insulin secretion.¹⁸ It has been suggested that TRP channels also contribute to depolarization, calcium entrance to the β -cell and intracellular calcium flux.¹⁹

Insulin secretion in response to the plasmatic concentration of glucose can be increased or decreased by several neurotransmitters and hormones via activation of membrane receptors on the β -cell.²⁰ The G protein receptors and adenylate cyclase pathway are responsible for mediating these effects. Ligands that increase the activity of adenylate

cyclase and cAMP have a positive effect on insulin synthesis and secretion,²¹ while ligands that decrease adenylate cyclase activity affect insulin secretion in a negative way. The adenylate cyclase pathway may be activated by some neurotransmitters, like acetylcholine, and hormones like GLP-1. GLP-1 is also an important factor for insulin synthesis and secretion, having a trophic effect on the β -cells as well.²² Other modulating pathways are activated in the β -cells in response to oxidative stress caused by high glucose levels, like the JNK pathway, which ablates insulin synthesis and interferes with its action.²³

Various studies have shown an autocrine role of insulin on β -cell function and survival.²⁴⁻²⁶ In this process, insulin binding by its receptor located in the β -cell promotes the receptor's autophosphorylation, catalyzing subsequent tyrosine phosphorylation of other proteins like IRS (IRS1 and IRS2). Once phosphorylated, these proteins interact with signaling molecules, which results in a phosphorylation cascade where PI3K, PDK and Akt are sequentially activated. Akt is a serine/threonine kinase which regulates processes such as cell survival, proliferation, growth, and nutrient metabolism, through phosphorylation of different proteins like GSK3, FOXO, and CREB.²⁷ Both the activated insu-

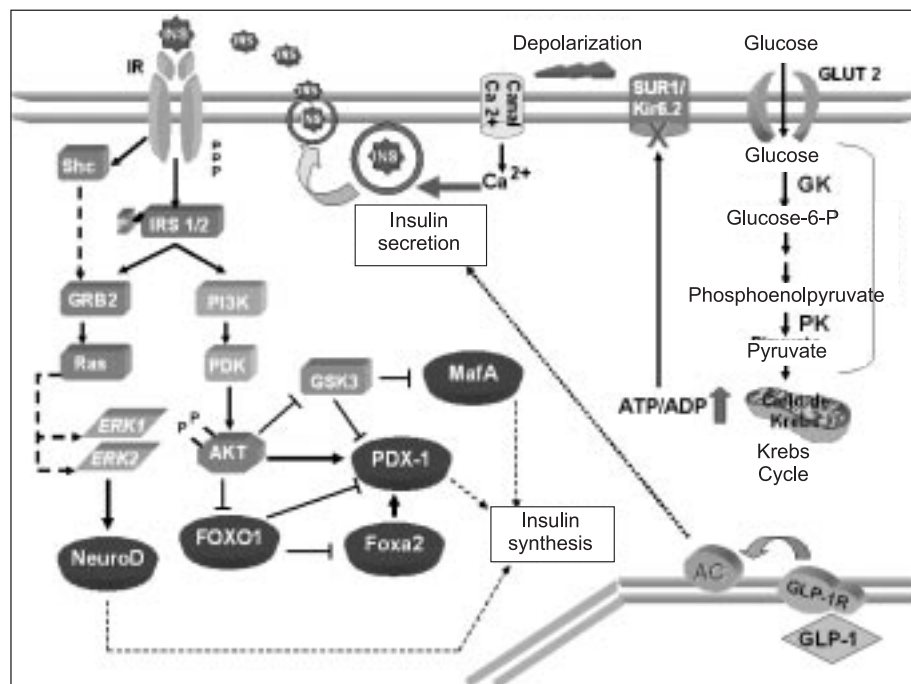


Figure 1. Glucose-induced insulin secretion process and autocrine role of insulin in β -cell. Glucose metabolism in the β -cell increases ATP/ADP ratio, which causes closure of the ATP-sensitive K^+ channel, subsequent cell membrane depolarization and voltage-dependent calcium channel opening. This increases calcium influx toward the cytoplasm, causing the insulin granules to fuse with the plasma membrane and hence insulin secretion. This mechanism can be potentiated by GLP-1 action on its receptor located in the β -cell membrane. The released insulin can have autocrine effects on the β -cell insulin receptor, causing its autophosphorylation and catalyzing subsequent phosphorylation of IRS1/2 and/or Shc. This results in the activation of certain signaling pathways, particularly PI3K-Akt and Ras-

ERK. Among other actions, these pathways activate transcription factors that participate directly (NeuroD, MafA, PDX1) or indirectly (FoxO1, Foxa2) in the insulin gene transcription.

lin receptor (through Shc), and IRS may act on the Ras signaling pathway, which in turn activates MAP kinases ERK1/2, in this way regulating growth, cellular differentiation and protein synthesis.²⁸

TRANSCRIPTION FACTORS

Transcription factors are proteins that regulate mRNA transcription by binding to specific sequences in the promoters and other *cis* elements from a specific gene. These specific sequences are named response elements. Although response elements are necessary for the binding of the transcription factor to DNA, the activating or repressing effect of transcription factors on their target genes also depends on:

- The amount, localization and activity of the factor in the nucleus.
- Its interference or synergy with other transcription factors and/or the transcriptional machinery.
- The chromatinic environment of the gene they are regulating.²⁹

Given their participation in specific modulation of protein expression, which confers the cell's characteristic functions of its differentiated cell type, transcription factors play a crucial role during development and maintenance of an organism's phenotype²⁹.

Identification of transcription factors and the study of the phenotype presented in their knockout models have aided to increase the knowledge about adult β -cell functions and their regulation, revealing that many of them are involved not only in differentiation but also in maintenance of the characteristic features of the adult β -cell.³⁰ The mechanisms of action and regulation of transcription factors in the β -cell have just started to being elucidated. Most of them involve recruiting histone acetyltransferases such as CBP or p300 to their target gene promoter, opening chromatin structures, or binding to other cofactors (Table 2).

TRANSCRIPTION FACTORS REGULATING ADULT B-CELL FUNCTION

FOXO1

FOXO1 (formerly FKHR) is an important factor in regulating the β -cell response to nutrients and stress.⁴ It belongs to the FOX proteins family, which

contains a DNA binding domain of 100 aminoacids in the form of a winged helix, called Forkhead box. Although a consensus binding sequence called FRE (FoxO-recognized element) has been identified,³¹ the molecular basis of the binding of these factors to DNA have not been clarified.

FOXO1 is only expressed in adult β -cells.^{32,33} Intriguingly, its mRNA abundance is increased in islets from diabetic patients, with no explanations yet for this phenomenon.³⁴ Heterozygous *foxO1* mice are protected against developing hyperglycemia and hyperinsulinemia derived from a high-fat diet compared to wild-type mice.³⁵

It has been suggested that FOXO1 participates in β -cell proliferation. In a transgenic model, constitutive FOXO1 nuclear expression prevented β -cell hyperplasia.³⁶ Also, in *Irs2*^{-/-} knockouts with functional defects of the β -cell, ablation of one *foxO1* allele restores β -cell proliferation, suggesting FOXO1 is an IRS2 downstream target.³²

FOXO1 may be regulated post-translationally by growth factors such as IGF-1 or insulin³² through phosphorylation by PKB/Akt³⁷ and other kinases,³⁸ causing its translocation from the nucleus to the cytoplasm, thereby inhibiting its activity.³⁷ Phosphorylation also favors FOXO1 ubiquitination,³⁹ and it is considered that acetylation and deacetylation of FOXO proteins play a role in its regulation as well.⁴⁰ Although it is not a determinant mechanism for FOXO1 binding to the nucleosome, acetylation is a key step in the removal of FOXO factors from chromatin.⁴¹ Other signals that may be involved in FOXO1 phosphorylation are glucose (through an insulin autocrine/paracrine effect)⁶ and GLP-1.⁴²

PDX1

PDX1 is a member of the group of Parahox genes, important in embryonic development, which are not located within the classic Hox (homeobox) genes. In the adult stage, PDX1 is only expressed in islet β -cells and some δ cells, while during development it is also expressed at lesser extent in acinar tissue and duct cells.⁴³ This transcription factor is determinant for pancreatic function. β -cell-specific knockout studies show that when *pdx1* is ablated, β -cell function is impaired and mice present diabetic phenotypes.⁴⁴

Knockout mice for *pdx1* survive after birth, but they die soon after, and present complete agenesis of the pancreas.⁴⁵ The haploinsufficiency of this gene in mice causes glucose intolerance and defective glucose-induced insulin secretion from eight weeks of life, features that increase over time.⁴⁶ Deletion of

Table 2. Roles, mechanisms of action, and regulation of adult β -cell transcription factors.

Transcription Factor Genes	Knockout (KO) and Transgenic Phenotypes	Effects and β -functions in the cell	Target Genes	Known mechanisms of action	Transcriptional Regulation	Post-translational regulation
FOXO1	<p>Homozygous KO: Prenatal death¹³⁹</p> <p>Heterozygous KO: Protected against high-fat diet induced diabetes³⁵</p>	<p>Transcriptional repressor³²</p> <p>Decreases β-cell hyperplasia³⁶</p>	<p><i>Pdx1</i>³² <i>Foxa2</i>⁷³</p> <p><i>PPARα</i>⁷⁴</p>	Competition with Foxa2 ³²		<p>Inhibition: IRS2, IGF-1, insulin³² PKB/κt^{37, 140, 141, 142} phosphorylation inhibit nuclear translocation and favor ubiquitination^{32, 37-}</p> <p>Acetylation by CBP1⁴³ and p300⁴⁰ limit its action, lowering its binding to the nucleosome⁴¹</p> <p>Activation: Nuclear translocation by the JNK pathway⁴</p>
PDX1	<p>Homozygous KO: Postnatal death, complete agenesis of the pancreas⁴⁵</p> <p>Heterozygous KO: Glucose intolerance, impaired glucose-induced insulin secretion since 8 wk, increasing with age. Altered NADP(H) generation in response to glucose⁴⁶</p> <p>Adult β-cell-specific deletion: diabetic phenotype with age⁴⁴</p>	<p>Transcriptional activator⁵⁹</p> <p>Proliferation and maintenance of β-cells⁴⁸</p> <p>Correct post-translational insulin processing and secretion, GLP-1 receptor expression in the β-cell⁵⁶</p>	<p><i>Pdx1</i>⁵² <i>glut2</i>^{44, 46} <i>pax4</i>⁶² <i>Nkx6</i>¹⁴⁴ <i>MafA</i>⁵³ <i>hnf1α</i>⁵⁴ <i>IAPP</i>^{46, 52} <i>insulin</i>^{44, 52, 143} <i>nd1</i>, <i>TFAM</i>⁵⁵ <i>Bcl\subscript{XL}</i> and <i>Bcl-2</i>⁶⁸</p>	Its DNA binding is susceptible to the chromatinic state ⁵² E47 binding, ^{59, 144} recruitment of transcriptional co-activators like CBP/p300 ⁶¹ and HDACs. ¹⁴⁵ Increases histone acetylation ⁶⁰	<p>FoxA2^{63, 146} HNF1α^{63, 147} PDX1^{65, 46} PPARγ⁶⁴ SP1 and SP3⁶³</p>	<p>Inhibition: Phosphorylation by GSK3 (proteasome degradation)⁷¹</p> <p>Activation: Phosphorylation by PI3K⁷ and ERK1/2,^{7, 70} sumoylation⁶⁹ glycosylation⁹</p>

39, 140, 141, 142

FOXA2	<p>Homozygous KO: embryonic death⁸¹</p> <p>Heterozygous KO: normal phenotype¹⁴⁸</p> <p>Embryonic β-cell deletion: Postnatal death, hypoglycemia and hyperinsulinism, islets do not secrete insulin in response to glucose⁸²</p>	<p>Transcriptional activator^{149,150}</p> <p>Participates in the vesicle docking and insulin secretion processes^{82,86}</p>	<p><i>Hadhsc</i>⁸² <i>Glucokinase</i>^{84,148} <i>Glut2</i>⁸⁴ <i>PDX1</i>⁸² <i>HNF4α</i>⁸⁴ <i>HNF1α</i>⁸⁴ <i>MafA</i>⁵³ <i>pyruvate carboxylase</i>⁸⁵ <i>Sur1</i> <i>Kir6.2</i>^{82,84}</p>	<p>Opens chromatin structures^{77,79,80}</p>	<p>Inhibition: miR-124a2¹⁵¹</p>	
MafA	<p>Homozygous KO: Present DM between 8 and 12 weeks of age, impaired glucose-induced insulin secretion, altered islet architecture and lowered <i>insulin</i> and <i>glut2</i> transcription</p> <p>Heterozygous KO: Glucose intolerance, impaired glucose-induced insulin secretion, altered islet architecture⁸⁷</p>	<p>Transcriptional activator¹⁵²</p> <p>Regulates genes involved in insulin processing and secretion, and in GLP-1 signaling^{10,87}</p>	<p><i>PC1/3</i>, <i>Kir6.2</i> and <i>SUR1</i>, <i>GLP1-R</i>, <i>GLUT2</i>⁸⁸ <i>GK</i> and <i>Piruvate carboxylase</i>¹⁰</p>	<p>Homodimer formation through its leucine zipper domains¹⁵³⁻¹⁵⁵</p> <p>Interaction and synergy with PDX1 and NeuroD1⁸⁹</p> <p>Increases H3 histone acetylation level⁶⁰</p>	<p>Glucose increases its mRNA⁵</p> <p>PDX1, Nkx2.2 and Foxa2⁵³</p>	<p>Activation: Glucose increases its expression and activity⁵</p> <p>Inhibition: Phosphorylation mediated by a non-identified kinase, and subsequently by GSK3 (proteasome degradation)⁹⁰ sumoylation lowers its activity on the insulin promoter⁹¹</p>
NeuroD1	<p>Homozygous KO: Stops β-cell expansion and islet development in embryonic stage. Severe diabetes and postnatal death⁹³</p>	<p>Transcriptional activator^{92,156}</p>	<p><i>insulin</i>^{92,156} <i>SUR1</i>⁹⁴ <i>Glucokinase</i>⁹⁵</p>	<p>Dimerizes with E47^{92,156} and binds p300⁹⁶</p>	<p>Activation: Phosphorylation by ERK2 (regulates DNA binding and Heterodimer formation)⁷⁰</p> <p>Nuclear localization</p>	

HNF1 α	<p>Homozygous KO: Dwarfism, abnormal hepatic function, phenylketonuria, glucosuria by renal tubule dysfunction, low insulin secretion by alterations in β-cell glucose metabolism, diabetes¹⁰⁶⁻¹⁰⁸</p> <p>Heterozygous KO: Normal phenotype¹⁰⁶</p> <p>Deletion in embryonic β-cell: Diabetes at 6 wks of age, apoptosis¹⁵⁷</p>	Transcriptional activator ¹⁰⁴	<p><i>HNF4α</i>^{100,158} <i>Insulin</i>¹⁰³ <i>L-PK</i>^{103,104} <i>glut2</i>^{103-105,159}</p>	Recruits p300, ¹⁰⁵ hyperacetylation of H3 histone pancreas ¹⁰⁴	HNF4 α ¹⁰¹
HNF4 α	<p>Homozygous KO: Prenatal death¹¹⁶</p>	<p>Transcriptional activator^{110,111,113}</p> <p>Necessary for correct glucose-induced insulin secretion^{110,111,160} normal function of the ATP-sensitive K⁺ channel^{110,160} and the energetic equilibrium at mitochondrial level¹¹¹</p>	<p><i>HNF1α</i>¹⁰¹ <i>L-PK</i>^{109-112, 161} <i>AldoB</i>¹¹¹ <i>glut2</i>^{111,112} <i>UCP2</i>¹¹¹ <i>insulin</i>^{111,113} <i>PPARα</i>¹⁶⁰</p>	Binding to CBP, ¹¹⁴ GRIP1, SRC-1 y p300. ¹¹⁵	HNF1 α ^{100,158}
Pax4	<p>Homozygous KO: Postnatal death, Deficiency in β and δ cells production¹⁶²</p>	<p>Transcriptional repressor^{120,163,164}</p> <p>Essential regulator in β-Cell differentiation¹¹⁷</p>	<p><i>IAPP</i>¹⁶⁵ <i>Glucagon</i>¹⁶³ <i>Ghrelin</i>¹⁶⁶ <i>Pax4</i>¹¹⁹HNF1α¹⁶⁷ <i>Bcl-xL</i>¹²¹</p>	Competition with Pax6 ^{163 164}	HNF1 α ¹⁶⁷

Pax6	<p>Homozygous KO: Postnatal death, disorganized islets, lack of α cells¹²²</p> <p>Heterozygous KO: Glucose intolerance, insulin hyposecretion. Low GLP-1 in plasma¹⁶⁸</p> <p>Deletion in embryonic β-cell: Postnatal death, hyperglycemia, hypoinsulinemia, ketosis¹²⁴</p>	<p>Transcriptional activator^{122,126}</p> <p>α cell differentiation¹²²</p> <p>Essential in the expression of β-cell final differentiation markers¹²⁴</p>	<p><i>PC1/3</i>¹²³ <i>glut2</i>¹²⁴ <i>pdx1</i>¹²⁵ <i>Insulin</i>¹²⁶ <i>Glucagon</i>^{126, 169} <i>Somatostatin</i>¹²⁶</p>	Interaction with the coactivator p300 ^{128,170}	NeuroD1/Beta2 ¹⁷¹ SEF, Sp1 ¹⁷²	Activation: ERK, p38 ¹²⁷ and HIPK2 ¹²⁸ phosphorylation
Nkx2.2	<p>Homozygous KO: Diabetes, postnatal death, failure in the β-cell final differentiation¹⁷³</p> <p>Repression in mature β-cell: Glucose intolerance, decreased insulin synthesis and secretion, low <i>glut2</i>, <i>MafA</i> and <i>insulin</i> expression, altered islet architecture¹²⁹</p>	<p>Transcriptional activator in mature β-cell^{53,129}</p> <p>Transcriptional repressor during pancreatic development¹⁷⁴</p>	<p><i>MafA</i>⁵³ <i>Insulin</i>¹³⁰</p>		<i>Foxa2</i> , <i>NeuroD1</i> , <i>Ngn3</i> ¹³¹	
Nkx6.1	<p>Homozygous KO: Inhibited β-cell formation¹⁷⁵</p>	<p>Transcriptional repressor¹³⁵</p> <p>Transcriptional activator of its own gene¹³⁴</p>	<p><i>Glucagon</i>¹³³ <i>Insulin</i>¹³⁵</p>	BID in carboxyl end ¹³⁵	PDX-1, ¹³² Nkx2.2, ^{132, 175} PPARγ ¹³⁸	

pdx1 in adult mice also causes a diabetic phenotype that increases with age.⁴⁴ It has been suggested that a decrease in PDX1 activity may be a susceptibility factor for the onset of type 2 diabetes.⁴⁶ Moreover, mutations in the human homologue of *pdx1* (*Ipf1*) are the cause of MODY4.⁴⁷

PDX1 plays a role in the maintenance and proliferation of β -cells as well.⁴⁸ Studies in Zucker diabetic fatty rats suggest that PDX1 activation is downstream of IR/IGF1R signaling by Akt.⁴⁹ In addition *pdx1* overexpression in *Irs2* knockouts participates in β -cell mass recovery and helps ameliorate glucose tolerance,⁵⁰ whereas *pdx1* haploinsufficiency causes β -cell apoptosis.⁵¹

Many of the target genes for *pdx1* are crucial for β -cell function, such as glucose transporter *glut2*,⁴⁴ the amyloid polypeptide of the islet gene, the insulin gene,⁵² and transcription factors *pax4*,⁵² *Nkx6.1*,⁴⁴ *MafA*⁵³ and *hnf4a*⁵⁴ (discussed later in this review). In addition, PDX1 is capable of regulating its own gene.⁵²

Mitochondrial genes are important targets for PDX1 as well, and may be regulating the mechanism of insulin secretion as well,⁵⁵ since ATP production is critical for glucose-stimulated insulin secretion. Among these genes we find the *nd1* subunit of the NADH dehydrogenase of the complex I of the respiratory chain, and the mitochondrial transcription factor TFAM, important for mitochondrial gene expression. Therefore, loss of PDX1 function is associated with a low concentration of total ATP and NADPH.^{46,55}

PDX1 decrease has also been associated with apoptosis and reduced expression of the anti-apoptotic genes Bcl_{XL} and Bcl-2,⁸ defects in post-translational processing of insulin, inhibition of GLP-1 receptor expression,⁵⁶ glucotoxicity⁵⁷ and lipotoxicity.^{4,58}

PDX1 recognizes specific sequences in the DNA with great affinity, depending on the opening state of the chromatin.⁵² There is evidence of PDX1 binding to other transcription factors, such as E47 (bHLH protein participating in the regulation of genes in response to glucose by binding to E boxes in the promoters),⁵⁹ to exert its role as a transactivator. PDX1 increases the acetylation in H3 and H4 histones from the insulin gene promoter⁶⁰ and recruits transcriptional coactivators such as CBP/p300,⁶¹ which enhance transcriptional elongation by components of the basal transcription machinery.⁶²

The *pdx1* gene has a conserved region 2 kb before the start codon in mammals, called Area I-II-III, which includes binding sites for different transcrip-

tion factors such as *Foxa2*,⁶³ *HNF1 α* ,⁶³ *PPAR γ* ⁶⁴ and PDX1 itself.⁶⁵ *Foxa2* as well as *HNF1 α* , together with SP1 and SP3, cooperatively regulate *pdx1* expression.⁶³ Areas I and II have been related with islet-specific expression of this gene during late embryonic development and the adult stage.⁶⁶ PDX1 is also regulated by FOXO1 (see: FOXO1 regulation of PDX1 section).

PDX1 has a nuclear localization signal,⁶⁷ and it may possibly be regulated by modifications determining its nucleus/cytoplasm location, in a similar way as FOXO1. It has been suggested that PDX1 is rendered inactive in the cytoplasm in response to palmitate⁵ or stress,⁸ while it is activated⁶⁸ by translocation from the nuclear periphery to the nucleoplasm in response to glucose or insulin^{6,7}, although some studies have not found this glucose-dependent translocation.⁶⁷ PDX1 is also prone to other post-translational regulation besides phosphorylation,^{7,68} such as sumoylation⁶⁹ and glycosylation.⁹ Phosphorylation has been suggested as the main activation mechanism in response to high glucose levels, involving protein kinases such as ERK1/2⁷⁰ y PI3K⁷ in this process. Furthermore, PDX1 phosphorylation by GSK3 has been associated with its degradation by the proteasome, regulating its activity in a negative fashion during oxidative stress.⁷¹

As this transcription factor is capable of reprogramming non-pancreatic cells into pancreatic-phenotype cells, current studies are directed to determine the use of PDX1 as a therapeutic target for diabetes treatment and for β -cell development and transplant.⁷²

REGULATION OF FOXO1 ON PDX1

During pancreatic embryonic development, FOXO1 and PDX1 are expressed in parallel to each other, but their location within the nucleus is mutually exclusive.³³ Several studies suggest there is a negative correlation between FOXO1 activity and PDX1 expression levels.³² FOXO1 and *Foxa2*, a PDX1 transactivator, compete for common binding sites in the *pdx1* promoter,³² while FOXO1 represses *Foxa2* transcription.⁷³ Moreover, studies in *FoxO1* haploinsufficient mice and cell lines have suggested that this transcription factor inactivates PDX1 by negatively regulating *PPAR γ* , another *pdx1* transactivator.⁷⁴

Studies in cell lines have demonstrated that FOXO1 is translocated to the nucleus by JNK pathway activation in response to stress, and that this

translocation reduces nuclear expression of PDX1. In contrast, inhibition of *FoxO1* expression by siRNA restores nuclear PDX1 expression. Since Akt activity is reduced in response to oxidative stress, this kinase could be related to the nucleocytoplasmic localization of PDX1.⁴

In β -cells, FOXO1 is mainly localized in the cytoplasm due to the constant autocrine insulin secretion.²⁴ If these cells are exposed to oxidative stress, like in hyperglycemia, FOXO1 translocates to the nucleus, decreasing PDX1 nuclear expression and increasing transcription levels of MafA and NeuroD, two transcription factors (discussed later in this review) participating in insulin gene transcription and in β -cell function maintenance.⁴

FOXA2

Foxa2 (HNF3 β) is a transcription factor that belongs to the winged helix/Forkhead (FOX) protein family.⁷⁵ This transcription factor is capable of competing for common binding sites with other members of the same protein family, particularly FOXO1 (see: REGULATION OF FOXO1 ON PDX1). During mouse embryonic development, occupation of *pdx1* enhancer sites by Foxa2 increases together with gestational age.⁷⁶ The Forkhead box structure, a conserved 110 aminoacid DNA binding domain in the Forkhead box family,⁷⁵ is similar to that of H1 histone,⁷⁷ and it has been shown that Foxa proteins are capable of disassembling compact chromatin structures *in vivo*, by binding to the nucleosomes,⁷⁸ and *in vitro* by a mechanism independent from the usual SWI/SNF complex mechanism.^{77,79,80} These are the proposed mechanisms by which Forkhead A factors facilitate binding and stability of other transcription factors to DNA.

Homozygous knockouts for *Foxa2* do not survive further than the E10-11 embryonic stage where liver and pancreas differentiate, suggesting that Foxa2 is a key protein in hepatic and pancreatic morphogenesis regulation.⁸¹

Mice with β -cell-specific mutation for *foxa2* die before postnatal days P9-P12, showing hypoglycemia and hyperinsulinism. Although their islets secrete insulin, they do it mainly in response to aminoacids rather to high glucose.⁸² This phenotype is similar to PHHI, a disease where insulin secretion is abnormally high, causing hypoglycemia.⁸³ Mutations in the SCHAD gene (also known as *Had-hsc*) have been associated with hyperinsulinemic hypoglycemia. Surprisingly, this gene is also regulated by Foxa2.⁸²

Foxa2, through its effects on different genes, participates in insulin synthesis and secretion. This transcription factor regulates genes that play important roles in glucose-induced insulin production and β -cell metabolism, like *GK*,⁸⁴ *Glut2*,⁸⁴ *pdx1*,⁸² *HNF4 α* ,⁸⁴ *HNF1 α* ,⁸⁴ *MafA*⁵³ and *pyruvate carboxylase*.⁸⁵ Foxa2 is also a transactivator of *Sur1* and *Kir6.2*, the two subunits forming the ATP-sensitive potassium channel.^{82, 84} Furthermore, there is evidence for a role of Foxa2 in regulating genes that participate on the vesicle docking and insulin secretion processes.⁸⁶

MafA

MafA belongs to the Maf family, a subset of transcription factors that have a basic leucine zipper (bZip). Members of this family contain a highly conserved DNA binding domain called EHR (extended homology region), which recognizes sequences termed MAREs (Maf recognition elements), and form homodimers through their leucine zipper domains to perform their transcription activities.

Knockout mice for *MafA* have a normal development; however, they show diabetes mellitus between 8 and 12 weeks of age. These mice have a defect in glucose-stimulated insulin secretion, showing reduced insulin and GLUT2 gene expression. Additionally, their islet architecture appears affected, having glucagon immunopositive cells at the center of the islet and not at the outside edges as seen in normal rodent islets.⁸⁷

MafA is a key transcription factor in the direct transactivation of insulin,⁸⁸ and an important regulator of genes participating in insulin secretion, proinsulin processing, and GLP-1 signaling.^{10, 87} These genes include *PC1/3*, potassium channel subunits *Kir6.2* and *SUR1*, GLP-1 receptor, *GLUT2*,⁸⁹ *GK* and *Pyruvate carboxylase*.¹⁰ It has been suggested that MafA recruits histone modifying enzymes, as this transcription factor increases acetylation levels of H3 histone in the insulin gene promoter.⁶⁰ There is also evidence of MafA binding to PDX1 and NeuroD1, acting in synergy with them to transactivate the murine insulin gene.⁸⁹

MafA is only expressed in the β -cell nucleus,^{10, 87} and its expression depends on glucose levels. At low glucose concentrations, MafA protein is barely detectable, while at high glucose its mRNA and expression increase significantly.⁴ The activity of this factor also depends on glucose concentration. Binding of MafA to the DNA has a bell shaped behavior, increasing progressively in a range of 2.2 to 15

mM of glucose, and lowering an 30 mM.¹⁰ This suggests that hyperglycemia reduces MafA transactivation of its target genes.

MafA is regulated both at the transcriptional and post-translational levels. Transcription factors PDX1, Nkx2.2 and Foxa2 regulate *MafA* expression in the islet, transactivating its promoter in the region 3.⁵³ Conversely, MafA is constitutively phosphorylated in serine and treonine residues from its amino terminal region. This phosphorylation is mediated by a non-identified kinase and subsequently by GSK3, being a prerequisite for MafA degradation in the proteasome at low glucose concentrations.⁹⁰ Recent studies have found that MafA can be regulated by sumoylation, which reduces its transcriptional activity on the insulin promoter.⁹¹

Palmitate inhibits glucose-stimulated mRNA increase of this transcription factor, indicating that MafA might have a role in the lipotoxicity mechanism whereby fatty acids inhibit insulin expression.⁴

NeuroD1

NeuroD1 (NeuroD/BETA2) is a neural differentiation transcription factor, which is also an activator of insulin transcription in the pancreas.⁹² NeuroD1 is predominantly found in adult β -cells, while few expression of this factor in adult α - or δ -cells has been found.⁹³

NeuroD1 is required for pancreatic development and glucose homeostasis maintenance. Deletion of this gene in mice stops β -cell population expansion and pancreatic islet development during the embryonic stage, causing severe diabetes (hyperglycemia, ketonuria, and insulin resistance) and postnatal death.⁹³ Mutations in the human *NeuroD1* gene have been associated to susceptibility to the development of type 1 diabetes, and they cause MODY6 (reviewed in.)⁹² It is an important activator of insulin gene transcription in pancreas, by dimerizing with E47 and binding to the E box of the insulin gene promoter.⁹² This mechanism is also responsible for its effects as a transactivator of the *SUR1*⁹⁴ and *GK*⁹⁵ genes. Similarly to other transcription factors, NeuroD1 binds to the coactivator p300 in the β -cell, regulating the insulin gene expression.⁹⁶ It has been proposed that this interaction plays an important role in the binding of NeuroD1 to the E box, both during embryonic development and the adult stage.⁹⁷

Post-transcriptional regulation of NeuroD1 and E47 occurs by ERK2 phosphorylation, which facilitates their binding to the DNA and formation of he-

terodimers, thus allowing them to activate the insulin gene in response to glucose.⁷⁰ It has been proposed that this ERK1/2 pathway plays an important role in NeuroD1 nuclear translocation as well⁹⁸. Whether this phosphorylation in serine 274⁹⁸ or glycosylation of the same residue⁹⁹ is the mechanism regulating nuclear translocation still remains unknown.

HNF1 α and HNF4 α

In the pancreas, HNF1 α regulates HNF4 α ¹⁰⁰ and vice versa,¹⁰¹ forming a positive feedback regulation loop.^{100, 101} It has been proposed that these two transcription factors act together to regulate the transcription of some of their target genes.¹⁰¹ Both factors are responsible for monogenic diabetes forms, HNF1 α for MODY3¹⁰³ and HNF4 α for MODY1.¹⁰²

HNF1 α is known to regulate insulin gene transcription,¹⁰³ as well as *L-PK*¹⁰⁴ and *glut2*.¹⁰⁵ Deletion of this transcription factor in mice generates a diabetic phenotype caused by defects on the β -cell glucose metabolism, as well as other hepatic and renal alterations.¹⁰⁶⁻¹⁰⁸

There is evidence showing that the transactivating activity of HNF1 α occurs at the epigenetic level, since it is capable of recruiting the p300 coactivator to the *glut2* promoter.¹⁰⁵ It also participates in hyperacetylation of histones H3 and H4 in the *glut2* and *L-PK* promoters in the pancreas, but not in the liver. This confers HNF1 α an important role in the regulation of β -cell specific genes involved in glucose metabolism.¹⁰⁴

HNF4 α is a transcription factor from the nuclear receptor superfamily.¹⁰⁹ It binds to its recognition site as a dimer and acts as transactivator of several genes like *L-PK*^{110, 111} *AldoB*¹¹¹ *glut2*,¹¹² *Kir6.2*,¹¹² *PPAR α* ,¹¹² mitochondrial genes like *UCP2*,¹¹¹ and the insulin gene itself,^{111, 113} the latter by acting directly and indirectly through HNF1 α .¹¹³

Studies in double-hybrid yeast systems have revealed that HNF4 α interacts with cofactor CBP, activating HNF4 α mediated transcription,¹¹⁴ while in the HepG2 cell line other coactivators of HNF4 α have been identified, such as GRIP1, SRC-1 and p300. These last two coactivators synergize with each other to increase the transactivating activity of HNF4 α on HNF1 α .¹¹⁵

The importance of HNF4 α during pancreatic development is evident in the null *HNF4 α* mutants, which have a lethal phenotype and present deficient

visceral endoderm development, in addition to impeding normal gastrulation.¹¹⁶ In the adult stage, HNF4 α is necessary for a correct glucose-induced insulin secretion, probably at the ATP-sensitive K⁺ channel level,¹¹⁰ or by maintaining an energetic equilibrium at the mitochondrial level.¹¹¹

OTHER TRANSCRIPTION FACTORS OF THE B-CELL

There are other transcription factors such as Pax4, Pax6, Nkx2.2, and Nkx6.1, which are needed for islet cell development and differentiation, as well as for glucagon and insulin expression in adult α and β -cells correspondingly.

Pax4

Pax4 is expressed in β and δ cells, being an essential regulator in β -cell differentiation.¹¹⁷ Mutations in *Pax4* have been associated with type 2 diabetes (reviewed in)¹¹⁸ and, intriguingly, four of the transcription factors causing MODYs (HNF4 α , Pdx-1, HNF1 α and NeuroD1) interact with this gene activating its expression, while it is repressed by itself.¹¹⁹ Pax4 has also a role as a *glucagon* gene repressor in the β -cell during early development.¹²⁰ Yet, the only suggested function for this factor during the adult stage is on β -cell mass regulation, by inducing the c-myc/Id2 proliferation pathway and facilitating β -cell survival by an increase in the expression of the antiapoptotic gene *Bcl-xL*.¹²¹

Pax6

The transcription factor Pax6 is expressed in all cell types of the pancreatic islet, and it has been mainly described as a gene required for α -cell differentiation.¹²² Studies in patients with heterozygous mutations in this gene have established its function as an important transactivator of *PC1/3* in the β -cell, a key enzyme for proinsulin processing, whose dysfunction causes glucose intolerance in these patients.¹²³ Its transactivating function has been also seen on *glut2*,¹²⁴ *pdx1*,¹²⁵ *insulin*,¹²⁶ *glucagon*¹²⁶ and *somatostatin*.¹²⁶ Although the mechanism of action and regulation for this gene in the pancreas has not been completely elucidated, studies in cell lines suggest that Pax6 is susceptible to phosphorylation by the kinases ERK, p38¹²⁷ and HIPK2.¹²⁸ The latter increases PAX6 binding to the coactivator p300, therefore increasing its activity.¹²⁸

Nkx2.2

The transcription factor Nkx2.2 acts as a repressor during embryonic development. However, in the adult islet its main function is activation of transcription,¹²⁹ principally of the insulin gene¹³⁰ and MafA.⁵³ This bifunctionality may be given by alternative splicing of the first exon, in which the promoter regions are differentially activated depending on transcription factors within the cellular environment¹³¹ and the interaction of Nkx2.2 with diverse cofactors.¹²⁹

Nkx2.2 has a crucial role in the regulation of adult β -cell functions, since suppression of its expression in mice by a transgene causes glucose intolerance, decrease in insulin synthesis and secretion, low *glut2* expression, and alterations in islet architecture, being the α -cells located at the center of the islet.¹²⁹

Nkx6.1

Nkx6.1 is expressed exclusively in the β -cell.¹³² This transcription factor determines and maintains the adult β -cell phenotype partly by suppressing glucagon gene expression.¹³³ Concomitantly, it has transactivating activity on its own promoter, thus maintaining a constant expression level.¹³⁴

Nkx6.1 contains an activating domain in its carboxyl end region, and a repressing domain in its amino end. Both recognize different sequences depending on the promoter, and it has been suggested that the repressor domain can be regulated by a DNA-binding interference domain (BID), lowering repression on its target genes.¹³⁴⁻¹³⁶

Overexpression of Nkx6.1 in isolated islets favors β -cell proliferation in rats as well as in humans through the increase of cyclins and kinases involved in the cell cycle, in addition to modulating glucose-induced insulin secretion.¹³⁷ It is also known that its transcriptional regulation is mediated through other transcription factors such as PDX-1, Nkx2.2¹³² and PPAR γ .¹³⁸

CONCLUSIONS

Studies in search for candidate genes involved the etiology of diabetes, using the monogenic diabetes forms as tools, were determinant for establishing the importance of transcription factors in the origin of the disease. This knowledge developed a new concept about the mechanisms causing inadequate β -cell function, present in different forms of diabetes. The

information obtained from subsequent studies indicates that transcription factors act in a cooperative manner to induce not only insulin expression, but also the expression of other genes involved in insulin regulation and secretion (Figure 2), thus establishing and maintaining β -cell's phenotype and function.^{10,95}

Research in this field has also revealed that transcription factors are regulated through many signaling pathways, and respond to diverse stimuli such as glucose, oxidative stress, and probably to other nutrients, such as fatty acids or vitamins. However, many questions are still unsolved, among them, the detailed mechanisms by which these transcription factors act on their target genes, and the existing interrelation within the regulation of a single gene by several transcription factors.

The study of β -cell-specific transcription factors expression and regulation have aided to understand insulin synthesis and secretion, cellular proliferation, and the preservation of the adult β -cell phenotype. This knowledge is essential to develop new therapeutics to prevent and correct the β -cell failure found in diabetes.

ACKNOWLEDGEMENTS

María Luisa Lazo de la Vega-Monroy has a scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CVU/scholar no.: 217876/207055).

This work was supported by funds from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (44266M), Dirección General de Asuntos del Personal Académico (IN220908) and UC MEXUS (CNO7-87).

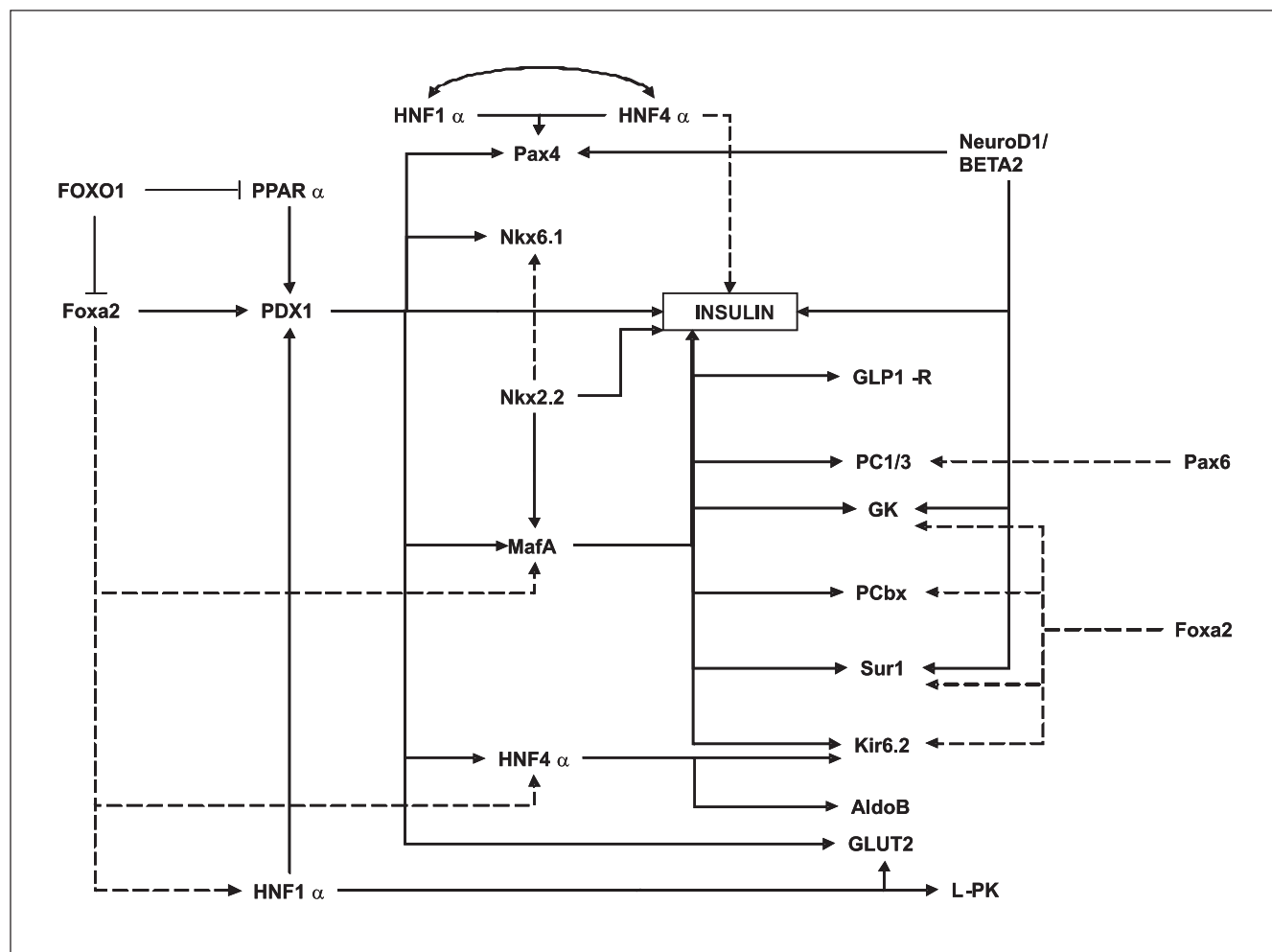


Figure 2. Transcriptional networks in the adult β -cell and its target genes. Transcription factors of the β -cell regulate each other, and cooperatively activate (\rightarrow) or repress ($-$) the expression of genes participating in the glucose-induced insulin secretion process.

We thank Dr. Cristina Revilla Monsalve and Dr. Marcia Hiriart Urdanivia for their valuable suggestions regarding this review.

ABBREVIATIONS

AC: Adenylate Cyclase, AldoB: Aldolase B, AMPc: Cyclic Adenosine Monophosphate, BID: DNA binding interference domain, bHLH: basic Helix-Loop-Helix domain, CBP: CREB binding protein, CREB: cAMP response element binding protein, DM: Diabetes Mellitus, ERK: Extracellular signal-regulated kinase, Foxa2: Forkhead box A protein 2, FOXO1: Forkhead box 'Other' protein 1, FRE: FoxO Response Element, GK: Glucokinase, GLP-1: Glucagon-Like Peptide 1, GLP-1R: Glucagon-Like Peptide 1 Receptor, GLUT1/2: Glucose transporter 1/2; GRB2: Growth factor receptor-bound protein 2, GRIP 1: glutamate receptor interacting protein 1, GSK3: Glycogen Synthase Kinase 3, HDAC: Histone Deacetylase, HIPK2: Homeodomain-interacting protein kinase 2, HNF: Hepatic Nuclear Factor, IGF-1: Insulin Growth Factor-1, IR: Insulin Receptor, IRS: Insulin Receptor substrate, JNK: c-Jun N-terminal kinase, L-PK: Pyruvate kinase, MafA: v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein A, MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase, MODY: Maturity Onset Diabetes of the Young, PC1/3: prohormone convertase, PCbx: Pyruvate Carboxylase, PDX1: Pancreatic Duodenum Homeobox 1, PGC-1 α : peroxisome proliferator-activated receptor- α co-activator 1 α , PHHI: Persistent Hypoglycemic Hyperinsulinemia of Infancy, PI3K: Phosphatidylinositol 3 kinase, PKB/Akt: Protein kinase B, PPAR: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor, SCHAD: short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, Shc: Src homology and collagen homology adapter protein, SRC-1: Steroid Receptor Coactivator 1, TRP: Transient Receptor Potential, UCP2: Uncoupling protein 2.

REFERENCES

1. Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 2001; 414(6865): 782-7.
2. ADA. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care* 2009; 32(Suppl. 1): S62-S67.
3. Jarret JR. The epidemiology of diabetes mellitus. Insulin-dependent diabetes mellitus. Oxford: Blackwell Science; 1991.
4. Kawamori D, Kaneto H, Nakatani Y, et al. The forkhead transcription factor Foxo1 bridges the JNK pathway and the transcription factor PDX-1 through its intracellular translocation. *J Biol Chem* 2006; 281(2): 1091-8.
5. Hagman DK, Hays LB, Parazzoli SD, Poitout V. Palmitate inhibits insulin gene expression by altering PDX-1 nuclear localiza-

- tion and reducing MafA expression in isolated rat islets of Langerhans. *J Biol Chem* 2005; 280(37): 32413-8.
6. Martinez SC, Cras-Meneur C, Bernal-Mizrachi E, Permutt MA. Glucose regulates Foxo1 through insulin receptor signaling in the pancreatic islet beta-cell. *Diabetes*. 2006; 55(6): 1581-91.
7. Elrick LJ, Docherty K. Phosphorylation-dependent nucleocytoplasmic shuttling of pancreatic duodenal homeobox-1. *Diabetes* 2001; 50(10): 2244-52.
8. Johnson JD, Bernal-Mizrachi E, Alejandro EU, et al. Insulin protects islets from apoptosis via Pdx1 and specific changes in the human islet proteome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(51): 19575-80.
9. Gao Y, Miyazaki J, Hart GW. The transcription factor PDX-1 is post-translationally modified by O-linked N-acetylglucosamine and this modification is correlated with its DNA binding activity and insulin secretion in min6 beta-cells. *Arch Biochem Biophys*. 2003; 415(2): 155-63.
10. Wang H, Brun T, Kataoka K, Sharma AJ, Wollheim CB. MAFA controls genes implicated in insulin biosynthesis and secretion. *Diabetologia* 2007; 50(2): 348-58.
11. Ye DZ, Tai MH, Linning KD, Szabo C, Olson LK. MafA expression and insulin promoter activity are induced by nicotinamide and related compounds in INS-1 pancreatic beta-cells. *Diabetes* 2006; 55(3): 742-50.
12. Kim SK, Hebrok M. Intercellular signals regulating pancreas development and function. *Genes Dev* 2001; 15(2): 111-27.
13. Hellerstrom C. The life story of the pancreatic B cell. *Diabetologia* 1984; 26(6): 393-400.
14. Weir GC, Sharma A, Zangen DH, Bonner-Weir S. Transcription factor abnormalities as a cause of beta cell dysfunction in diabetes: a hypothesis. *Acta Diabetol* 1997; 34(3): 177-84.
15. Rhodes CJ. Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? *Science* 2005; 307(5708): 380-4.
16. De Vos A, Heimberg H, Quartier E, et al. Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase gene expression. *J Clin Invest* 1995; 96(5): 2489-95.
17. Fernandez Mejia C. Molecular basis of type-2 diabetes. In: Joseph-Bravo P (ed.). *Molecular Endocrinology*. Kerala, India: Signpost; 2006, p. 87-108.
18. Hiriart M, Matteson DR. Na channels and two types of Ca channels in rat pancreatic B cells identified with the reverse hemolytic plaque assay. *J Gen Physiol*. 1988; 91(5): 617-39.
19. Jacobson DA, Philipson LH. TRP channels of the pancreatic beta cell. *Handb Exp Pharmacol* 2007; 179: 409-24.
20. Flat PR. The hormonal and neural control of endocrine pancreatic function. Oxford: Blackwell Science; 1996.
21. Sharp GW. The adenylate cyclase-cyclic AMP system in islets of Langerhans and its role in the control of insulin release. *Diabetologia* 1979; 16(5): 287-96.
22. Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 2007; 132(6): 2131-57.
23. Kaneto H, Nakatani Y, Kawamori D, et al. Role of oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and c-Jun N-terminal kinase in pancreatic beta-cell dysfunction and insulin resistance. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38(5-6): 782-93.
24. Aikin R, Hanley S, Maysinger D, et al. Autocrine insulin action activates Akt and increases survival of isolated human islets. *Diabetologia* 2006; 49(12): 2900-9.
25. Xu GG, Rothenberg PL. Insulin receptor signaling in the beta-cell influences insulin gene expression and insulin content: evidence for autocrine beta-cell regulation. *Diabetes* 1998; 47(8): 1243-52.
26. Navarro-Tableros V, Sanchez-Soto MC, Garcia S, Hiriart M. Autocrine regulation of single pancreatic beta-cell survival. *Diabetes* 2004; 53(8): 2018-23.
27. Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signa-

- ling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* 2005; 9(1): 59-71.
28. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 2006; 444(7121): 840-6.
 29. Sperling S. Transcriptional regulation at a glance. *BMC Bioinformatics* 2007; 8(Suppl. 6): S2.
 30. Habener JF, Kemp DM, Thomas MK. Minireview: transcriptional regulation in pancreatic development. *Endocrinology* 2005; 146(3): 1025-34.
 31. Huang H, Tindall DJ. Dynamic FoxO transcription factors. *J Cell Sci* 2007; 120(Pt 15): 2479-87.
 32. Kitamura T, Nakae J, Kitamura Y, et al. The forkhead transcription factor Foxo1 links insulin signaling to Pdx1 regulation of pancreatic beta cell growth. *J Clin Invest* 2002; 110(12): 1839-47.
 33. Kitamura T, Ido Kitamura Y. Role of FoxO Proteins in Pancreatic beta Cells. *Endocr J* 2007; 54(4): 507-15.
 34. Del Guerra S, Lupi R, Marselli L, et al. Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes. *Diabetes* 2005; 54(3): 727-35.
 35. Nakae J, Kitamura T, Kitamura Y, Biggs WH, 3rd, Arden KC, Accili D. The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. *Dev Cell* 2003; 4(1): 119-29.
 36. Okamoto H, Hribal ML, Lin HV, Bennett WR, Ward A, Accili D. Role of the forkhead protein FoxO1 in beta cell compensation to insulin resistance. *J Clin Invest* 2006; 116(3): 775-82.
 37. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 1999; 96(6): 857-68.
 38. Rena G, Woods YL, Prescott AR, et al. Two novel phosphorylation sites on FKHR that are critical for its nuclear exclusion. *Embo J* 2002; 21(9): 2263-71.
 39. Matsuzaki H, Daitoku H, Hatta M, Tanaka K, Fukamizu A. Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(20): 11285-90.
 40. Motta MC, Divecha N, Lemieux M, et al. Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. *Cell* 2004; 116(4): 551-63.
 41. Hatta M, Liu F, Cirillo LA. Acetylation curtails nucleosome binding, not stable nucleosome remodeling, by FoxO1. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 379(4): 1005-8.
 42. Buteau J, Spatz ML, Accili D. Transcription factor FoxO1 mediates glucagon-like peptide-1 effects on pancreatic beta-cell mass. *Diabetes* 2006; 55(5): 1190-6.
 43. Guz Y, Montminy MR, Stein R, et al. Expression of murine STF-1, a putative insulin gene transcription factor, in beta cells of pancreas, duodenal epithelium and pancreatic exocrine and endocrine progenitors during ontogeny. *Development* 1995; 121(1): 11-8.
 44. Ahlgren U, Jonsson J, Jonsson L, Simu K, Edlund H. beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ipf1/Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes Dev* 1998; 12(12): 1763-8.
 45. Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 1994; 371(6498): 606-9.
 46. Brissova M, Shiota M, Nicholson WE, et al. Reduction in pancreatic transcription factor PDX-1 impairs glucose-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem* 2002; 277(13): 11225-32.
 47. Stoffers DA, Ferrer J, Clarke WL, Habener JF. Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. *Nat Genet* 1997; 17(2): 138-9.
 48. Holland AM, Gonez LJ, Naselli G, Macdonald RJ, Harrison LC. Conditional expression demonstrates the role of the homeodomain transcription factor Pdx1 in maintenance and regeneration of beta-cells in the adult pancreas. *Diabetes* 2005; 54(9): 2586-95.
 49. Jetton TL, Lausier J, LaRock K, et al. Mechanisms of compensatory beta-cell growth in insulin-resistant rats: roles of Akt kinase. *Diabetes* 2005; 54(8): 2294-304.
 50. Kushner JA, Ye J, Schubert M, et al. Pdx1 restores beta cell function in *Irs2* knockout mice. *J Clin Invest* 2002; 109(9): 1193-201.
 51. Kulkarni RN, Jhala US, Winnay JN, Krajewski S, Montminy M, Kahn CR. PDX-1 haploinsufficiency limits the compensatory islet hyperplasia that occurs in response to insulin resistance. *J Clin Invest* 2004; 114(6): 828-36.
 52. Chakrabarti SK, James JC, Mirmira RG. Quantitative assessment of gene targeting in vitro and in vivo by the pancreatic transcription factor, Pdx1. Importance of chromatin structure in directing promoter binding. *J Biol Chem* 2002; 277(15): 13286-93.
 53. Raum JC, Gerrish K, Artner I, et al. FoxA2, Nkx2.2, and PDX-1 regulate islet beta-cell-specific *mafa* expression through conserved sequences located between base pairs -8118 and -7750 upstream from the transcription start site. *Mol Cell Biol* 2006; 26(15): 5735-43.
 54. Thomas H, Jaschowitz K, Bulman M, et al. A distant upstream promoter of the HNF-4alpha gene connects the transcription factors involved in maturity-onset diabetes of the young. *Hum Mol Genet*. 2001; 10(19): 2089-97.
 55. Gauthier BR, Brun T, Sarret EJ, et al. Oligonucleotide microarray analysis reveals PDX1 as an essential regulator of mitochondrial metabolism in rat islets. *J Biol Chem* 2004; 279(30): 13121-30.
 56. Wang H, Iezzi M, Theander S, et al. Suppression of Pdx-1 perturbs proinsulin processing, insulin secretion and GLP-1 signalling in INS-1 cells. *Diabetologia* 2005; 48(4): 720-31.
 57. Olson LK, Redmon JB, Towle HC, Robertson RP. Chronic exposure of HIT cells to high glucose concentrations paradoxically decreases insulin gene transcription and alters binding of insulin gene regulatory protein. *J Clin Invest* 1993; 92(1): 514-9.
 58. Gremlich S, Bonny C, Waeber G, Thorens B. Fatty acids decrease IDX-1 expression in rat pancreatic islets and reduce GLUT2, glucokinase, insulin, and somatostatin levels. *J Biol Chem* 1997; 272(48): 30261-9.
 59. Peshavaria M, Henderson E, Sharma A, Wright CV, Stein R. Functional characterization of the transactivation properties of the PDX-1 homeodomain protein. *Mol Cell Biol* 1997; 17(7): 3987-96.
 60. Docherty HM, Hay CW, Ferguson LA, Barrow J, Durward E, Docherty K. Relative contribution of PDX-1, MafA and E47/beta2 to the regulation of the human insulin promoter. *Biochem J* 2005; 389(Pt 3): 813-20.
 61. Mosley AL, Corbett JA, Ozcan S. Glucose regulation of insulin gene expression requires the recruitment of p300 by the beta-cell-specific transcription factor Pdx-1. *Mol Endocrinol* 2004; 18(9): 2279-90.
 62. Iype T, Francis J, Garmey JC, et al. Mechanism of insulin gene regulation by the pancreatic transcription factor Pdx-1: application of pre-mRNA analysis and chromatin immunoprecipitation to assess formation of functional transcriptional complexes. *J Biol Chem* 2005; 280(17): 16798-807.
 63. Ben-Shushan E, Marshak S, Shoshkes M, Cerasi E, Melloul D. A pancreatic beta -cell-specific enhancer in the human PDX-1 gene is regulated by hepatocyte nuclear factor 3beta (HNF-3beta), HNF-1alpha, and SPs transcription factors. *J Biol Chem* 2001; 276(20): 17533-40.
 64. Gupta D, Jetton TL, Mortensen RM, Zhong Duan S, Peshavaria M, Leahy JL. In vivo and in vitro studies of a function-

- nal peroxisome proliferator-activated receptor gamma response element in the mouse PDX-1 promoter. *J Biol Chem* 2008.
65. Marshak S, Benshushan E, Shoshkes M, Havin L, Cerasi E, Melloul D. Functional conservation of regulatory elements in the pdx-1 gene: PDX-1 and hepatocyte nuclear factor 3beta transcription factors mediate beta-cell-specific expression. *Mol Cell Biol* 2000; 20(20): 7583-90.
 66. Van Velkinburgh JC, Samarasekera SE, Gerrish K, Artner I, Stein R. Interactions between areas I and II direct pdx-1 expression specifically to islet cell types of the mature and developing pancreas. *J Biol Chem* 2005; 280(46): 38438-44.
 67. Moede T, Leibiger B, Pour HG, Berggren P, Leibiger IB. Identification of a nuclear localization signal, RRMKWKK, in the homeodomain transcription factor PDX-1. *FEBS Lett* 1999; 461(3): 229-34.
 68. Petersen HV, Peshavaria M, Pedersen AA, et al. Glucose stimulates the activation domain potential of the PDX-1 homeodomain transcription factor. *FEBS Lett* 1998; 431(3): 362-6.
 69. Kishi A, Nakamura T, Nishio Y, Maegawa H, Kashiwagi A. Sumoylation of Pdx1 is associated with its nuclear localization and insulin gene activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 284(4): E830-40.
 70. Khoo S, Griffen SC, Xia Y, Baer RJ, German MS, Cobb MH. Regulation of insulin gene transcription by ERK1 and ERK2 in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 2003; 278(35): 32969-77.
 71. Boucher MJ, Selander L, Carlsson L, Edlund H. Phosphorylation marks IPF1/PDX1 protein for degradation by glycogen synthase kinase 3-dependent mechanisms. *J Biol Chem* 2006; 281(10): 6395-403.
 72. Ferber S, Halkin A, Cohen H, et al. Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia. *Nat Med* 2000; 6(5): 568-72.
 73. Glauser DA, Schlegel W. The emerging role of FOXO transcription factors in pancreatic beta cells. *J Endocrinol* 2007; 193(2): 195-207.
 74. Gupta D, Leahy AA, Peshavaria M, Leahy JL. Novel Mechanism for Foxo1-Induced Regulation of Pdx-1 mRNA Expression in Mature Beta-Cells: Foxo1 Inhibition of PPAR-Gamma Transcription. *68th ADA Annual Scientific Sessions*. San Francisco, California: American Diabetes Association; 2008.
 75. Carlsson P, Mahlapuu M. Forkhead transcription factors: key players in development and metabolism. *Dev Biol* 2002; 250(1): 1-23.
 76. Gao N, LeLay J, Vatamaniuk MZ, Rieck S, Friedman JR, Kaestner KH. Dynamic regulation of Pdx1 enhancers by Foxa1 and Foxa2 is essential for pancreas development. *Genes Dev* 2008; 22(24): 3435-48.
 77. Clark KL, Halay ED, Lai E, Burley SK. Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature* 1993; 364(6436): 412-20.
 78. Chaya D, Hayamizu T, Bustin M, Zaret KS. Transcription factor FoxA (HNF3) on a nucleosome at an enhancer complex in liver chromatin. *J Biol Chem* 2001; 276(48): 44385-9.
 79. Cirillo LA, Lin FR, Cuesta I, Friedman D, Jarnik M, Zaret KS. Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4. *Mol Cell Biol* 2002; 22(2): 279-89.
 80. Holmqvist PH, Belikov S, Zaret KS, Wrangé O. FoxA1 binding to the MMTV LTR modulates chromatin structure and transcription. *Exp Cell Res* 2005; 304(2): 593-603.
 81. Weinstein DC, Ruiz i Altaba A, Chen WS, et al. The winged-helix transcription factor HNF-3 beta is required for notochord development in the mouse embryo. *Cell* 1994; 78(4): 575-88.
 82. Lantz KA, Vatamaniuk MZ, Brestelli JE, Friedman JR, Matschinsky FM, Kaestner KH. Foxa2 regulates multiple pathways of insulin secretion. *J Clin Invest* 2004; 114(4): 512-20.
 83. Palladino AA, Bennett MJ, Stanley CA. Hyperinsulinism in infancy and childhood: when an insulin level is not always enough. *Clin Chem* 2008; 54(2): 256-63.
 84. Wang H, Gauthier BR, Hagenfeldt-Johansson KA, Iezzi M, Wollheim CB. Foxa2 (HNF3beta) controls multiple genes implicated in metabolism-secretion coupling of glucose-induced insulin release. *J Biol Chem* 2002; 277(20): 17564-70.
 85. Boonsaen T, Rojvirat P, Surinya KH, Wallace JC, Jitrapakdee S. Transcriptional regulation of the distal promoter of the rat pyruvate carboxylase gene by hepatocyte nuclear factor 3beta/Foxa2 and upstream stimulatory factors in insulinoma cells. *Biochem J* 2007; 405(2): 359-67.
 86. Gao N, White P, Doliba N, Golson ML, Matschinsky FM, Kaestner KH. Foxa2 controls vesicle docking and insulin secretion in mature Beta cells. *Cell Metab* 2007; 6(4): 267-79.
 87. Zhang C, Moriguchi T, Kajihara M, et al. MafA is a key regulator of glucose-stimulated insulin secretion. *Mol Cell Biol* 2005; 25(12): 4969-76.
 88. Matsuoka TA, Kaneto H, Stein R, et al. MafA regulates expression of genes important to islet beta-cell function. *Mol Endocrinol* 2007; 21(11): 2764-74.
 89. Zhao L, Guo M, Matsuoka TA, et al. The islet beta cell-enriched MafA activator is a key regulator of insulin gene transcription. *J Biol Chem* 2005; 280(12): 11887-94.
 90. Han SI, Aramata S, Yasuda K, Kataoka K. MafA stability in pancreatic beta cells is regulated by glucose and is dependent on its constitutive phosphorylation at multiple sites by glycogen synthase kinase 3. *Mol Cell Biol* 2007; 27(19): 6593-605.
 91. Shao C, Cobb MH. Sumoylation regulates the transcriptional activity of MafA in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 2009; 284(5): 3117-24.
 92. Chae JH, Stein GH, Lee JE. NeuroD: the predicted and the surprising. *Mol Cells* 2004; 18(3): 271-88.
 93. Naya FJ, Huang HP, Qiu Y, et al. Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes Dev* 1997; 11(18): 2323-34.
 94. Kim JW, Seghers V, Cho JH, et al. Transactivation of the mouse sulfonylurea receptor I gene by BETA2/NeuroD. *Mol Endocrinol* 2002; 16(5): 1097-107.
 95. Moates JM, Nanda S, Cissell MA, Tsai MJ, Stein R. BETA2 activates transcription from the upstream glucokinase gene promoter in islet beta-cells and gut endocrine cells. *Diabetes* 2003; 52(2): 403-8.
 96. Qiu Y, Sharma A, Stein R. p300 mediates transcriptional stimulation by the basic helix-loop-helix activators of the insulin gene. *Mol Cell Biol* 1998; 18(5): 2957-64.
 97. Sharma A, Moore M, Marcora E, et al. The NeuroD1/BETA2 sequences essential for insulin gene transcription colocalize with those necessary for neurogenesis and p300/CREB binding protein binding. *Mol Cell Biol* 1999; 19(1): 704-13.
 98. Petersen HV, Jensen JN, Stein R, Serup P. Glucose induced MAPK signalling influences NeuroD1-mediated activation and nuclear localization. *FEBS Lett* 2002; 528(1-3): 241-5.
 99. Andrali SS, Qian Q, Ozcan S. Glucose mediates the translocation of NeuroD1 by O-linked glycosylation. *J Biol Chem* 2007; 282(21): 15589-96.
 100. Odom DT, Zizlsperger N, Gordon DB, et al. Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science* 2004; 303(5662): 1378-81.
 101. Boj SF, Parrizas M, Maestro MA, Ferrer J. A transcription factor regulatory circuit in differentiated pancreatic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(25): 14481-6.

102. Fajans SS, Bell GI, Polonsky KS. Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *N Engl J Med* 2001; 345(13): 971-80.
103. Wang H, Maechler P, Hagenfeldt KA, Wollheim CB. Dominant-negative suppression of HNF-1alpha function results in defective insulin gene transcription and impaired metabolism-secretion coupling in a pancreatic beta-cell line. *Embo J* 1998; 17(22): 6701-13.
104. Parrizas M, Maestro MA, Boj SF, et al. Hepatic nuclear factor 1-alpha directs nucleosomal hyperacetylation to its tissue-specific transcriptional targets. *Mol Cell Biol* 2001; 21(9): 3234-43.
105. Ban N, Yamada Y, Someya Y, et al. Hepatocyte nuclear factor-1alpha recruits the transcriptional co-activator p300 on the GLUT2 gene promoter. *Diabetes* 2002; 51(5): 1409-18.
106. Lee YH, Sauer B, Gonzalez FJ. Laron dwarfism and non-insulin-dependent diabetes mellitus in the Hnf-1alpha knockout mouse. *Mol Cell Biol* 1998; 18(5): 3059-68.
107. Pontoglio M, Sreenan S, Roe M, et al. Defective insulin secretion in hepatocyte nuclear factor 1alpha-deficient mice. *J Clin Invest* 1998; 101(10): 2215-22.
108. Dukes ID, Sreenan S, Roe MW, et al. Defective pancreatic beta-cell glycolytic signaling in hepatocyte nuclear factor-1alpha-deficient mice. *J Biol Chem* 1998; 273(38): 24457-64.
109. Sladek FM, Zhong WM, Lai E, Darnell JE, Jr. Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. *Genes Dev* 1990; 4(12B): 2353-65.
110. Gupta RK, Vatamaniuk MZ, Lee CS, et al. The MODY1 gene HNF-4alpha regulates selected genes involved in insulin secretion. *J Clin Invest* 2005; 115(4): 1006-15.
111. Wang H, Maechler P, Antinuzzi PA, Hagenfeldt KA, Wollheim CB. Hepatocyte nuclear factor 4alpha regulates the expression of pancreatic beta-cell genes implicated in glucose metabolism and nutrient-induced insulin secretion. *J Biol Chem* 2000; 275(46): 35953-9.
112. Stoffel M, Duncan SA. The maturity-onset diabetes of the young (MODY1) transcription factor HNF4alpha regulates expression of genes required for glucose transport and metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94(24): 13209-14.
113. Bartoov-Shifman R, Hertz R, Wang H, Wollheim CB, Bartana J, Walker MD. Activation of the insulin gene promoter through a direct effect of hepatocyte nuclear factor 4 alpha. *J Biol Chem* 2002; 277(29): 25914-9.
114. Yoshida E, Aratani S, Itou H, et al. Functional association between CBP and HNF4 in trans-activation. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 241(3): 664-9.
115. Wang JC, Stafford JM, Granner DK. SRC-1 and GRIP1 coactivate transcription with hepatocyte nuclear factor 4. *J Biol Chem* 1998; 273(47): 30847-50.
116. Chen WS, Manova K, Weinstein DC, et al. Disruption of the HNF-4 gene, expressed in visceral endoderm, leads to cell death in embryonic ectoderm and impaired gastrulation of mouse embryos. *Genes Dev* 1994; 8(20): 2466-77.
117. Sosa-Pineda B. The gene Pax4 is an essential regulator of pancreatic beta-cell development. *Mol Cells* 2004; 18(3): 289-94.
118. Brun T, Gauthier BR. A focus on the role of Pax4 in mature pancreatic islet beta-cell expansion and survival in health and disease. *J Mol Endocrinol* 2008; 40(2): 37-45.
119. Smith SB, Watada H, Scheel DW, Mrejen C, German MS. Autoregulation and maturity onset diabetes of the young transcription factors control the human PAX4 promoter. *J Biol Chem* 2000; 275(47): 36910-9.
120. Smith SB, Ee HC, Connors JR, German MS. Paired-homeodomain transcription factor PAX4 acts as a transcriptional repressor in early pancreatic development. *Mol Cell Biol* 1999; 19(12): 8272-80.
121. Brun T, Franklin I, St-Onge L, et al. The diabetes-linked transcription factor PAX4 promotes beta-cell proliferation and survival in rat and human islets. *J Cell Biol* 2004; 167(6): 1123-35.
122. St-Onge L, Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Mansouri A, Gruss P. Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing alpha-cells in mouse pancreas. *Nature* 1997; 387(6631): 406-9.
123. Wen JH, Chen YY, Song SJ, et al. Paired box 6 (PAX6) regulates glucose metabolism via proinsulin processing mediated by prohormone convertase 1/3 (PC1/3). *Diabetologia* 2008.
124. Ashery-Padan R, Zhou X, Marquardt T, et al. Conditional inactivation of Pax6 in the pancreas causes early onset of diabetes. *Dev Biol* 2004; 269(2): 479-88.
125. Samaras SE, Cissell MA, Gerrish K, Wright CV, Gannon M, Stein R. Conserved sequences in a tissue-specific regulatory region of the pdx-1 gene mediate transcription in Pancreatic beta cells: role for hepatocyte nuclear factor 3 beta and Pax6. *Mol Cell Biol*. 2002; 22(13): 4702-13.
126. Sander M, Neubuser A, Kalamaras J, Ee HC, Martin GR, German MS. Genetic analysis reveals that PAX6 is required for normal transcription of pancreatic hormone genes and islet development. *Genes Dev* 1997; 11(13): 1662-73.
127. Mikkola I, Bruun JA, Bjorkoy G, Holm T, Johansen T. Phosphorylation of the transactivation domain of Pax6 by extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1999; 274(21): 15115-26.
128. Kim EA, Noh YT, Ryu MJ, et al. Phosphorylation and transactivation of Pax6 by homeodomain-interacting protein kinase 2. *J Biol Chem* 2006; 281(11): 7489-97.
129. Doyle MJ, Sussel L. Nkx2.2 regulates beta-cell function in the mature islet. *Diabetes* 2007; 56(8): 1999-2007.
130. Cissell MA, Zhao L, Sussel L, Henderson E, Stein R. Transcription factor occupancy of the insulin gene in vivo. Evidence for direct regulation by Nkx2.2. *J Biol Chem* 2003; 278(2): 751-6.
131. Watada H, Scheel DW, Leung J, German MS. Distinct gene expression programs function in progenitor and mature islet cells. *J Biol Chem* 2003; 278(19): 17130-40.
132. Watada H, Mirmira RG, Leung J, German MS. Transcriptional and translational regulation of beta-cell differentiation factor Nkx6.1. *J Biol Chem* 2000; 275(44): 34224-30.
133. Schisler JC, Jensen PB, Taylor DG, et al. The Nkx6.1 homeodomain transcription factor suppresses glucagon expression and regulates glucose-stimulated insulin secretion in islet beta cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(20): 7297-302.
134. Iype T, Taylor DG, Ziesmann SM, Garmey JC, Watada H, Mirmira RG. The transcriptional repressor Nkx6.1 also functions as a deoxyribonucleic acid context-dependent transcriptional activator during pancreatic beta-cell differentiation: evidence for feedback activation of the nkx6.1 gene by Nkx6.1. *Mol Endocrinol* 2004; 18(6): 1363-75.
135. Mirmira RG, Watada H, German MS. Beta-cell differentiation factor Nkx6.1 contains distinct DNA binding interference and transcriptional repression domains. *J Biol Chem*. 2000; 275(19): 14743-51.
136. Taylor DG, Babu D, Mirmira RG. The C-terminal domain of the beta cell homeodomain factor Nkx6.1 enhances sequence-selective DNA binding at the insulin promoter. *Biochemistry* 2005; 44(33): 11269-78.
137. Schisler JC, Fueger PT, Babu DA, et al. Stimulation of human and rat islet beta-cell proliferation with retention of function by the homeodomain transcription factor Nkx6.1. *Mol Cell Biol* 2008; 28(10): 3465-76.

138. Moibi JA, Gupta D, Jetton TL, Peshavaria M, Desai R, Leahy JL. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma regulates expression of PDX-1 and NKX6.1 in INS-1 cells. *Diabetes* 2007; 56(1): 88-95.
139. Furuyama T, Kitayama K, Shimoda Y, et al. Abnormal angiogenesis in Foxo1 (Fkhr)-deficient mice. *J Biol Chem* 2004; 279(33): 34741-9.
140. Biggs WH, 3rd, Meisenhelder J, Hunter T, Cavenee WK, Arden KC. Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(13): 7421-6.
141. Tang ED, Nunez G, Barr FG, Guan KL. Negative regulation of the forkhead transcription factor FKHR by Akt. *J Biol Chem* 1999; 274(24): 16741-6.
142. Daitoku H, Hatta M, Matsuzaki H, et al. Silent information regulator 2 potentiates Foxo1-mediated transcription through its deacetylase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(27): 10042-7.
143. Wang H, Maechler P, Ritz-Laser B, et al. Pdx1 level defines pancreatic gene expression pattern and cell lineage differentiation. *J Biol Chem* 2001; 276(27): 25279-86.
144. Ohneda K, Mirmira RG, Wang J, Johnson JD, German MS. The homeodomain of PDX-1 mediates multiple protein-protein interactions in the formation of a transcriptional activation complex on the insulin promoter. *Mol Cell Biol* 2000; 20(3): 900-11.
145. Mosley AL, Ozcan S. The pancreatic duodenal homeobox-1 protein (Pdx-1) interacts with histone deacetylases Hdac-1 and Hdac-2 on low levels of glucose. *J Biol Chem* 2004; 279(52): 54241-7.
146. Gerrish K, Gannon M, Shih D, et al. Pancreatic beta cell-specific transcription of the pdx-1 gene. The role of conserved upstream control regions and their hepatic nuclear factor 3beta sites. *J Biol Chem* 2000; 275(5): 3485-92.
147. Gerrish K, Cissell MA, Stein R. The role of hepatic nuclear factor 1 alpha and PDX-1 in transcriptional regulation of the pdx-1 gene. *J Biol Chem* 2001; 276(51): 47775-84.
148. Shih DQ, Heimesaat M, Kuwajima S, Stein R, Wright CV, Stoffel M. Profound defects in pancreatic beta-cell function in mice with combined heterozygous mutations in Pdx-1, Hnf-1alpha, and Hnf-3beta. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(6): 3818-23.
149. Pani L, Overdier DG, Porcella A, Qian X, Lai E, Costa RH. Hepatocyte nuclear factor 3 beta contains two transcriptional activation domains, one of which is novel and conserved with the Drosophila fork head protein. *Mol Cell Biol* 1992; 12(9): 3723-32.
150. Qian X, Costa RH. Analysis of hepatocyte nuclear factor-3 beta protein domains required for transcriptional activation and nuclear targeting. *Nucleic Acids Res* 1995; 23(7): 1184-91.
151. Baroukh N, Ravier MA, Loder MK, et al. MicroRNA-124a regulates Foxa2 expression and intracellular signaling in pancreatic beta-cell lines. *J Biol Chem* 2007; 282(27): 19575-88.
152. Kataoka K, Han SI, Shioda S, Hirai M, Nishizawa M, Handa H. MafA is a glucose-regulated and pancreatic beta-cell-specific transcriptional activator for the insulin gene. *J Biol Chem* 2002; 277(51): 49903-10.
153. Aramata S, Han SI, Kataoka K. Roles and regulation of transcription factor MafA in islet beta-cells. *Endocr J* 2007; 54(5): 659-66.
154. Kataoka K, Noda M, Nishizawa M. Maf nuclear oncoprotein recognizes sequences related to an AP-1 site and forms heterodimers with both Fos and Jun. *Mol Cell Biol* 1994; 14(1): 700-12.
155. Kerppola TK, Curran T. A conserved region adjacent to the basic domain is required for recognition of an extended DNA binding site by Maf/Nrl family proteins. *Oncogene* 1994; 9(11): 3149-58.
156. Naya FJ, Stellrecht CM, Tsai MJ. Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor. *Genes Dev* 1995; 9(8): 1009-19.
157. Wang H, Hagenfeldt-Johansson K, Otten LA, Gauthier BR, Herrera PL, Wollheim CB. Experimental models of transcription factor-associated maturity-onset diabetes of the young. *Diabetes* 2002; 51(Suppl. 3): S333-42.
158. Hansen SK, Parrizas M, Jensen ML, et al. Genetic evidence that HNF-1alpha-dependent transcriptional control of HNF-4alpha is essential for human pancreatic beta cell function. *J Clin Invest* 2002; 110(6): 827-33.
159. Azzout-Marniche D, Becard D, Guichard C, Foretz M, Ferre P, Foufelle F. Insulin effects on sterol regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) transcriptional activity in rat hepatocytes. *Biochem J* 2000; 350(2): 389-93.
160. Miura A, Yamagata K, Kakei M, et al. Hepatocyte nuclear factor-4alpha is essential for glucose-stimulated insulin secretion by pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 2006; 281(8): 5246-57.
161. Miquerol L, Lopez S, Cartier N, Tulliez M, Raymondjean M, Kahn A. Expression of the L-type pyruvate kinase gene and the hepatocyte nuclear factor 4 transcription factor in exocrine and endocrine pancreas. *J Biol Chem* 1994; 269(12): 8944-51.
162. Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Torres M, Oliver G, Gruss P. The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas. *Nature* 1997; 386(6623): 399-402.
163. Petersen HV, Jorgensen MC, Andersen FG, et al. Pax4 represses pancreatic glucagon gene expression. *Mol Cell Biol Res Commun* 2000; 3(4): 249-54.
164. Kalousova A, Benes V, Paces J, Paces V, Kozmik Z. DNA binding and transactivating properties of the paired and homeobox protein Pax4. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 259(3): 510-8.
165. Campbell SC, Cragg H, Elrick LJ, Macfarlane WM, Shennan KI, Docherty K. Inhibitory effect of pax4 on the human insulin and islet amyloid polypeptide (IAPP) promoters. *FEBS Lett* 1999; 463(1-2): 53-7.
166. Wang Q, Elghazi L, Martin S, et al. Ghrelin is a novel target of Pax4 in endocrine progenitors of the pancreas and duodenum. *Dev Dyn* 2008; 237(1): 51-61.
167. Smith SB, Gasa R, Watada H, Wang J, Griffen SC, German MS. Neurogenin3 and hepatic nuclear factor 1 cooperate in activating pancreatic expression of Pax4. *J Biol Chem* 2003; 278(40): 38254-9.
168. Ding J, Gao Y, Zhao J, et al. Pax6 haploinsufficiency causes abnormal metabolic homeostasis by down-regulating glucagon-like peptide 1 in mice. *Endocrinology* 2009; 150(5): 2136-44.
169. Ritz-Laser B, Estreicher A, Klages N, Saule S, Philippe J. Pax-6 and Cdx-2/3 interact to activate glucagon gene expression on the G1 control element. *J Biol Chem* 1999; 274(7): 4124-32.
170. Hussain MA, Habener JF. Glucagon gene transcription activation mediated by synergistic interactions of pax-6 and cdx-2 with the p300 co-activator. *J Biol Chem* 1999; 274(41): 28950-7.
171. Marsich E, Vetere A, Di Piazza M, Tell G, Paoletti S. The PAX6 gene is activated by the basic helix-loop-helix transcription factor NeuroD/BETA2. *Biochem J* 2003; 376(3): 707-15.
172. Zheng JB, Zhou YH, Maity T, Liao WS, Saunders GF. Activation of the human PAX6 gene through the exon 1 enhancer

- cer by transcription factors SEF and Sp1. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(19): 4070-8.
173. Sussel L, Kalamaras J, Hartigan-O'Connor DJ, et al. Mice lacking the homeodomain transcription factor Nkx2.2 have diabetes due to arrested differentiation of pancreatic beta cells. *Development*. 1998; 125(12): 2213-21.
174. Doyle MJ, Loomis ZL, Sussel L. Nkx2.2-repressor activity is sufficient to specify alpha-cells and a small number of beta-cells in the pancreatic islet. *Development* 2007; 134(3): 515-23.
175. Sander M, Sussel L, Connors J, et al. Homeobox gene Nkx6.1 lies downstream of Nkx2.2 in the major pathway of beta-cell formation in the pancreas. *Development* 2000; 127(24): 5533-40.

Corresponding and reprint requests:

Ma. Luisa Lazo-de-la-Vega-Monroy
Unidad de Genética de la Nutrición
Instituto de Investigaciones Biomédicas,
Universidad Nacional Autónoma de México
Av. del Imán No. 1 4o. piso
Col. Insurgentes Cuicuilco
04530, México, D.F.
Tel.: 5622-6420 y 5622-6421 Fax: 5606-3489
E-mail: marialuisaqfb@yahoo.com.mx

*Recibido el 14 de abril de 2009.
Aceptado el 19 de agosto de 2009.*



Biological Effects of Pharmacological Concentrations of Biotin

Cristina Fernandez-Mejia, PhD¹, and
Maria-Luisa Lazo-de-la-Vega-Monroy, PhD¹

Abstract

Understanding the molecular mechanisms of vitamins has opened new perspectives regarding the relationship between nutritional signals and biological functions, which, in turn, has led to the development of new therapeutic agents. Although little is known about water-soluble vitamins as genetic modulators, evidence about their effects on gene expression has grown. In the case of biotin, besides its role as a carboxylase prosthetic group, it also affects gene expression and has a wide repertoire of effects on biological functions. Only recently, the role of pharmacological concentrations of biotin on systemic functions has attracted attention, and it is now being reconsidered with the help of new technologies. This novel approach could lead to new perspectives in its use as a therapeutic agent. The present review is focused on the effects of pharmacological concentrations of biotin on several biological functions and on the biotin signaling pathways that participate in gene expression.

Keywords

Biotin, coenzyme A, acetyl-CoA, propionyl-CoA, guanylate cyclase, protein kinase G, asialoglycoprotein, carboxylase, vitamin B group, pharmacological concentrations of biotin

Received October 16, 2010. Accepted for publication October 16, 2010.

In the last few decades, an increasing number of vitamin-mediated effects on gene expression have been discovered¹⁻³ in addition to their well-known roles as substrates and cofactors.⁴ Examples are the lipophilic vitamins A and D, which serve as ligand precursors of the hormone nuclear receptors superfamily and thus affect systemic functions.^{1,2} Extensive research on these vitamins has revealed the broad spectrum of actions in which they participate and has led to the development of new therapeutic agents against numerous diseases.⁵⁻⁷ Although little is known about water-soluble vitamins as genetic modulators, there are many examples of their effects on gene expression.⁸⁻¹¹

Biotin is a water-soluble vitamin that acts as a prosthetic group of carboxylases. Unrelated to this classic role as a carboxylase prosthetic group, pharmacological concentrations of biotin affect gene expression at both the transcriptional and the translational levels^{9,10} and have a wide repertoire of effects on systemic processes such as development,¹² reproduction,¹³⁻¹⁵ and metabolism.^{16,17} This article will focus on the multiple actions of biotin at pharmacological concentrations.

Biotin Functions as a Carboxylase Prosthetic Group

Biotin is an essential nutrient, which plays a central role in intermediary metabolism, where it acts as a carboxyl

carrier in carboxylation reactions.¹⁸ Five biotin-dependent carboxylases have been recognized in mammals: acetyl-coenzyme A (CoA)-carboxylase-1 and -2, pyruvate carboxylase, propionyl-CoA carboxylase, and β -methylcrotonyl-CoA carboxylase. These enzymes act by transferring a carbonyl group from bicarbonate to metabolic intermediates. In carboxylases, biotin is attached to the ϵ -amino group of lysine by the action of holocarboxylase synthetase in a two-step adenosine triphosphate (ATP)-dependent reaction, generating biotinyl-5'-adenosine monophosphate as an intermediate. In the second step, the biotinyl group is transferred to carboxylase apoenzymes forming a semipeptidic bond with lysine, located within the sequence Ala-Met-Lys-Met, which is highly conserved in apocarboxylases.¹⁹

The biotin-dependent carboxylases participate in different metabolic pathways: acetyl-CoA carboxylase 1, the only mammalian carboxylase located in the cytoplasm, catalyzes the binding of bicarbonate to acetyl-CoA, which generates malonyl-CoA for fatty acid synthesis, whereas other carboxylases are located in the mitochondrial matrix; propionyl-CoA

¹ Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

Corresponding Author:

Cristina Fernandez-Mejia, PhD, Av. del Iman #1, 4° piso, Mexico City, CP 04530 Mexico
Email: crisfern@biomedicas.unam.mx

carboxylase catalyzes essential steps in the metabolism of amino acids, cholesterol, and odd-chain fatty acids, and β -methylcrotonyl-CoA carboxylase participates in leucine metabolism; pyruvate carboxylase, which converts pyruvate to oxalacetate, is critical in gluconeogenesis and tricarboxylic acid anaplerosis; and acetyl-CoA carboxylase-2 participates in the regulation of fatty acid oxidation and can also serve as a biotin reservoir.²⁰

Daily Requirements

In 1998, the Food and Nutrition Board of the United States Institute of Medicine considered that the then existing scientific evidence was insufficient to calculate a recommended dietary allowance for biotin, so they set an adequate intake level. The adequate intake level of biotin is 30 $\mu\text{g}/\text{d}$ for adults and pregnant women.²¹ During lactation, the adequate intake level of biotin is 35 $\mu\text{g}/\text{d}$; for infants (0-5 months), the adequate intake level is 5 $\mu\text{g}/\text{d}$. These recommendations were based mainly on 2 studies, one of which found that a daily dose of 60 μg biotin maintained adults receiving parenteral nutrition symptom free for 6 months,²² and the other showed that diets supplying 28 to 42 μg of biotin per day gave no indication of inadequate biotin status.²¹

Biotin as Gene Expression Regulator

Initial evidence that pharmacological concentrations of biotin affects gene expression was provided by Dakshinamurti and colleagues.^{23,24} They found that in alloxane diabetic rats and in nondiabetic fasted rats, an acute dose of biotin (1.2 mg/kg) increased the activity of hepatic glucokinase. The positive effect of biotin on glucokinase activity was also observed in cultured rat hepatocytes²⁵; this effect was preceded by increases in cyclic guanosine monophosphate content.²⁵ Later, with the arrival of molecular biology techniques,²⁶ the stimulatory effect of biotin on glucokinase was found to occur at the level of transcription. Since this discovery, significant progress has been made in the identification of genes whose expression is modulated by biotin.

DNA microarray studies in HepG2 cells and in peripheral blood mononuclear cells have contributed to the identification of thousands of genes affected by pharmacological concentrations of biotin.^{27,28} A large number of transcripts are modified by pharmacological concentrations of this vitamin. Wiedmann and colleagues²⁸ found increased expression of 139 genes and decreased expression of 131 genes in peripheral blood mononuclear cells as a result of supplementation with 2.15 mg of biotin for 21 days.²⁸ Identification of biotin-responsive genes by biological function showed that 16% of biotin-responsive gene products were localized in the cell nucleus and that the highest percentage of modified transcripts (28%) participate in signal transduction.²⁸ These authors also found that 54% of the biotin-responsive genes were clustered on chromosomes 1, 2, 3, 11, 12, and 19, whereas no biotin-responsive genes were found on chromosomes 10, 16, 18, 21, and heterosomes, suggesting that the human genome contains clusters of biotin-dependent

genes.²⁸ In the human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 cultured in media containing deficient, physiological, and pharmacological concentrations of biotin, approximately 1800 biotin-dependent genes were identified.²⁷ A large number of biotin-dependent genes could be assigned to one of the following clusters based on molecular function: DNA-binding proteins, RNA-binding proteins, genes that play roles in translational activity, nucleotide-binding proteins, and proteins with transferase activity.²⁷ Consistent with the hypothesis that the effects of pharmacological concentrations of biotin are different from those produced by biotin deficiency, these studies found that the set of genes affected by biotin deficiency differ from those affected by vitamin supplementation.²⁷

The effect of the vitamin on gene expression is not confined to the biotin molecule itself and does not appear to be mediated as a result of carboxylase activity.²⁹ Synthetic biotin analogs such as diaminobiotin and desthiobiotin, which do not participate as carboxylase prosthetic groups, have biotin-like activities with regard to gene expression.²⁹ Also, bisnorbiotin, a biotin catabolic metabolite resulting from β -oxidation of the valeric chain of biotin, which renders this metabolite inactive, because it cannot undergo activation by adenosine monophosphate binding, a prerequisite for binding to carboxylases, possesses the capacity to modify gene expression.²⁷

Biotin also modifies gene expression at the post-transcriptional level.^{30,31} The earliest studies pointing to a role of biotin in post-transcriptional events were by Stockert and colleagues and date back to the late 1980s.³⁰ They found that the expression of the asialoglycoprotein receptor is reduced in biotin-deficient HepG2 cells.³⁰ Addition of biotin or biocytin restored full expression of the asialoglycoprotein receptor, while messenger RNA expression was not modified. Additional support to the notion that biotin affects protein expression was obtained in high-throughput immunoblotting studies. These studies identified changes in protein expression in response to pharmacological concentrations of biotin; among them were found proteins that play a role in cell signaling, nuclear structure and transport, cytoskeleton homeostasis, and nervous system function.³¹ This report also provided evidence that the abundance of the selected proteins was not paralleled by the abundance of their messenger RNA.³¹

Molecular Mechanisms of Biotin as Genetic Modulator

Despite the extensive effect of biotin on gene transcription, the molecular mechanisms of the vitamin as a genetic modulator are largely unknown. Two different mechanisms appear to be involved in the genetic effects of biotin: histone biotinylation, reviewed by Hassan and Zemleni³² and a soluble guanylate cyclase-signaling cascade.³³⁻³⁷

Histone Biotinylation

Histone biotinylation has been implicated in heterochromatin structures, DNA repair, and mitotic chromosome condensation

and lifespan³²; however, recent studies have questioned the role of histone biotinylation on the effects of biotin.^{38,39}

Soluble Guanylate Cyclase-Signaling Cascade

This pathway has been linked to transcription of the enzymes involved in the function of biotin as a cofactor, such as carboxylases and holocarboxylase synthetase,³⁵ as well as transcription of genes unrelated to this function, such as pancreatic and hepatic glucokinase^{25,40} and to translation of the asialoglycoprotein receptor^{33,34} and insulin receptor.³⁴ Solorzano-Vargas et al³⁵ have proposed that biotinylation of adenosine monophosphate, an intermediate compound of holocarboxylase synthetase catalytic action, activates soluble guanylate cyclase. Activation of guanylate cyclase leads to increased production of cyclic guanosine monophosphate (cGMP), which in turn stimulates protein kinase G.

The few but consistent studies described above have provided evidence that the cyclic guanosine monophosphate/protein kinase G signaling pathway is involved in biotin-mediated gene expression; however, little is known about the mechanisms by which biotin stimulates soluble guanylate cyclase. A recent report⁴¹ has suggested that biotin exerts its effects via nitric oxide synthase, but other investigations⁴² have challenged the role of nitric oxide on biotin effects. Studies on the Jurkat human lymphoma cell line found that the concentration of nitric oxide, the messenger RNA abundance of endothelial and inducible nitric oxide synthase, and protein kinase G activity depend on the concentration of biotin in the medium.⁴¹ However, in studies *in vivo*, nitric oxide synthase does not appear to be involved in the hypotensive action of biotin.⁴² Further research is required to elucidate the role that nitric oxide plays in the stimulation of soluble guanylate cyclase by biotin.

The cascade of events downstream of the guanylate cyclase/protein kinase G pathway in biotin-mediated gene expression has been poorly investigated. Studies by de La Vega and Stockert³³ have found that protein kinase G activation promotes phosphorylation of the α -COP (coatamer protein) subunit of coatamer protein COPI, a protein that is associated with a translation region in the Golgi membrane (Figure 1). In isolated pancreatic islets, using blockers and inhibitors of different signaling pathways, we have discovered that the induction of glucokinase messenger RNA by biotin involves guanylate cyclase and protein kinase G activation, which triggers ATP production. The increase of ATP induces insulin secretion via ATP-sensitive potassium channels. Insulin, in an autocrine manner, activates PI3K/Akt signaling, which increases pancreatic glucokinase messenger RNA expression (Figure 1).

Effects of Pharmacological Concentrations of Biotin on Glucose Metabolism

Biotin affects genes that are critical in the regulation of glucose metabolism. Several studies have reported that biotin modifies positively the expression of genes that favor glucose

use in the liver. As described above, pharmacological concentrations of biotin promote hepatic glucokinase messenger RNA expression and activity.^{23-25,43,44} Other studies⁴³ have reported that the activity of glycolytic enzymes such as phosphofructokinase-1 and pyruvate-kinase increased after 24 hours of an acute dose of biotin (1 and 2 mg/kg body weight). However, in a recent study,⁴⁵ we found that in mice, 8 weeks of biotin-supplemented diet decreased messenger RNA abundance of phosphofructokinase-1 and pyruvate-kinase and had no effect on messenger RNA glucokinase expression. Contrasting results regarding the response to biotin could be explained by species differences as observed in other studies^{46,47}; additionally, variations in dose and in administration mode (chronic vs acute) and/or species differences in enzyme regulation⁴⁸ could account for differing results in these studies.

In diabetic rats, biotin decreases the expression of gluconeogenic genes, a pathway that stimulates glucose production by the liver and thus opposes glucose use. Studies in streptozotocin-treated rats found that the messenger RNA expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase was decreased 2 hours after intraperitoneal injection of 1 mg/kg of biotin⁴⁹; however, this effect was not observed in starved nondiabetic rats treated with biotin.²⁶ The negative transcriptional effect of biotin on phosphoenolpyruvate carboxykinase, on other gluconeogenic genes such as glucose-6-phosphatase, and on the transcription factors HNF-4- α and FoxO-1 was also observed by Sugita and colleagues⁴⁴ in streptozotocin diabetic rats 3 hours after biotin administration (1 mg/kg).

Biotin exerts beneficial effects on endocrine pancreas physiology. We found that biotin stimulates insulin and pancreatic glucokinase expression⁴⁰; pancreatic glucokinase is an enzyme that plays an important role in glucose homeostasis regulating insulin secretion in response to changes in blood glucose concentrations. Our group found that biotin concentrations of 10 to 1000 nmol/L augmented glucokinase activity and messenger RNA abundance in cultured pancreatic islets isolated from non-biotin-deficient rats.⁴⁰ A similar stimulatory effect on pancreatic glucokinase was observed in the insulinoma RIN 1046-38 cell line.⁵⁰ A positive effect of biotin on insulin secretion has been reported.^{40,51-53} Studies by our group^{40,51} and others^{52,53} have revealed that glucose-stimulated insulin secretion increases in response to acute exposure to pharmacological doses of biotin in primary cultured islets,⁴⁰ perfused pancreas,⁵³ or perfused islets.⁵² The mechanism by which biotin enhances insulin secretion involves the cyclic guanosine monophosphate/protein kinase G signaling pathway, which increases ATP levels and thus triggers insulin secretion.⁵¹

Another essential protein involved in intermediary metabolism, insulin receptor, is also regulated at the post-transcriptional level by biotin.³⁴ Studies by De la Vega and Stockert³⁴ showed that in the human hepatoblastoma cell line HuH-7, the biotin-dependent loss of cell surface insulin binding is a result of a reduction of insulin receptor polypeptide synthesis and that repletion of biotin fully restored expression of this receptor.³⁴ The rapid induction of insulin receptor

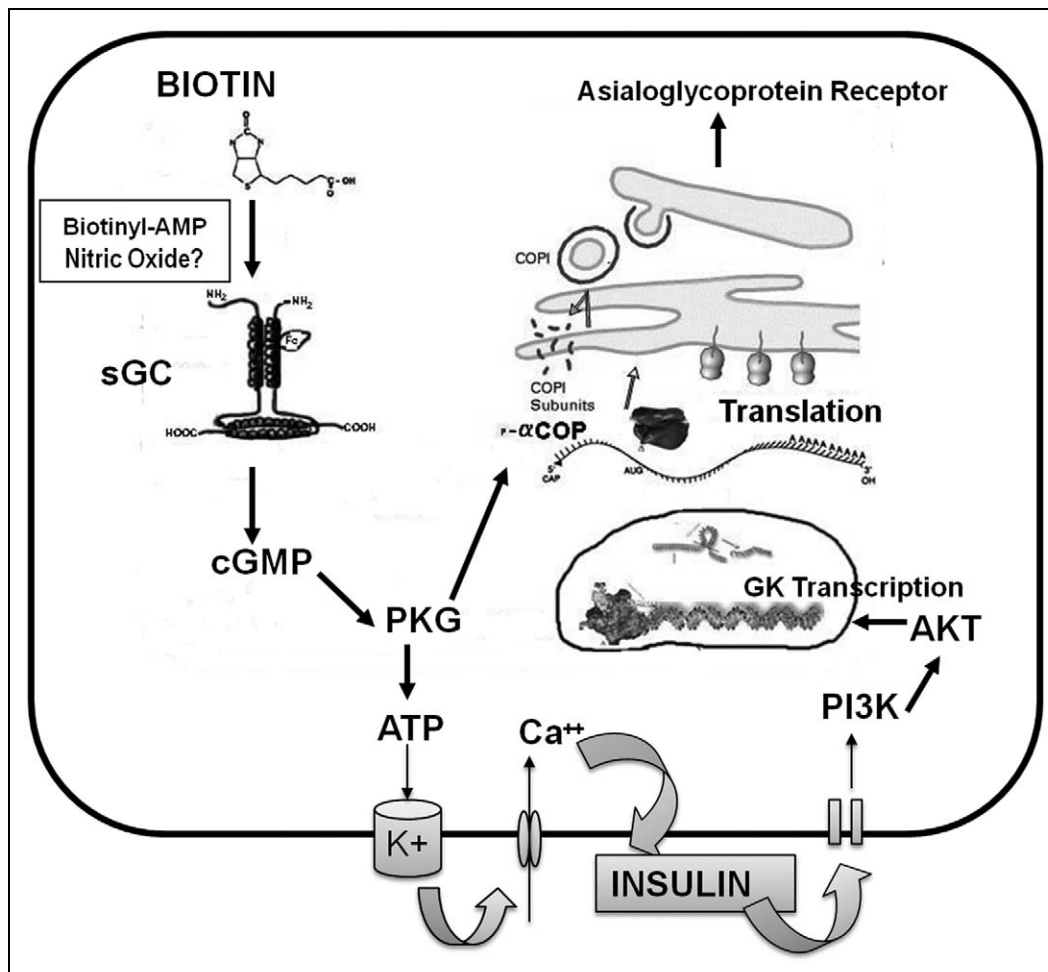


Figure 1. Cascade of events downstream of the guanylate cyclase/protein kinase G pathway in biotin-mediated gene expression: the post-transcriptional effect of biotin on asialoglycoprotein gene expression in the hepatoblastoma cell line HuH-7 involves guanylate cyclase and protein kinase G activation, which promotes phosphorylation of α -COP subunit of coatamer protein COPI, a protein that is associated with a translation region in the Golgi membrane. The induction of pancreatic glucokinase messenger RNA by biotin involves guanylate cyclase and protein kinase G activation, which leads to an increase in adenosine triphosphate (ATP) content. This induces insulin secretion via ATP-sensitive potassium channels. Autocrine insulin, in turn, activates phosphoinositol-3-kinase/Akt signaling

protein synthesis in the absence of an increase in the gene transcript number supports the notion that the effect of biotin is elicited by post-transcriptional regulation.

The finding that biotin affects the expression of critical genes in the regulation of carbohydrate metabolism is in agreement with several observations that indicate that biotin supply is involved in glucose homeostasis. In humans, reduced hyperglycemia was observed in a group of type-1 diabetic patients receiving 16 mg/d biotin for 1 week.⁵⁴ This improvement has also been observed in Japanese type-2 diabetic patients, in whom a decrease of about 45% fasting blood glucose concentrations was observed after 1 month of treatment with oral doses of 9 mg/d biotin.⁵⁵ In hemodialysis patients, pharmacological doses of biotin improved their oral glucose tolerance tests.⁵⁶ However, studies at our laboratory^{57,58} did not find significant differences in mild hyperglycemic type-2 diabetic patients in response to 15 mg/d of biotin for 28 days.^{57,58}

The hypoglycemic effect of the vitamin has also been observed in animal models.⁵⁹⁻⁶¹ In KK mice, a genetically diabetic model of moderate hyperglycemia and insulin resistance, daily biotin administration (2 and 4 mg/kg weight) for 10 weeks lowered postprandial glucose levels and improved tolerance to glucose and insulin resistance⁵⁹ as compared with saline-treated mice. In streptozotocin-induced diabetic Wistar rats, there was improvement in the impaired glucose tolerance test after 15 days of biotin administration (800 μ g/kg body weight). This effect was produced without changes in insulin secretion.⁶¹ Glucose tolerance amelioration was also observed in type-2 diabetic OLETF rats in response to biotin supplementation in the diet.⁶⁰ However, other studies,⁴² have found no effects of biotin supplementation (approximately 60 μ g/kg body weight) on glucose tolerance tests in both nondiabetic rats and stroke-prone spontaneous hypertensive rats. The low concentration of biotin used in this investigation could account for the discrepancies with other studies.

Effects of Pharmacological Concentrations of Biotin on Lipid Metabolism

Several studies have shown that pharmacological doses of biotin reduce hyperlipidemia. In healthy volunteers, 0.9 mg/d of biotin supplementation affected plasma lipid concentrations,⁶² and in patients with hyperlipidemia, Dokusova and Krivoruchenko⁶³ found that the administration of 5 mg of biotin daily for 4 weeks decreased hypercholesterolemia. Studies in our laboratory⁵⁸ revealed that 15 mg of biotin for 28 days decreased serum triglyceride and very low density lipoprotein concentrations (VLDL), but not total cholesterol, in type 2 diabetic patients and in non-diabetic subjects with hypertriglyceridemia. Commercially available drugs containing pharmacological amounts of biotin (2 mg/d) in combination with chromium picolinate (600 µg) produced significant reductions in serum triglycerides and in the ratio of low-density lipoprotein (LDL) to high-density lipoprotein (HDL) cholesterol.⁶⁴ Furthermore, a negative correlation between plasma biotin concentrations and blood lipids was found in humans.⁶²

In agreement with the hypotriglyceridemic effect of biotin observed in humans, in experimental animals, we found that pharmacological doses of biotin decrease serum triglyceride concentrations. In normal mice, 8 weeks of a biotin-supplemented diet (55-fold increase in biotin concentration compared with control diet) decreased serum triglyceride concentrations by 35%.⁴⁵ In rats, biotin supplied in water (2 mg/rat) decreased very low density lipoprotein concentration in serum⁶⁵ but did not modify total serum cholesterol.

The molecular mechanisms by which pharmacological concentrations of biotin modify lipid metabolism are largely unknown. In a recent study,⁴⁵ we investigated the effects of pharmacological doses of biotin on messenger RNA expression of various lipogenic genes in the liver and adipose tissue. We found that in normal mice fed a biotin-supplemented diet over a period of 8 weeks, messenger RNA abundance of the lipogenic transcription factor, sterol regulatory element binding protein 1-c, in the liver fell in response to the vitamin. In line with this, messenger RNA expression of proteins whose expression is known to be regulated by this transcription factor,⁶⁶ such as acetyl-CoA carboxylase-1, fatty acid synthase, and pyruvate kinase decreased in a similar proportion (40%).⁶⁶ In streptozotocin-treated rats, Sugita et al⁴⁴ observed similar negative effects on sterol regulatory element binding protein 1-c, acetyl-CoA carboxylase-1, and fatty acid synthase in response to acute doses of biotin. In addition, our studies found a strong increase in the abundance of glucose-6-phosphate dehydrogenase messenger RNA, whereas no change was detected in the messenger RNA expression of liver of stearoyl-CoA desaturase-1, two enzymes whose transcription is regulated by sterol regulatory element binding protein 1-c.⁶⁶

In adipose tissue, we found⁴⁵ decreased expression of the messenger RNA abundance of sterol regulatory element binding protein 1-c and of the genes it regulates—namely, those that code for glucose-6-phosphate dehydrogenase, acetyl-CoA carboxylase-1, and fatty acid synthase. We also found decreased

messenger RNA expression of phosphofructokinase-1 and peroxisome proliferator-activated receptor γ but no changes in FoxO1 expression. Moreover, the group fed a biotin-supplemented diet showed a significant decrease in epididymal adipose tissue weight compared with the control group.⁴⁵ In line with these findings, it is interesting to note that in the 3T3 cell line, a chloroacetylated biotin derivative inhibited the expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ and adipogenesis,⁶⁷ suggesting that biotin and biotin analogues are capable of affecting adipocyte (fat cell) differentiation.

Effects of Pharmacological Concentrations of Biotin on Hypertension

Pharmacological concentrations of biotin have been found to reduce hypertension.⁴² In a stroke-prone spontaneous hypertensive rat strain, 8 weeks of biotin ingestion in water (approximately 1.2 mg/kg weight) decreased systolic blood pressure, coronary arterial thickening, and the incidence of salt-induced stroke.⁴² The antihypertensive effect of biotin was also observed 6 to 10 hours after administration of single intraperitoneal doses of 0.5 and 5 mg of biotin.⁴² Pretreatment with a soluble guanylate-cyclase inhibitor abolished the hypotensive action of biotin, whereas pretreatment with the nitric oxide N^G-nitro-L-arginine methyl ester had no effect on biotin activity.⁴² These results suggest that the mechanism underlying the hypotensive action of biotin is based on a nitric oxide-independent activation of soluble guanylate cyclase.

Effects of Pharmacological Concentrations of Biotin on Development and Reproductive Functions

Biotin supplementation has also been reported to affect reproductive functions. Several studies^{15,68,69} have revealed that biotin supplementation in the diet of sows (350 µg/kg biotin diet) increases reproductive performance, induces estrus, and results in earlier conception than for sows with control diets (32 µg/kg biotin diet),^{15,68} suggesting that, if sows are to reach their full reproductive potential, the dietary formula should include biotin supplementation. However, other studies⁷⁰⁻⁷² have failed to demonstrate the beneficial effects of biotin supplementation on sow reproduction. The inconsistency of the effects observed could be related to total biotin availability in grains and oilseeds present in the base diet. Positive effects^{15,68,69} were observed in wheat-based sow diets, a cereal with low biotin availability and of questionable importance,⁷³ whereas no effects⁷⁰⁻⁷² were observed in corn-based sow diets, in which biotin availability is about 100%.

Positive effects of biotin were observed regarding milk production. In cows, biotin supplementation (0, 10, 20 mg/d) linearly increased milk production.⁷⁴⁻⁷⁶ First lactation heifers fed supplementary biotin took significantly fewer days from calving to conception and required fewer inseminations per pregnancy than controls of the same parity.⁷⁶

On the other hand, excessive amounts of biotin can negatively affect reproduction: for example, reduced fertility is caused by biotin excess in mosquitoes,⁷⁷ flies,⁷⁸ and hide-beetles (*Dermestes maculatus*).⁷⁹ In rats, acute administration of biotin (50-100 mg every morning and evening) during pregnancy causes resorption of fetuses and placentae as well as decreased uterus weight and glycogen content.^{14,80} Under such conditions, estrogen therapy helped maintain pregnancies to term, suggesting that biotin affects the endogenous production of estrogen.^{14,80,81} Furthermore, atrophy of the corpus luteum, ovarian stroma, and massive infiltration of leucocytes in the vaginal lumen have also been observed among adult rats injected with 50 mg of biotin.⁸¹ In contrast, a similar treatment did not disturb normal reproductive functions and embryonic development in ICR mice,¹² suggesting that mice are less sensitive to biotin excess than rats. In mice receiving approximately 16.6 mg/kg body weight/day in a biotin-supplemented diet during 9 weeks,¹³ we observed increased serum estradiol concentration and no changes in progesterone concentration compared with mice fed a control diet. Histological studies revealed a decrease in both ovarian primary and Graafian follicles.¹³ Contrary to the findings of Paul and Duttagupta,⁸¹ who observed disruption of the estrous cycle and atrophy of the corpora lutea caused by acute biotin treatment in rats,⁸¹ we did not observe significant changes in the estrous cycle or in the number of ovarian corpora lutea in mice.

Effects of Pharmacological Concentrations of Biotin on Immune Functions

Studies by Zempleni et al⁸² have documented that biotin supplementation modifies immune functions and the expression of cytokines. In healthy donors, biotin supplementation (0.75 mg of biotin for 14 days) caused a significant decrease in mitogen-stimulated peripheral blood mononuclear cell proliferation. Similarly, secretion of interleukin-1 β and interleukin-2 decreased by about 65% and 45%, respectively, compared with levels found for presupplementation cells. Percentages of peripheral blood mononuclear subsets were not affected by 14 days of biotin supplementation.⁸² In another study, the abundance of messenger RNA encoding interferon- γ and interleukin-1 β was 4.3 and 5.6 times greater, respectively, after supplementation with biotin, compared with peripheral blood mononuclear cells before supplementation, whereas the abundance of messenger RNA encoding interleukin-4 decreased after supplementation with the vitamin.⁸³ Similarly, as observed in peripheral blood mononuclear cells, in the human T cell line Jurkat, the treatment with pharmacological concentrations of 10 nmol/L of biotin decreased interleukin-2 secretion into the culture media.⁸⁴ In contrast with the decrease observed in biotin supplementation in healthy humans,⁸² biotin supplementation did not decrease cell proliferation rate in Jurkat cells.⁸⁴ The physiological consequence of the effects of biotin on immune functions remains to be studied.

Other Effects of Pharmacological Concentrations of Biotin

In Jurkat cells, biotin supplementation decreased the expression of Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase 3,⁸⁵ a protein that participates in calcium transport from the cytoplasm into the endoplasmic reticulum. Other studies⁸⁶ found that the abundance of CYP1B1 messenger RNA and the transcriptional activity of a CYP1B1 reporter gene, an enzyme that hydroxylates procarcinogens generating electrophilic mutagens, was greater in biotin-supplemented than in biotin-deficient cells.⁸⁶

Adverse Effects of Pharmacological Concentrations of Biotin

There are few studies addressing the toxicity of biotin.^{87,88} The oral LD₅₀ for rats and mice were 10 g/kg and 354 mg/g, respectively.⁸⁷ The intraperitoneal LD₅₀ reported for rats was 29 mg/kg body weight, and the intravenous LD₅₀ for mice was 1 g/kg.⁸⁷ In rodents, biotin was not toxic orally in the short term in subchronic toxicity studies of doses up to 353 mg/kg weight, but in these studies, the details were not provided.⁸⁸ In humans, biotin has been administered in a range of doses of 0.25 to 50 mg for up to 40 days, orally, intramuscularly, or intravenously to children, adults, and participants in experiments without adverse effects.⁸⁸

The mutagenic potential of biotin has been tested.^{89,90} In Ames test using *Salmonella typhimurim* and *Escherichia coli*, the mutagenic potential of 10 mg/plate biotin in dimethylsulfoxide showed that biotin was not mutagenic or toxic.⁸⁸ In the RK bacterial test, biotin (1 mg/mL, pH 7.4) showed no mutagenic effect.⁸⁹ The mutagenic potential of biotin in a Tradescantia-micronucleus test, showed that biotin was mutagenic, with a minimum effect dose of 244.3 mg/mL.⁹⁰

Although biotin administration has been considered to be safe,⁸⁸ studies to evaluate its toxicity and its use need to be carefully readdressed because pharmacological concentrations of biotin affect gene expression and physiological functions.

Conclusions

Observations since the 1960s have suggested that pharmacological concentrations of biotin are able to intervene in biological functions. These actions of biotin are being reevaluated with the help of new technologies and with novel results regarding the molecular mechanisms of this vitamin. Although beneficial effects of biotin have been observed on hypertension and glucose and lipid homeostasis, indicating its potential for promoting vascular health and preventing or managing diabetes, its action on reproductive functions raises concerns about its use at pharmacological concentrations. Further studies to evaluate biotin toxicity and its actions on diverse biological functions will be required to determine its use and efficacy and/or that of its derivatives as therapeutic agents.

Acknowledgments

We are grateful to PhD candidate Asdrubal Aguilera Méndez for bibliography search on selected topics. We also thank Isabel Pérez Monfort for correcting the English version of the manuscript.

Author Contributions

Bibliography search, first draft writing, figure design, final manuscript writing (CFM); bibliography search, writing of selected manuscript sections (M-LL-d-l-V-M).

Declaration of Conflicting Interests

Cristina Fernandez-Mejia and Maria-Luisa Lazo-de-la-Vega-Monroy and any of the collaborators who contributed to the study have no potential conflicting or competing interests that could affect this study, the interpretation of results, or preparation of the manuscript.

Funding

The authors disclosed receipt of the following financial support for the research and/or authorship of this article: This work was supported by grants from CONACyT: 99294-M and from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico: IN221908 Universidad Nacional Autónoma de México. Maria-Luisa Lazo-de-la-Vega-Monroy is a recipient of the CONACyT scholarship number CVU/Becario: 217876/207055.

References

- Balmer JE, Blomhoff R. Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res.* 2002;43:1773-1808.
- Carlberg C. Lipid soluble vitamins in gene regulation. *Biofactors.* 1999;10:91-97.
- Christakos S, Dhawan P, Liu Y, et al. New insights into the mechanisms of vitamin D action. *J Cell Biochem.* 2003;88:695-705.
- Rucker RB, Wold F. Cofactors in and as posttranslational protein modifications. *FASEB J.* 1988;2:2252-2261.
- Hinds TS, West WL, Knight EM. Carotenoids and retinoids: a review of research, clinical, and public health applications. *J Clin Pharmacol.* 1997;37:551-558.
- Mukherjee R, Davies PJ, Crombie DL, et al. Sensitization of diabetic and obese mice to insulin by retinoid X receptor agonists. *Nature.* 1997;386:407-410.
- Liu YL, Sennitt MV, Hislop DC, et al. Retinoid X receptor agonists have anti-obesity effects and improve insulin sensitivity in Zucker fa/fa rats. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000;24:997-1004.
- Brandsch R. Regulation of gene expression by cofactors derived from B vitamins. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 1994;40:371-399.
- Rodriguez-Melendez R, Zempleni J. Regulation of gene expression by biotin (review). *J Nutr Biochem.* 2003;14:680-690.
- Zempleni J. Uptake, localization, and noncarboxylase roles of biotin. *Annu Rev Nutr.* 2005;25:175-196.
- Denu JM. Vitamin B3 and sirtuin function. *Trends Biochem Sci.* 2005;30:479-483.
- Watanabe T. Morphological and biochemical effects of excessive amounts of biotin on embryonic development in mice. *Experientia.* 1996;52:149-154.
- Baez-Saldana A, Camacho-Arroyo I, Espinosa-Aguirre JJ, et al. Biotin deficiency and biotin excess: effects on the female reproductive system. *Steroids.* 2009;74:863-869.
- Paul PK, Dutttagupta PN. The effect of an acute dose of biotin at a post-implantation stage and its relation with female sex steroids in the rat. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 1976;22:181-186.
- Simmins PH, Brooks PH. Supplementary biotin for sows: effect on reproductive characteristics. *Vet Rec.* 1983;112:425-429.
- Dakshinamurti K. Biotin: a regulator of gene expression. *J Nutr Biochem.* 2005;16:419-423.
- Fernandez-Mejia C. Pharmacological effects of biotin. *J Nutr Biochem.* 2005;16:424-427.
- Wolf B. *Disorders of biotin metabolism.* Vol 2. New York: McGraw-Hill; 2001.
- 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.
- Shriver BJ, Roman-Shriver C, Allred JB. Depletion and repletion of biotinyl enzymes in liver of biotin-deficient rats: evidence of a biotin storage system. *J Nutr.* 1993;123:1140-1149.
- Yates AA, Schlicker SA, Suitor CW. Dietary reference intakes: the new basis for recommendations for calcium and related nutrients, B vitamins, and choline. *J Am Diet Assoc.* 1998;98:699-706.
- Innis SM, Allardyce DB. Possible biotin deficiency in adults receiving long-term total parenteral nutrition. *Am J Clin Nutr.* 1983;37:185-187.
- Dakshinamurti K, Cheah-Tan C. Biotin-mediated synthesis of hepatic glucokinase in the rat. *Arch Biochem Biophys.* 1968;127:17-21.
- Dakshinamurti K, Litvak S. Biotin and protein synthesis in rat liver. *J Biol Chem.* 1970;245:5600-5605.
- 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;259:6393-6396.
- Chauhan J, Dakshinamurti K. Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats. *J Biol Chem.* 1991;266:10035-10038.
- 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;17:23-30.
- Wiedmann S, Rodriguez-Melendez R, Ortega-Cuellar D, et al. Clusters of biotin-responsive genes in human peripheral blood mononuclear cells. *J Nutr Biochem.* 2004;15:433-439.
- Rodriguez-Melendez R, Lewis B, McMahon RJ, et al. Diaminobiotin and desthiobiotin have biotin-like activities in Jurkat cells. *J Nutr.* 2003;133:1259-1264.
- Collins JC, Paietta E, Green R, et al. Biotin-dependent expression of the asialoglycoprotein receptor in HepG2. *J Biol Chem.* 1988;263:11280-11283.
- Rodriguez-Melendez R, Griffin JB, Sarath G, et al. High-throughput immunoblotting identifies biotin-dependent signaling proteins in HepG2 hepatocarcinoma cells. *J Nutr.* 2005;135:1659-1666.
- Hassan YI, Zempleni J. A novel, enigmatic histone modification: biotinylation of histones by holocarboxylase synthetase. *Nutr Rev.* 2008;66:721-725.

33. de La Vega LA, Stockert RJ. The cytoplasmic coatmer protein COPI: a potential translational regulator. *J Biol Chem.* 1999; 274:31135-31138.
34. 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:C2037-2042.
35. 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;99:5325-5330.
36. Vesely DL. Biotin enhances guanylate cyclase activity. *Science.* 1982;216:1329-1330.
37. Vilches-Flores A, Tovar AR, Marin-Hernandez A, et al. Biotin increases glucokinase expression via soluble guanylate cyclase/protein kinase G, adenosine triphosphate production and auto-crine action of insulin in pancreatic rat islets. *J Nutr Biochem.* 2010;21:606-612.
38. Healy S, Perez-Cadahia B, Jia D, et al. Biotin is not a natural histone modification. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1789:719-733.
39. Bailey LM, Ivanov RA, Wallace JC, et al. Artifactual detection of biotin on histones by streptavidin. *Anal Biochem.* 2008;373:71-77.
40. Romero-Navarro G, Cabrera-Valladares G, German MS, et al. Biotin regulation of pancreatic glucokinase and insulin in primary cultured rat islets and in biotin-deficient rats. *Endocrinology.* 1999;140:4595-4600.
41. Rodriguez-Melendez R, Zempleni J. Nitric oxide signaling depends on biotin in Jurkat human lymphoma cells. *J Nutr.* 2009;139:429-433.
42. Watanabe-Kamiyama M, Kamiyama S, Horiuchi K, et al. Antihypertensive effect of biotin in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Br J Nutr.* 2008;99:756-763.
43. Dakshinamurti K, Tarrago-Litvak L, Hong HC. Biotin and glucose metabolism. *Can J Biochem.* 1970;48:493-500.
44. Sugita Y, Shirakawa H, Sugimoto R, et al. Effect of biotin treatment on hepatic gene expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2008;72:1290-1298.
45. Larrieta E, Velasco F, Vital P, et al. Pharmacological concentrations of biotin reduce serum triglycerides and the expression of lipogenic genes. *Eur J Pharmacol.* 2010;644:263-268.
46. Rabin BS. Inhibition of experimentally induced autoimmunity in rats by biotin deficiency. *J Nutr.* 1983;113:2316-2322.
47. Watanabe T, Endo A. Species and strain differences in teratogenic effects of biotin deficiency in rodents. *J Nutr.* 1989; 119:255-261.
48. Ureta T, Gonzalez C, Lillo S, et al. Comparative studies on glucose phosphorylating isoenzymes of vertebrates: I. The influence of fasting and the nature of the diet on liver glucokinase and hexokinases of rodents. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 1971;40:71-80.
49. Dakshinamurti K, Li W. Transcriptional regulation of liver phosphoenolpyruvate carboxykinase by biotin in diabetic rats. *Mol Cell Biochem.* 1994;132:127-132.
50. Borboni P, Magnaterra R, Rabini RA, et al. Effect of biotin on glucokinase activity, mRNA expression and insulin release in cultured beta-cells. *Acta Diabetol.* 1996;33:154-158.
51. Vilches-Flores A, Tovar AR, Marin-Hernandez A, et al. Biotin increases glucokinase expression via soluble guanylate cyclase/protein kinase G, adenosine triphosphate production and auto-crine action of insulin in pancreatic rat islets. *J Nutr Biochem.* 2010;21:606-612.
52. Sone H, Ito M, Shimizu M, et al. Characteristics of the biotin enhancement of glucose-induced insulin release in pancreatic islets of the rat. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2000;64: 550-554.
53. Sone H, Ito M, Sugiyama K, et al. Biotin enhances glucose-stimulated insulin secretion in the isolated perfused pancreas of the rat. *J Nutr Biochem.* 1999;10:237-243.
54. Coggeshall JC, Hegggers JP, Robson MC, et al. Biotin status and plasma glucose in diabetics. *Ann N Y Acad Sci.* 1985;447: 389-392.
55. Maebashi M, Makino Y, Furukawa Y, et al. Therapeutic evaluation of the effect of biotin on hyperglycemia in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Clin Biochem Nutr.* 1993; 14:211-218.
56. Koutsikos D, Fourtounas C, Kapetanaki A, et al. Oral glucose tolerance test after high-dose i.v. biotin administration in normoglycemic hemodialysis patients. *Ren Fail.* 1996;18: 131-137.
57. Baez-Saldana A, Zendejas-Ruiz I, Revilla-Monsalve C, et al. Effects of biotin on pyruvate carboxylase, acetyl-CoA carboxylase, propionyl-CoA carboxylase, and markers for glucose and lipid homeostasis in type 2 diabetic patients and nondiabetic subjects. *Am J Clin Nutr.* 2004;79:238-243.
58. Revilla-Monsalve C, Zendejas-Ruiz I, Islas-Andrade S, et al. Biotin supplementation reduces plasma triacylglycerol and VLDL in type 2 diabetic patients and in nondiabetic subjects with hypertriglyceridemia. *Biomed Pharmacother.* 2006;60: 182-185.
59. Reddi A, DeAngelis B, Frank O, et al. Biotin supplementation improves glucose and insulin tolerances in genetically diabetic KK mice. *Life Sci.* 1988;42:1323-1330.
60. Zhang H, Osada K, Maebashi M, et al. A high biotin diet improves the impaired glucose tolerance of long-term spontaneously hyperglycemic rats with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 1996;42:517-526.
61. Zhang H, Osada K, Sone H, et al. Biotin administration improves the impaired glucose tolerance of streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 1997;43:271-280.
62. Marshall MW, Kliman PG, Washington VA, et al. Effects of biotin on lipids and other constituents of plasma of healthy men and women. *Artery.* 1980;7:330-351.
63. Dokusova OK, Krivoruchenko IV. The effect of biotin on the level of cholesterol in the blood of patients with atherosclerosis and essential hyperlipidemia [in Russian]. *Kardiologiia.* 1972; 12(12):113.
64. Geohas J, Daly A, Juturu V, et al. Chromium picolinate and biotin combination reduces atherogenic index of plasma in patients with type 2 diabetes mellitus: a placebo-controlled, double-blinded, randomized clinical trial. *Am J Med Sci.* 2007;333:145-153.

65. Suchy SF, Wolf B. Effect of biotin deficiency and supplementation on lipid metabolism in rats: cholesterol and lipoproteins. *Am J Clin Nutr.* 1986;43:831-838.
66. Fougere F, Ferre P. New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochem J.* 2002;366(pt 2):377-391.
67. Levert KL, Waldrop GL, Stephens JM. A biotin analog inhibits acetyl-CoA carboxylase activity and adipogenesis. *J Biol Chem.* 2002;277:16347-16350.
68. Brooks PH, Smith DA, Irwin VC. Biotin-supplementation of diets; the incidence of foot lesions, and the reproductive performance of sows. *Vet Rec.* 1977;101:46-50.
69. Kornegay ET. Biotin in swine nutrition. *Ann N Y Acad Sci.* 1985; 447:112-121.
70. Lewis AJ, Cromwell GL, Pettigrew JE. Effects of supplemental biotin during gestation and lactation on reproductive performance of sows: a cooperative study. *J Anim Sci.* 1991; 69:207-214.
71. Watkins KL, Southern LL, Miller JE. Effect of dietary biotin supplementation on sow reproductive performance and soundness and pig growth and mortality. *J Anim Sci.* 1991;69: 201-206.
72. Hamilton CR, Veum TL. Response of sows and litters to added dietary biotin in environmentally regulated facilities. *J Anim Sci.* 1984;59:151-157.
73. Frigg M, Brubacher G. Biotin deficiency in chicks fed a wheat-based diet. *Int J Vitam Nutr Res.* 1976;46:314-321.
74. Zimmerly CA, Weiss WP. Effects of supplemental dietary biotin on performance of Holstein cows during early lactation. *J Dairy Sci.* 2001;84:498-506.
75. Majee DN, Schwab EC, Bertics SJ, et al. Lactation performance by dairy cows fed supplemental biotin and a B-vitamin blend. *J Dairy Sci.* 2003;86:2106-2112.
76. Bergsten C, Greenough PR, Gay JM, et al. Effects of biotin supplementation on performance and claw lesions on a commercial dairy farm. *J Dairy Sci.* 2003;86:3953-3962.
77. Pillai MK, Medhukar BV. Effect of biotin on the fertility of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* (L.). *Naturwissenschaften.* 1969;56:218-219.
78. Benschoter CA. Effect of dietary biotin on reproduction of the house fly. *J Econ Entomol.* 1967;60:1326-1328.
79. Cohen E, Levinson HZ. Disrupted fertility of the hidebeetle *Dermestes maculatus* (Deg.) due to dietary overdosage of biotin. *Experientia.* 1968;24:367-368.
80. Paul PK, Dutttagupta PN. The effect of an acute dose of biotin at the pre-implantation stage and its relation with female sex steroids in the rat. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 1975;21:89-101.
81. Paul PK, Dutttagupta PN, Agarwal HC. Effects of an acute dose of biotin on the reproductive organs of the female rat. *Curr Sci.* 1973;42:206-208.
82. Zemleni 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;131:1479-1484.
83. Wiedmann S, Eudy JD, Zemleni J. Biotin supplementation increases expression of genes encoding interferon-gamma, interleukin-1beta, and 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase, and decreases expression of the gene encoding interleukin-4 in human peripheral blood mononuclear cells. *J Nutr.* 2003;133: 716-719.
84. Manthey KC, Griffin JB, Zemleni J. Biotin supply affects expression of biotin transporters, biotinylation of carboxylases and metabolism of interleukin-2 in Jurkat cells. *J Nutr.* 2002; 132:887-892.
85. Griffin JB, Rodriguez-Melendez R, Dode L, et al. Biotin supplementation decreases the expression of the SERCA3 gene (ATP2A3) in Jurkat cells, thus, triggering unfolded protein response. *J Nutr Biochem.* 2006;17:272-281.
86. Rodriguez-Melendez R, Griffin JB, Zemleni J. Biotin supplementation increases expression of the cytochrome P450 1B1 gene in Jurkat cells, increasing the occurrence of single-stranded DNA breaks. *J Nutr.* 2004;134:2222-2228.
87. Bonjour J. Biotin. In: Machlin L, ed. *Handbook of Vitamins: Nutritional, Biochemical and Clinical Aspects.* New York: Marcel Dekker; 1991:403.
88. Fiume MZ. Final report on the safety assessment of biotin. *Int J Toxicol.* 2001;20(suppl 4):1-12.
89. Hayes S, Gordon A, Sadowski I, et al. RK bacterial test for independently measuring chemical toxicity and mutagenicity: short-term forward selection assay. *Mutat Res.* 1984;130:97-106.
90. Ma TH, Harris MM, Anderson VA, et al. Tradescantia-Micronucleus (Trad-MCN) tests on 140 health-related agents. *Mutat Res.* 1984;138:157-167.

Asunto: Fwd: JNB-11-684R2: Final Decision

De: Dra. Cristina Fernandez (crisfern@biomedicas.unam.mx)

Para: marialuisaqfb@yahoo.com.mx;

Fecha: Miércoles, 28 de marzo, 2012 7:31:45

----- Mensaje reenviado -----

De: "Journal of Nutritional Biochemistry" <jnb@uky.edu>

Para: crisfern@biomedicas.unam.mx

Enviados: Miércoles, 28 de Marzo 2012 6:41:38

Asunto: JNB-11-684R2: Final Decision

Ms. No.: JNB-11-684R2

Title: Effects of biotin supplementation in the diet on insulin secretion, islet gene expression, glucose homeostasis and beta cell proportion

Corresponding Author: Dr Cristina Fernandez-Mejia

Authors: Maria Luisa Lazo-de-la-Vega-Monroy, Ph. D. Candidate; Elena Larrieta, Ph. D.; Michael S German, M.D. Ph. D.; Armida Báez-Saldaña, Ph. D. ;

Dear Dr Fernandez-Mejia,

I am pleased to inform you that your manuscript (JNB-11-684R2) was accepted for publication in the Journal of Nutritional Biochemistry. We appreciate your efforts to strengthen the manuscript by considering the reviewers' comments. The manuscript will now be forwarded to the publisher for copyediting and composing. You will receive galley proofs, a copyright transfer form and an offprint (reprint) order form from the publisher.

Should you have any questions along the way to publication, I would be happy to answer them.

Thank you for submitting your work to the Journal of Nutritional Biochemistry; we appreciate your interest in JNB, and we invite you to submit manuscripts again in the future.

Sincerely,

Joseph R. Richardson
Editorial Manager

The Journal of Nutritional Biochemistry
Bernhard Hennig, Editor-in-Chief

www.elsevier.com/locate/jnutbio/

University of Kentucky

Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

Journal of Nutritional Biochemistry xx (2012) xxx–xxx

**Journal of
Nutritional
Biochemistry**

Effects of biotin supplementation in the diet on insulin secretion, islet gene expression, glucose homeostasis and beta-cell proportion[☆]

M.L. Lazo de la Vega-Monroy^a, E. Larrieta^{a,1}, M.S. German^b, A. Baez-Saldana^c, C. Fernandez-Mejia^{a,*}

^aUnidad de Genética de la Nutrición, Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México/Instituto Nacional de Pediatría, Mexico City, México

^bDiabetes Center/Center of Regeneration Medicine and Stem Cell Research, University of California San Francisco, San Francisco, CA, USA

^cDepartamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, México

Received 5 November 2011; received in revised form 24 March 2012; accepted 28 March 2012

Abstract

Besides its role as a carboxylase cofactor, biotin has a wide repertoire of effects on gene expression, development and metabolism. Pharmacological concentrations of biotin enhance insulin secretion and the expression of genes and signaling pathways that favor islet function *in vitro*. However, the *in vivo* effects of biotin supplementation on pancreatic islet function are largely unknown. In the present study, we investigated whether *in vivo* biotin supplementation in the diet has positive effects in rodent pancreatic islets. Male BALB/cAnN Hsd mice were fed a control or a biotin-supplemented diet over 8 weeks postweaning and tested for glucose homeostasis, insulin secretion, islet gene expression and pancreatic morphometry. Insulin secretion increased from the islets of biotin-supplemented mice, together with the messenger RNA (mRNA) expression of several transcription factors regulating insulin expression and secretion, including forkhead box A2, pancreatic and duodenal homeobox 1 and hepatocyte nuclear factor 4 α . The mRNA abundance of glucokinase, Cacna1d, acetyl-CoA carboxylase, and insulin also increased. Consistent with these effects, glucose tolerance improved, and glucose-stimulated serum insulin levels increased in biotin-supplemented mice, without changes in fasting glucose levels or insulin tolerance. Biotin supplementation augmented the proportion of beta cells by enlarging islet size and, unexpectedly, also increased the percentage of islets with alpha cells at the islet core. mRNA expression of neural cell adhesion molecule 1, an adhesion protein participating in the maintenance of islet architecture, decreased in biotin-supplemented islets. These findings provide, for the first time, insight into how biotin supplementation exerts its effects on function and proportion of beta cells, suggesting a role for biotin in the prevention and treatment of diabetes.

© 2012 Published by Elsevier Inc.

Keywords: Biotin supplementation; Insulin secretion; Beta cell gene expression; Beta-cell proportion; Islet architecture

1. Introduction

Increasingly, vitamins are being recognized as mediators of gene expression [1,2], illuminating the connection between nutritional

signals and biological functions. Vitamin research has identified 31 important transcription factors [3] and has led to the development 32 of new therapeutic agents for different diseases [4–6] including 33 diabetes [7,8]. Although less is known about water-soluble vitamins 34 as genetic modulators, evidence of their effects on gene expression 35 is increasing. 36

Biotin is a water-soluble vitamin that acts as a covalently bound 37 coenzyme of carboxylases. Unrelated to this role, pharmacological 38 concentrations of biotin modify gene expression (reviewed in Ref. 39 [9]) and have a wide repertoire of effects on systemic processes 40 (reviewed in Ref. [10]). DNA microarray studies and high-throughput 41 immunoblotting studies have aided in the identification of thousands 42 of genes whose expression is modified by biotin at both the 43 transcriptional and the posttranscriptional levels [11,12]. Critical 44 genes for glucose homeostasis, such as hepatic glucokinase [13] and 45 insulin receptor [14], increase their expression in response to biotin 46 supplementation, while the expression of several gluconeogenic 47 genes in diabetic rats is decreased by pharmacological concentrations 48 of biotin [15,16]. 49

Studies *in vitro* by others [17,18] and our group [19,20] have 50 consistently found that acute exposure to pharmacological doses of 51

Abbreviations: Foxa2, forkhead box A2; Hnf4 α , hepatocyte nuclear factor 4 α ; Ncam1, neural cell adhesion molecule 1; PDX-1, pancreatic and duodenal homeobox 1; PPAR α , peroxisome proliferator activated receptor alpha; PPAR γ , peroxisome proliferator activated receptor gamma; SREBF1, sterol regulatory element binding transcription factor 1.

[☆] Grants and fellowships: Maria-Luisa Lazo de la Vega-Monroy is a Ph.D. student from the Doctorado en Ciencias Biomédicas at Universidad Nacional Autónoma de México and has a scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CVU/scholar no.: 217876/207055). This work was supported by funds from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (44266M), Dirección General de Asuntos del Personal Académico (IN220908 and 29 214811) and UC-MEXUS (CNO7-87 and EBC/433/CFM).

* Corresponding author. Tel.: +52 5255 5606 35 58; fax: +52 5255 56063489.

E-mail address: crisfern@biomedicas.unam.mx (C. Fernandez-Mejia).

¹ Present address: Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica, INCMNSZ, Mexico City, México.

biotin enhances glucose-stimulated insulin secretion. Treatment of cultured islets with 1 to 10 $\mu\text{mol/l}$ biotin for 30 min to 24 h increase insulin secretion both at basal (5.5 mmol/l) and stimulatory (16 mmol/l) glucose concentrations [17,19,20]. The impact of biotin on insulin secretion is dose dependent [18] and unique among the B vitamins [17].

Pharmacological concentrations of biotin *in vitro* increase the expression of genes that are critical for maintaining the differentiated phenotype of the beta cell, preserving beta-cell mass (proportion of beta cells) and glucose-stimulated insulin secretion [19–22]. Culturing isolated rat islets with biotin increases the expression of pancreatic and duodenal homeobox 1 (*Pdx-1*) [22], a critical transcription factor for the expression of insulin and for several genes involved in insulin synthesis and secretion (reviewed in Ref. [23]). Studies by others using the RIN1046-38 insulinoma cell line [21] and by our group using isolated islets from rats [19,20] have found that pharmacological concentrations of biotin augment the expression of beta-cell glucokinase, the rate-limiting enzyme in glucose-stimulated insulin secretion [24] and a determinant factor in beta-cell regeneration [25]. We have also found that the mechanism by which biotin increases the expression of *Glucokinase* involves enhancing insulin secretion through the cGMP/PKG signaling pathway, which increases ATP levels and, thus, beta-cell membrane depolarization. Insulin secretion, in turn, increases beta-cell *Glucokinase* messenger RNA (mRNA) expression via autocrine stimulation of PI3K/Akt signaling [19].

In line with these effects of biotin on glucose metabolism and insulin secretion, pharmacological doses of biotin lowered hyperglycemia and ameliorated diabetes in some [26–28] but not all [29] studies done in humans. In a group of patients with type 1 diabetes, supplementation with 16 mg/day of biotin with removal of insulin treatment for 1 week considerably decreased hyperglycemia [26]. In Japanese patients with type 2 diabetes [27] and in patients undergoing hemodialysis [28], pharmacological doses of biotin improved glucose tolerance.

Biotin supplementation also ameliorated hyperglycemia in animal models of diabetes. In KK mice, a genetically diabetic model of moderate hyperglycemia and insulin resistance, biotin administration for 10 weeks lowered postprandial glucose levels and improved both glucose tolerance and insulin sensitivity [30]. In spontaneously type-2 diabetic OLETF rats, dietary biotin supplementation also improved glucose tolerance [31].

The evidence that biotin has favorable effects on glucose metabolism has led to the development of commercially available diabetes medications [8,32], containing pharmacological amounts of biotin 40- to 166-fold increase compared with the reference dietary intake of 30 $\mu\text{g/day}$ [33]. However, in spite of the importance of the pancreatic islet in maintaining normal glucose homeostasis, no studies have addressed the effect of *in vivo* biotin supplementation on the pancreatic beta cell. Since beta-cell compensation is critical to prevent diabetes development [34], in the present study, we investigated the effects of biotin supplementation on beta-cell function, gene expression and beta-cell proportion.

2. Materials and methods

2.1. Animal model and experimental design

Three-week old male BALB/cAnN Hsd mice from the animal facility at the Biomedical Research Institute of the National Autonomous University of Mexico were maintained in barrier conditions under 12-h light/dark cycles, and allowed free access to water and food throughout the experiments, except during fasting. The mice were handled according to the principles of laboratory animal care (National Institutes of Health publication no. 85-23, revised 1985, <http://grants1.nih.gov/grants/olaw/references/phspol.htm>). All procedures were approved by the Ethical Committee for Experimentation of the Biomedical Research Institute of the National Autonomous University of Mexico. The mice were fed for 8 weeks with one of the following diets:

biotin-control (TD-01362) or biotin-supplemented diet (TD-01363), containing 1.76 and 97.70 mg of free biotin/kg diet, respectively (Harlan Teklad, Madison WI, USA). Complete information on diet composition has been published elsewhere [35]. After 8 weeks of feeding, the mice were food deprived for 16 h, anesthetized with Sevoflurane (Sevoflurane, Abbott Laboratories, Mexico DF, Mexico), and blood and pancreas were extracted. Finally, the mice were killed by cervical dislocation.

2.2. Blood insulin and biotin measurements

Blood samples were collected and centrifuged at $10,000\times g$ and 4°C for 10 min. Sera were stored at -20°C until used. Insulin concentrations were determined with Ultrasensitive rat insulin EIA enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (ALPCO Diagnostics, Windham, NH, USA) according to the 25- μl sample protocol provided by the manufacturer. Serum biotin was quantified using Biotin EIA ELISA kit (ALPCO Diagnostics). Absorbance was measured using the Labsystems Multiskan MS plate reader (Labsystems, Helsinki, Finland). All measurements were performed by duplicate.

2.3. Blood glucose measurements

Blood glucose concentrations under fasting or fed conditions were determined from tail vein samples using a portable glucose meter (Precision QID, MediSense, Inc., Abbott Laboratories).

2.4. Glucose-stimulated insulin secretion

Groups of 20–30 pair-sized islets were isolated as previously reported [36] and were cultured in biotin-free Dulbecco's modified Eagle medium (11 mmol/l glucose, 400 U/ml penicillin and 200 mg/l streptomycin and 10% dialyzed fetal bovine serum; Gibco, Grand Island, NY, USA). After overnight incubation at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 , islets were preincubated for 30 min in Hanks' balanced salt solution (HBSS) with 0.5% bovine serum albumin (wt/vol) and 3 mmol/l glucose. Islets were then incubated for 1 h in HBSS containing 5.6 or 15.6 mmol/l glucose. Insulin in the media was measured using ultrasensitive rat insulin EIA ELISA kit (ALPCO Diagnostics).

2.5. Quantitative real-time polymerase chain reaction

Total RNA isolation and relative quantifications of mRNA were determined by real-time quantitative polymerase chain reaction using an ABI Prism 7700 Sequence Detector instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) as previously reported [36]. See ESM Table 1 for complete information on the primers used. Samples were analysed by triplicate and corrected for the 18S ribosomal subunit RNA used as internal standard.

2.6. Glucose and insulin tolerance tests

All glucose and insulin tolerance tests were performed between (10:00–11:00 AM). For glucose tolerance test, the mice were fasted overnight (16 h) before the test. Glucose (2g/kg body weight) was injected intraperitoneally, and blood samples were taken before and at 15, 30, 60, 90 and 120 min after the injection. Blood glucose was measured with a glucometer (Precision QID, MediSense, Inc., Abbott Laboratories Company). In addition, blood was collected from the tail vein during the glucose tolerance test for serum separation and insulin measurement.

For insulin tolerance tests, the mice had free access to food until the test. Insulin [1 IU/kg body weight of soluble human insulin Humulin (Eli Lilly, Mexico DF, Mexico)] was injected intraperitoneally, and blood samples were taken before and at 15, 30, 60 and 90 min after the injection of insulin. Blood glucose concentrations were measured with a glucometer as described above. Areas under the curves (AUCs) were calculated using Microcal Origin 6.0 software (Microcal Software, Inc., Northampton, MA, USA).

2.7. Immunohistochemistry and morphometric analysis

Immunohistochemistry and morphometric analysis on pancreas sections were performed as previously reported [36]. Briefly, slides with pancreatic sections were deparaffinized, rehydrated, permeabilized with 0.3% Triton X-100 (Calbiochem, 169

Table 1

Effect of 8 weeks of biotin supplementation on blood glucose and insulin concentrations

Measurement	Control	Biotin supplemented
Fasting blood glucose (mmol/l)	4.9 \pm 0.1	4.9 \pm 0.2
Fed blood glucose (mmol/l)	7.6 \pm 0.4	7.8 \pm 0.2
Fasting serum insulin (pmol/l)	50.6 \pm 7.3	54.5 \pm 2.8
Fed serum insulin (pmol/l)	76.6 \pm 6.4	85.4 \pm 3.5

Values are means \pm S.E.M. $n=4-5$ for insulin; $n=10$ for blood glucose.

t1.1

t1.2

t1.3

t1.4

t1.5

t1.6

t1.7

t1.8

170 Darmstadt, Germany) and blocked with 3% normal goat serum (Microlab, Aguascalientes, Mexico). Sections were incubated overnight with guinea pig anti-porcine insulin antibody (1:1000; Linco, St. Charles, MO, USA) and mouse anti-glucagon antibody (1:6000; Sigma, St. Louis, MO, USA). Secondary goat anti-guinea pig immunoglobulin G (IgG) fluorescein isothiocyanate-conjugated (1:200) and antimouse IgG Cy3-conjugated (1:800) antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) were used. Slides were imaged using an Olympus 1X70 microscope (Tokyo, Japan) with an attached Hamamatsu camera (Hamamatsu City, Japan). Images were taken with identical configuration settings.

179 Areas of islets, beta cells, alpha cells and total pancreatic sections were quantified, and relative beta-cell and alpha-cell volume was calculated as the ratio of total cell area/pancreas area. Cell distribution was assessed by quantification of the percentage of islets with one or more alpha cells located at least three cell widths from the mantle. All image analyses were done using Image J 1.40 software (Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA).

185 2.8. Pyruvate carboxylase activity

186 Pyruvate carboxylase activity was measured in islets by radioenzymatic assay as previously reported [29], using $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (0.265 GBq/mmol). Protein content was quantified by Bradford assay. Enzymatic activity is reported as nanomoles per liter of fixed $^{14}\text{CO}_2$ per minute per milligram of total protein.

190 2.9. Statistical analysis

191 All data presented are the mean \pm S.E.M.; *n* denotes the number of evaluated subjects. Statistical analysis was performed using Statview V.4.5 (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA). The data were analyzed by Student's *t* test or two-way analysis of variance. *P* values of less than .05 were considered statistically significant.

195 3. Results

196 3.1. Effects of biotin supplementation on body weight, food intake and biotin levels

198 Over 8 weeks of biotin supplementation, the average food intake was 0.12 ± 0.015 and 0.12 ± 0.003 g of food (g of body weight) $^{-1}$ day $^{-1}$ in the control and supplemented groups, respectively. Thus, during this period, the daily ingestion of biotin was 0.84 ± 0.1 and 48.16 ± 1.1 μmol of biotin (kg body weight) $^{-1}$ day $^{-1}$ in the control and supplemented groups, respectively. Serum biotin in biotin-supplemented mice was significantly increased compared with control mice (590.6 ± 6.5 nmol/l for biotin supplemented vs. 55.2 ± 17.4 nmol/l for control, *P* < .05). Biotin supplementation did not modify body weight (control: 24.7 ± 0.2 g, biotin supplemented: 25.1 ± 0.5 g).

208 3.2. Effect of biotin supplementation on insulin secretion from isolated islets

210 To evaluate whether biotin supplementation *in vivo* can increase insulin secretion as observed in studies *in vitro*, glucose-stimulated insulin release from islets isolated from control and biotin-supplemented mice was measured. We found that insulin secretion was increased in islets isolated from biotin-supplemented mice, being more pronounced at 5.6 mmol/l glucose [control 0.13 ± 0.02 and 0.22 ± 0.04 , biotin supplemented 0.22 ± 0.02 and 0.30 ± 0.03 ng of insulin (islet) $^{-1}$ h $^{-1}$ for low and high glucose, respectively] (Fig. 1).

218 3.3. Expression of genes involved in beta-cell function in response to biotin supplementation

220 To further analyze the effect of biotin supplementation on beta-cell function, we examined insulin gene expression levels, as well as the expression of several genes involved in insulin transcription, glucose sensing and metabolism and glucose-induced insulin secretion.

224 Biotin supplementation doubled insulin 2 (*Ins2*) gene expression (1.9 ± 0.3 -fold) and increased approximately 70% the expression of *Glucokinase* (1.7 ± 0.1 fold change) (Fig. 2A). Levels of the *Cacna1d* mRNA and of the biotin-dependent enzyme acetyl-CoA carboxylase 1 (*Acc1*) were also increased (2.4 ± 0.7 and 2.3 ± 0.1 -fold increase,

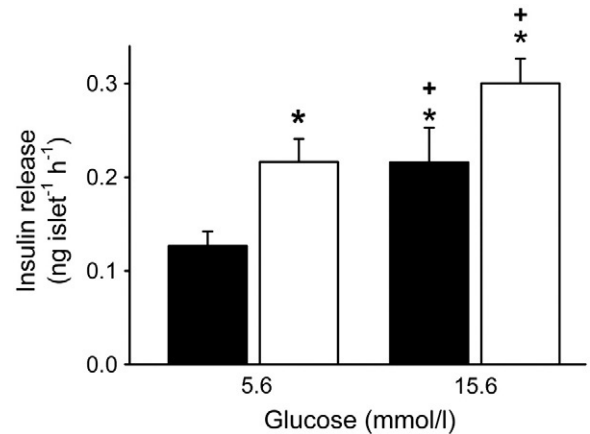


Fig. 1. Biotin supplementation increases insulin secretion. Glucose-induced insulin release from cultured pancreatic islets of control (black) or biotin-supplemented (white) mice. Data represent mean \pm S.E.M. Results are the mean of four independent experiments. **P* < .05 compared with basal secretion of the control (5.6 mmol/l). ⁺*P* < .05 compared with secretion at 5.6 mmol/l for the same group.

respectively) (Fig. 2A). Expression of the mRNAs encoding glucose transporter *Glut2* (*Slc2a2*), sulfonylurea receptor *SUR1* (*Abcc8*) and the insulin receptor (*Insr*) did not change significantly (Fig. 2A).

Expression levels of several transcription factors regulating the insulin gene expression, namely, *Pdx1*, forkhead box A2 (*Foxa2*) and hepatocyte nuclear factor 4 α (*Hnf4a*) increased significantly in islets

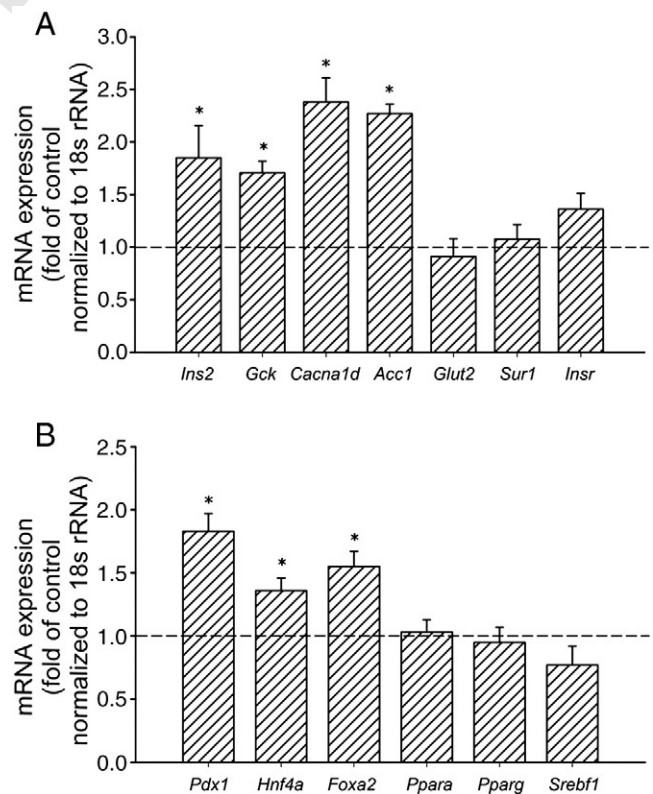


Fig. 2. Biotin supplementation increases expression of genes involved in beta-cell function. The mRNA expression of genes participating in glucose sensing, beta-cell metabolism and glucose-induced insulin secretion (A) and transcription factors involved in beta-cell function (B) was determined from islets of control and biotin-supplemented mice. Expression levels are presented as fold changes for biotin-supplemented islets relative to control values (dashed line). Data are mean \pm S.E.M. **P* < .05 compared with basal expression. *n* = 5–8 pools of 200 islets per group.

235 from biotin-supplemented mice (1.8 ± 0.1 , 1.6 ± 0.1 and 1.4 ± 0.1 fold
236 changes, respectively) (Fig. 2B), whereas sterol regulatory element
237 binding transcription factor 1 (*Srebf1*) (also known as *Srebp1c*),
238 peroxisome proliferator activated receptor alpha (*Ppara*) and perox-
239 isome proliferator activated receptor gamma (*Pparg*) gene expression
240 did not change.

241 3.4. Effect of biotin supplementation on glucose homeostasis and insulin 242 secretion in vivo

243 Next, investigations were carried out to ascertain how the changes
244 induced in the pancreas by *in vivo* biotin supplementation influenced
245 glucose homeostasis in the intact animals. No differences in fasting
246 and fed blood glucose and insulin concentrations between the biotin-
247 supplemented and the control groups were found (Table 1). However,
248 in the glucose tolerance test, blood glucose concentrations fell more
249 rapidly at 30 and 60 min postglucose injection in the biotin-
250 supplemented animals (Fig. 3A). The mean total AUC for the glucose
251 tolerance test was significantly lower in the biotin-supplemented
252 group (1397.2 ± 29.1 mmol/l \times min for the biotin-supplemented group
253 vs. 1259.8 ± 23.2 mmol/l \times min for the control group, $P < .05$).

254 The improved glucose tolerance in the biotin-supplemented mice
255 was not due to increased insulin sensitivity since these animals had
256 no change in insulin tolerance relative to the control group (Fig. 3B),
257 suggesting that biotin supplementation may improve glucose
258 tolerance by increasing insulin secretion.

259 To test for augmented insulin secretion, serum insulin levels were
260 measured during the glucose tolerance test. Biotin-supplemented
261 mice had higher serum insulin concentrations at 5, 25, 45 and 90 min
262 after glucose injection than did the control mice (Fig. 3C).

263 3.5. Effect of biotin supplementation on alpha- and beta-cell proportion 264 and islet composition

265 The effects of biotin supplementation on islet morphology and cell
266 proportion had not been previously assessed. The insulin immunopos-
267 itive (beta cells) and glucagon immunopositive (alpha cells) areas in
268 pancreatic sections from control and biotin-supplemented mice were
269 quantified. Biotin supplementation approximately doubled beta-cell
270 proportion, expressed as total beta-cell area per pancreas area (relative
271 volume). Biotin supplementation also increased alpha-cell and total islet
272 area per total pancreatic area (Fig. 4A). No differences were observed in
273 pancreatic weight between biotin-supplemented and control mice
274 (163 ± 6 mg for biotin supplemented vs. 166 ± 7 mg for control).

275 To ascertain whether the increment in the proportion of beta and
276 alpha cells observed in biotin-supplemented mice was due to changes
277 in islet size, islet number or islet composition, we measured these
278 parameters in pancreatic sections. Biotin supplementation did not
279 significantly modify islet number per total pancreatic area (control:
280 6.0 ± 0.5 islets/10 mm² vs. supplemented: 6.9 ± 0.7 islets/10 mm²) but
281 increased the average size of individual pancreatic islets by
282 approximately 75% (Fig. 4B and C), particularly augmenting the
283 proportion of islets larger than 10,000 μ m² (Fig. 4D). Despite their
284 larger size, biotin-supplemented islets showed no significant change
285 in the proportions of alpha and beta cells relative to control islets
286 (control: $77.4 \pm 1.1\%$ beta cells and $21.7 \pm 1.1\%$ alpha cells vs. biotin
287 supplemented: $74.4 \pm 1.1\%$ beta cells and $24.0 \pm 1.2\%$ alpha cells).

288 Surprisingly, the morphologic analysis showed that islets of
289 biotin-supplemented mice had a modified islet architecture compar-
290 ed with control islets (Fig. 5A). Instead of the typical islet
291 architecture with the beta cells located at the core of the islet and
292 alpha cells at the periphery in the biotin-supplemented group, we
293 observed a high proportion of islets with alpha cells at the center of
294 the islet (40% above control) (Fig. 5B). To determine the mechanisms
295 involved in this effect, we examined different aspects that have been

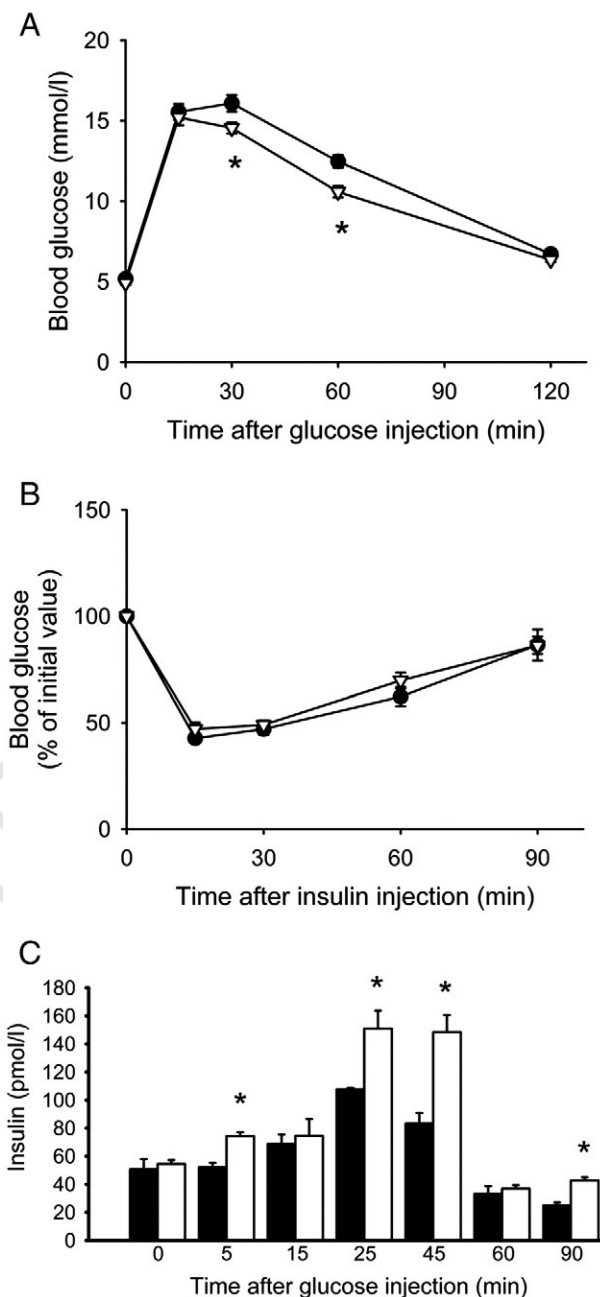


Fig. 3. Biotin supplementation improves glucose tolerance and serum insulin without increasing insulin sensitivity. (A) Blood glucose concentrations during glucose tolerance test (ip injection of 2 g/kg of glucose). (B) Percentages of basal (0 min) blood glucose levels during insulin tolerance test (ip injection of 1 U/kg insulin). (C) Serum insulin concentrations during glucose tolerance test. Black: control mice; white: biotin-supplemented mice. Values are means \pm S.E.M. $n = 18$ mice per group for tolerance tests; $n = 3-4$ mice per group for serum insulin. * $P \leq .05$ compared with the control.

associated with changes in islet architecture: (1) increased metabolic 296 demand [37], (2) pyruvate carboxylase activity changes [38] and (3) 297 changes in the expression of adhesion molecules [39,40]. 298

3.6. Effect of biotin supplementation on body weight, glucose levels or 299 insulin tolerance over 8 weeks on diet 300

No changes in glucose levels (Fig. 6A and B), body weight (Fig. 6C) 301 or insulin tolerance AUC (Fig. 6D) were found in the biotin- 302

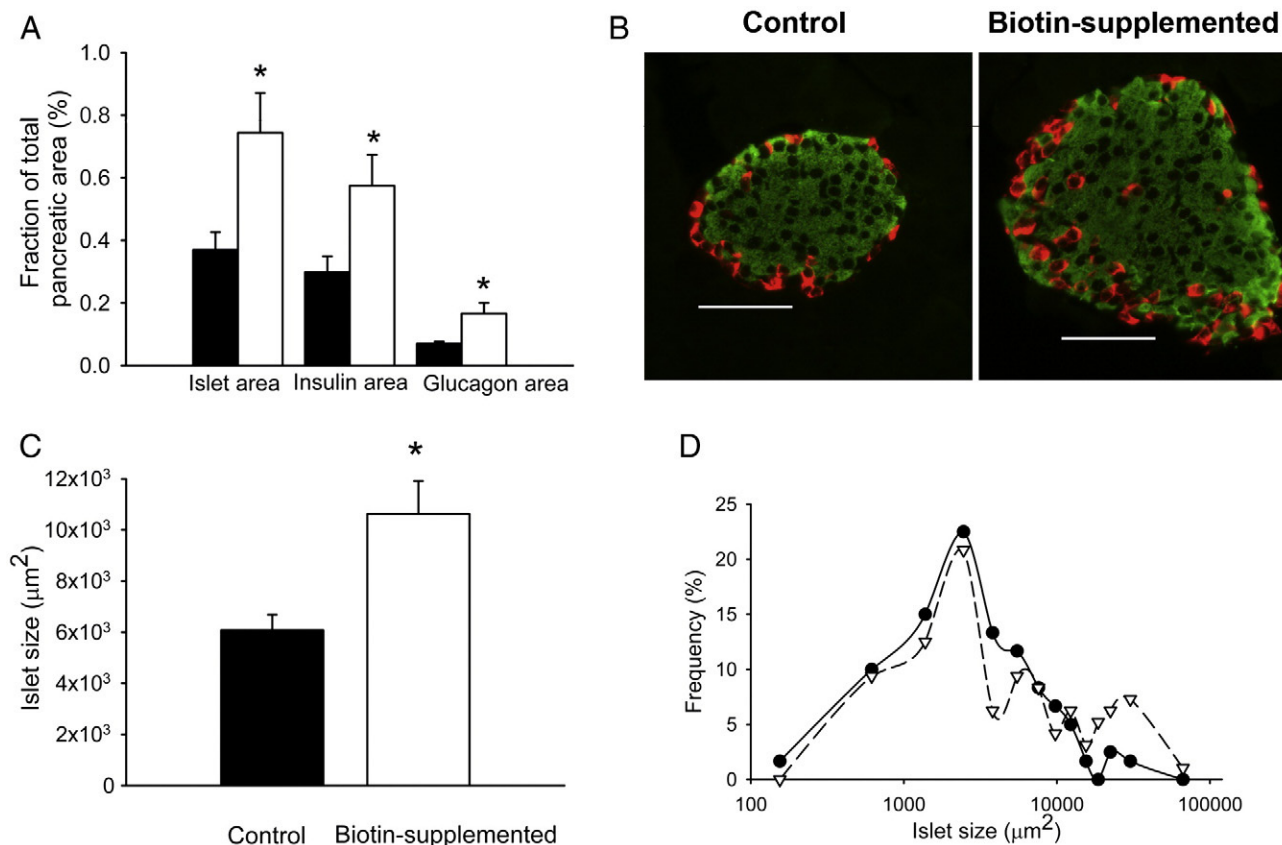


Fig. 4. Biotin supplementation increases the proportion of alpha and beta cells by augmenting islet size. (A) Morphometry from pancreatic sections of control (black) and biotin-supplemented (white) mice was performed after 8 weeks of diet administration. Values are mean percentages \pm S.E.M. $n=5-6$ mice per group. * $P \leq .05$ compared with the control group. (B) Immunofluorescence images of pancreatic islets from control (left) and biotin-supplemented (right) mice pancreas sections stained for insulin (green) and glucagon (red). Scale bar represents 50 μ m. (C) Islet average size (mean area \pm S.E.M.); * $P \leq .05$ compared with the control. (D) Frequency distribution of islet size expressed as percentage of total number of islets measured. Black circles: control mice; white triangles: biotin-supplemented mice; $n=120$ islets (control) and 96 islets (biotin supplemented).

303 supplemented group compared with the control group at any time
304 point measured.

305 3.7. Effect of biotin supplementation on pyruvate carboxylase expression 306 and activity

307 To investigate whether the effects of biotin supplementation
308 on the islet were related to pyruvate carboxylase, a biotin-
309 dependent enzyme, mRNA expression of the pyruvate carboxyl-
310 ase (*Pcx*) gene and pyruvate carboxylase activity was measured,
311 from islets of both the control and the biotin-supplemented
312 mice. We observed no significant differences in the expression
313 (Fig. 6E) or the enzyme activity (Fig. 6F) of pyruvate carboxylase
314 between the groups.

315 3.8. Effect of biotin supplementation on the expression of 316 adhesion molecules

317 We investigated the effect of biotin supplementation on the
318 mRNA expression of genes involved in maintaining islet architecture
319 and morphology, such as neural cell adhesion molecule 1 (*Ncam1*)
320 and *Cadherin 1* (*Cdh1*, also known as E-cadherin). The data showed
321 that biotin supplementation significantly decreased *Ncam1* mRNA
322 expression ($27 \pm 5\%$ below control, $P < .05$). There was no difference
323 in the abundance of *Cdh1* mRNA between the biotin-supplemented
324 and the control groups (Fig. 7).

4. Discussion

325

Robust beta-cell function and mass are essential for preventing the
development of diabetes [34]. Strategies toward enhancing these
attributes will aid in the fight against this disease. Several studies
in vitro have shown that pharmacological concentrations of biotin
increase insulin secretion [17–20] and the expression of *Glucokinase*
[19,20] and *Pdx1* [22], proteins that favor function and preservation of
beta cells [23–25]. In the current study, we examined whether
chronic, *in vivo* biotin supplementation could produce changes that
promote beta-cell function. We found that biotin supplementation
over 8 weeks produces several effects on beta-cell proportion and
function and that these effects influence favorably glucose tolerance.
These results support observations in both diabetic mouse models
[30] and patients [27], which found that 2 months of pharmacological
doses of biotin decreased hyperglycemia.

The data obtained demonstrated that *in vivo* biotin supplementa-
tion increases insulin release from isolated islets. This finding is in
line with *in vitro* studies performed by our group [19,20] and others
[17,18] showing that biotin can potentiate glucose-stimulated
insulin secretion. It is interesting to note that the increase in
insulin secretion in islets isolated from biotin-supplemented mice
was more pronounced at 5.6 mmol/l glucose. It has been shown
that an increase in glucokinase activity lowers the threshold of
glucose-stimulated insulin release, without increasing the maximal
secretory activity of the beta cell [41], as observed in our results.
Given that biotin supplementation increases glucokinase expression
and activity, as reported in the present and other studies [19,20], it

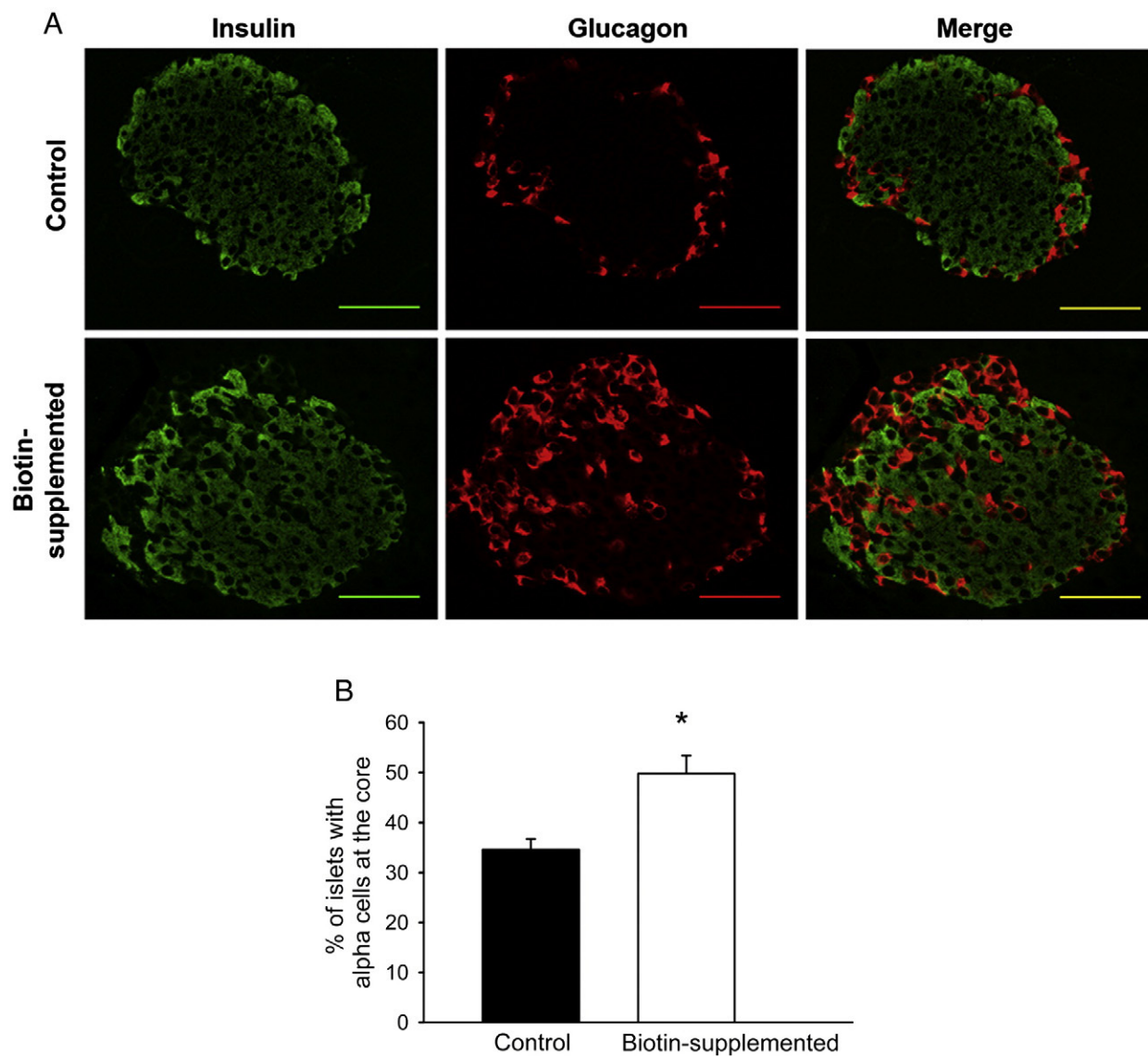


Fig. 5. Biotin supplementation modifies islet architecture. (A) Pancreatic sections of control and biotin-supplemented mice after 8 weeks of diet administration were immunostained with anti-insulin and antiglucagon antibodies. Glucagon-positive cells are found scattered in the islet in biotin-supplemented islets. Scale bar represents 50 μm . (B) Percentage (mean \pm S.E.M.) of islets with more than one glucagon-positive cell at the core (fourth layer or further from the mantle) of the islet. * $P < .05$ compared with the control group. $n = 8$ mice per group.

352 is plausible then that increased glucokinase expression could
 353 participate in the enhanced effect of biotin supplementation on
 354 insulin secretion.

355 The increasing effect of biotin on insulin secretion was paralleled
 356 by increased expression of several genes that regulate insulin
 357 secretion. As previously found in studies *in vitro* [19,20], we found
 358 that biotin supplementation increased *Glucokinase* mRNA expression,
 359 an enzyme considered the glucosensor of the pancreatic beta cell [24].
 360 We also found that biotin supplementation produced a substantial
 361 increase in the mRNA abundance of *Cacna1d*, which codes for a
 362 voltage-dependent L-type calcium channel subunit importantly
 363 controlling Ca^{2+} entry during insulin secretion [42]. In addition,
 364 biotin increased the mRNA abundance of *Acc1*, an enzyme involved in
 365 the metabolic coupling occurring during the K_{ATP} -independent
 366 mechanism of insulin secretion [43]. These results suggest that, in
 367 addition to enhancing glucose catabolic flux through glucokinase
 368 increase, biotin could also be enhancing insulin release by modulating
 369 calcium entry and favoring amplifying signals.

Maintenance of a highly specialised phenotype is essential for 370
 beta-cell function [34]. *Foxa2*, *PDX-1*, and *HNF4 α* constitute an 371
 important part of the beta-cell transcriptional networks essential for 372
 the expression of genes involved in insulin synthesis and secretion, as 373
 well as in maintenance and proliferation of the beta cell (reviewed in 374
 Ref. [44]). Low expression of these factors occurs in beta-cell failure 375
 during the progression toward diabetes [34]. In view of the fact that 376
 biotin increased the expression of these transcription factors, the data 377
 suggest that biotin supplementation may render beta cells more 378
 capable to cope with increased insulin demands. It is important to 379
 mention that biotin had no effect on transcription factors whose 380
 altered expression has been associated with glucotoxicity and beta- 381
 cell failure, such as decreases in *PPAR α* [34,45] and increases in 382
PPAR γ [34,45] and *SREBP1c* [46]. 383

384 Consistently with the increasing effect of biotin on insulin
 385 secretion and the expression of genes that participate in insulin
 386 secretion, our studies revealed that the AUC of glucose tolerance test
 387 was decreased in response to the biotin-supplemented diet. 388

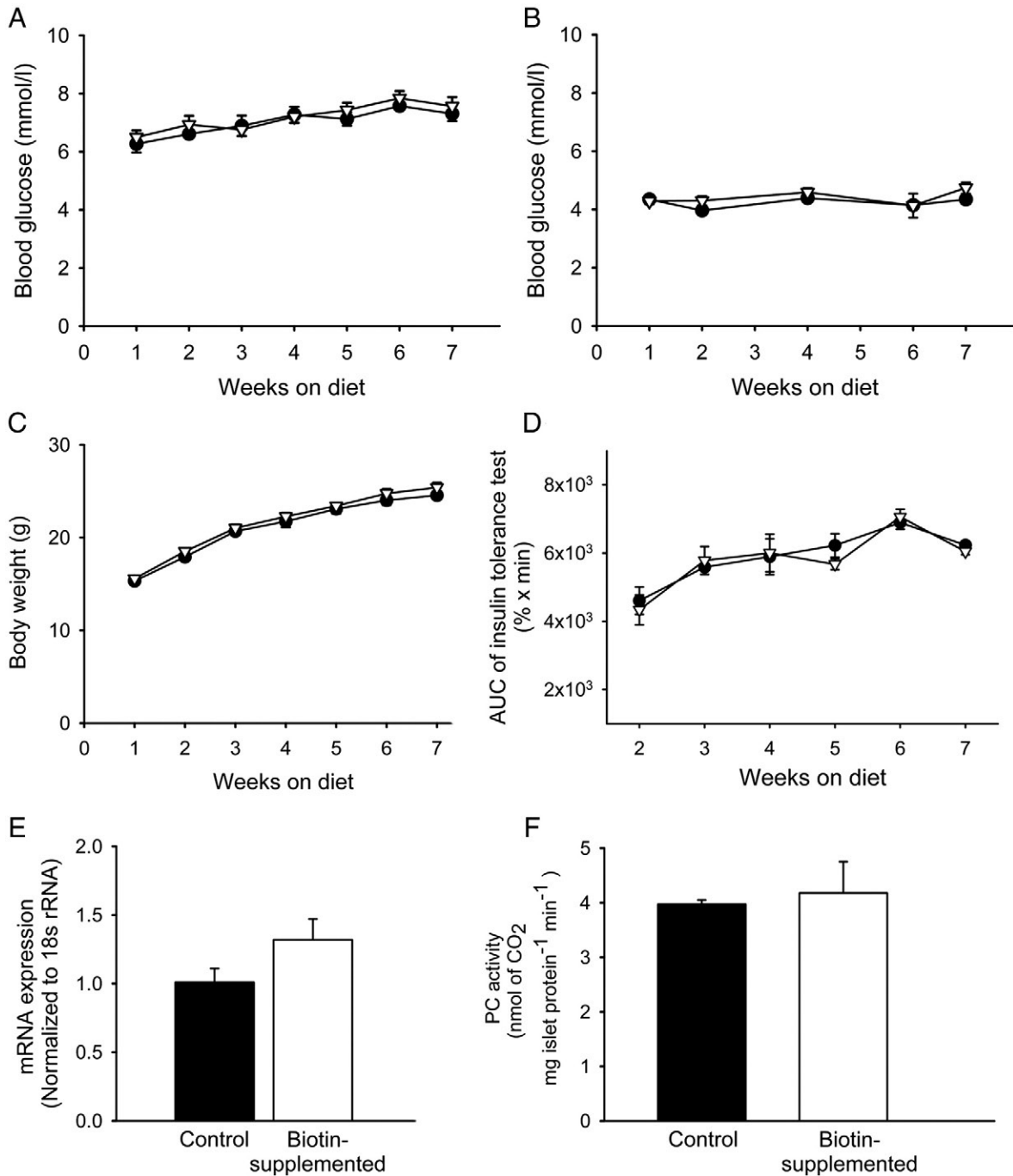


Fig. 6. Biotin supplementation does not modify blood glucose levels, body weight, insulin tolerance, pyruvate carboxylase gene expression or pyruvate carboxylase activity. Fed (A) and fasted (B) blood glucose, body weight (C) and insulin tolerance AUC (D) were monitored throughout the whole period of control (black circles) and biotin-supplemented (white triangles) diet administration. $n=7-11$ mice in each group for body weight and glucose levels; $n=4-8$ mice in each group for insulin tolerance tests. (E) mRNA expression of pyruvate carboxylase was determined for control (black) and biotin-supplemented (white) islets. Data are mean \pm S.E.M. $n=6-8$ pools of 200 islets per group. (F) Islet pyruvate carboxylase enzymatic activity in control (black) and biotin-supplemented (white) mice. Values are mean \pm S.E.M. $n=5$ pools of 100 islets per group.

388 Notwithstanding with these effects, fasting and fed serum insulin
 389 levels were unchanged. Indeed, in spite of the present results and a
 390 large body of evidence from *in vitro* studies [17–20] that have clearly
 391 demonstrated that biotin can potentiate glucose-stimulated insulin
 392 secretion, no study had been able to demonstrate increased serum
 393 insulin levels in response to biotin supplementation [27,30,31]. By
 394 analyzing insulin secretion after a glucose challenge, we unveiled that
 395 biotin supplementation induced a considerable increase in serum
 396 insulin concentrations. These results demonstrate for the first time

that, in fact, biotin supplementation is able to increase blood insulin 397
 levels *in vivo*. 398

Studies in KK mice, a diabetic model of moderate hyperglycemia 399
 and insulin resistance, have found that biotin supplementation with 2 400
 or 4 mg of biotin/kg of body weight increases insulin tolerance [30]. 401
 Contrary to these results, we found that biotin supplementation 402
 improves glucose tolerance by increasing insulin secretion rather 403
 than improving insulin sensitivity. The reasons for this discrepancy 404
 may underlie in the use of a model with genetic susceptibility to 405

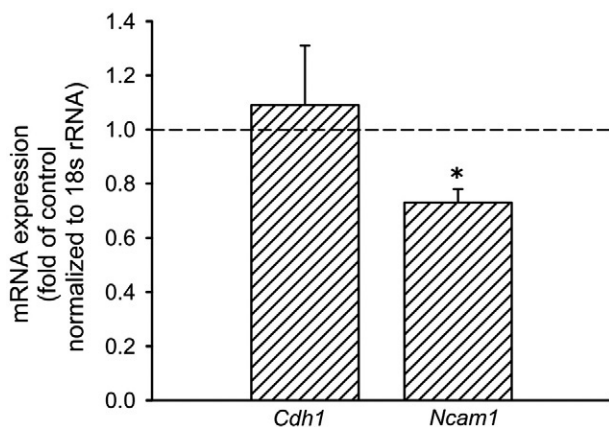


Fig. 7. Biotin supplementation modifies *Ncam1* and does not change *Cdh1* gene expression. mRNA expression of adhesion molecules for control and biotin-supplemented islets. Results are presented as fold change relative to control values (dashed line). Data are mean \pm S.E.M. * $P \leq .05$ compared with basal expression. $n = 5-6$ pools of 200 islets per group.

develop insulin resistance and diabetes [30] vs. our model with normal insulin sensitivity.

Positive effects of biotin were also observed on the beta-cell relative volume. The morphologic analysis in the present study shows that, besides enhancing beta-cell function, biotin supplementation in the diet notably increases the proportion of beta cells. This increment is likely due to augmented islet size since no changes in islet number or composition were found. Particularly, biotin increased the proportion of large islets ($> 10,000 \mu\text{m}^2$). There is evidence indicating that islets of different sizes are heterogenic in their function and properties [47]. Whether the selective size increase may indicate that some islets are more sensitive to biotin supplementation than others is an interesting question that will require further studies.

Beta-cell proportion is regulated during adulthood by an equilibrium between proliferation and apoptosis [48]. Biotin supplementation has shown to increase proliferation in choriocarcinoma cells [49] and to decrease apoptosis in retinal cells [50]; however, the mechanisms by which biotin exerts these effects are, at present, unknown. The finding that biotin supplementation increases *Pdx1* and *Glucokinase* expression, along with our previous observation indicating that biotin increases autocrine insulin action [19], mechanisms known to participate in the maintenance and proliferation of beta cells [25,51] and antiapoptotic actions [52], suggests that these mechanisms may account for the effects of biotin on beta-cell proportion. Because beta-cell turnover is low in the adult stage [53–55], biotin supplementation might have caused the increase in islet size during an earlier age, where changes in islet maturation [56] and cell proliferation [55] are more likely to occur. Current studies in our laboratory are determining this issue. Also, we are determining the implications of increased alpha-cell proportion.

Surprisingly, the studies revealed that biotin supplementation modified islet architecture. An increase in insulin secretion, together with an increase in beta-cell proportion and islet architecture modification, occurs physiologically in models with increased metabolic demand, such as pregnancy, obesity and insulin resistance states [37]. In addition, a recent study has shown that low islet pyruvate carboxylase activity in diabetic mice models is associated with islet morphologic changes and increased proportion of beta cells [38]. However, none of these effects appear to be involved in the islet architectural modification produced by biotin supplementation since no changes in body weight, blood glucose levels or insulin resistance were found at any point during the 8 weeks of experimentation. Also, no changes in pyruvate carboxylase activity or mRNA expression

were found. These results support multiple studies suggesting that the effects of biotin supplementation on systemic processes are independent from its role covalently bound coenzyme of carboxylases (reviewed in Refs. [9] and [57]).

The changes produced by biotin supplementation on islet architecture might be related to decreased expression of *Ncam1*, an adhesion molecule whose ablation causes alterations in islet architecture, rendering high percentages of islets with alpha cells at the core of the islet [39], as observed in our present investigation. The lower *Ncam1* mRNA expression could account for this modification seen in biotin-supplemented islets since a moderate decrease in *Ncam1* expression such as 50% may generate a substantial increase in the percentage of islets with altered architecture [39]; however, in contrast with the detrimental effect of *Ncam1* ablation on glucose tolerance and insulin secretion [39], biotin supplementation does not appear to produce these unfavorable effects.

The evidence provided in the present report on the effects of biotin supplementation on beta-cell function and mass, together with previous reports of its hypotriglyceridemic effects [58,59], suggests that biotin may be used alone or in combination with other novel therapeutic agents proposed for glycemic control that have shown poor durability and undesirable secondary effects in humans, such as glucokinase activators [60]. However, potential concerns may exist regarding detrimental effects of long-term biotin supplementation on pancreatic islets and the increase in beta- and alpha-cell proportion. It has been acknowledged that pharmacological doses of biotin are harmless [61]. Administration of biotin in a range between 20 and 200 mg/day in patients is used in the treatment of inborn errors of biotin metabolism without reported harmful effects [62]. Regarding glucose homeostasis, studies in diabetic patients found that the fasting blood glucose concentrations attained with 2 months on biotin treatment remained within a constant range over an extended period of 48 months of biotin treatment [27]. In addition, clinical aggravation and undesirable side effects were not observed in that study. Toxicity studies have found that biotin is not mutagenic and is genotoxic only at concentrations fourfold to fivefold higher than the serum biotin attained with pharmacological concentrations of biotin [61]. Although scientific literature supports the safety of pharmacological concentrations of biotin, further studies will be required to ascertain the effects of long-term biotin supplementation on beta- and alpha-cell mass vis-à-vis to establish the use of biotin as a therapeutic strategy.

In conclusion, our data demonstrate that biotin supplementation produces *in vivo* changes in the pancreatic islets that increase insulin secretion, islet gene expression, islet cell relative volume and glucose tolerance, attributes that are known to decrease during the progression to diabetes [34,48]. Altogether, our results indicate that vitamin could preserve beta-cell proportions and maintain beta-cell function, a major strategy in the fight against diabetes.

Supplementary materials related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.03.020>.

Acknowledgments

The authors are grateful to German's Lab staff, Alberto Rojas-Ochoa, Lilian Esparza-Rosales and Maura Flores-Aguilar for technical assistance; Gerold Grodsky for valuable discussions throughout these studies; and Silvestre Frenk for critical reading of the manuscript.

References

- [1] Rodriguez Melendez R. Importance of water-soluble vitamins as regulatory factors of genetic expression. *Rev Invest Clin* 2002;54:77–83.
- [2] Carlberg C. Lipid soluble vitamins in gene regulation. *Biofactors* 1999;10:91–7.
- [3] Mangelsdorf DJ, Evans RM. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 1995;83:841–50.

- 511 [4] Passage E, Norreel JC, Noack-Fraissignes P, Sanguedolce V, Pizant J, Thirion X, et al.
512 Ascorbic acid treatment corrects the phenotype of a mouse model of Charcot-
513 Marie-Tooth disease. *Nat Med* 2004;10:396–401.
- 514 [5] Hinds TS, West WL, Knight EM. Carotenoids and retinoids: a review of research,
515 clinical, and public health applications. *J Clin Pharmacol* 1997;37:551–8.
- 516 [6] Vosper H. Niacin: a re-emerging pharmaceutical for the treatment of dyslipidaemia.
517 *Br J Pharmacol* 2009;158:429–41.
- 518 [7] Liu YL, Sennitt MV, Hislop DC, Crombie DL, Heyman RA, Cawthorne MA. Retinoid X
519 receptor agonists have anti-obesity effects and improve insulin sensitivity in
520 Zucker fa/fa rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000;24:997–1004.
- 521 [8] Albarracín C, Fuqua B, Geohas J, Finch M, Komorowski J. Improvement in glycemic
522 control, lipids and insulin sensitivity with the combination of chromium
523 picolinate and biotin in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2005;54:A428.
- 524 [9] Rodriguez-Melendez R, Zempleni J. Regulation of gene expression by biotin
525 (review). *J Nutr Biochem* 2003;14:680–90.
- 526 [10] Fernandez Mejia C, Lazo De La Vega-Monroy ML. Biological effects of pharma-
527 cological concentrations of biotin. *JEBCAM* 2011;16:40–8.
- 528 [11] Wiedmann S, Rodriguez-Melendez R, Ortega-Cuellar D, Zempleni J. Clusters of
529 biotin-responsive genes in human peripheral blood mononuclear cells. *J Nutr*
530 *Biochem* 2004;15:433–9.
- 531 [12] Rodriguez-Melendez R, Griffin JB, Sarath G, Zempleni J. High-throughput
532 immunoblotting identifies biotin-dependent signaling proteins in HepG2 hepa-
533 tocarcinoma cells. *J Nutr* 2005;135:1659–66.
- 534 [13] Chauhan J, Dakshinamurti K. Transcriptional regulation of the glucokinase gene by
535 biotin in starved rats. *J Biol Chem* 1991;266:10035–8.
- 536 [14] De La Vega LA, Stockert RJ. Regulation of the insulin and asialoglycoprotein
537 receptors via cGMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol Cell Physiol*
538 *2000;279:C2037–42.*
- 539 [15] Dakshinamurti K, Li W. Transcriptional regulation of liver phosphoenolpyruvate
540 carboxykinase by biotin in diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 1994;132:127–32.
- 541 [16] Sugita Y, Shirakawa H, Sugimoto R, Furukawa Y, Komai M. Effect of biotin
542 treatment on hepatic gene expression in streptozotocin-induced diabetic rats.
543 *Biosci Biotechnol Biochem* 2008;72:1290–8.
- 544 [17] Sone H, Ito M, Shimizu M, Sasaki Y, Komai M, Furukawa Y. Characteristics of the
545 biotin enhancement of glucose-induced insulin release in pancreatic islets of the
546 rat. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000;64:550–4.
- 547 [18] Sone H, Ito M, Sugiyama K, Ohneda M, Maebashi M, Furukawa Y. Biotin enhances
548 glucose-stimulated insulin secretion in the isolated perfused pancreas of the rat.
549 *J Nutr Biochem* 1999;10:237–43.
- 550 [19] Vilches-Flores A, Tovar AR, Marin-Hernandez A, Rojas-Ochoa A, Fernandez-Mejia
551 C. Biotin increases glucokinase expression via soluble guanylate cyclase/protein
552 kinase G, adenosine triphosphate production and autocrine action of insulin in
553 pancreatic rat islets. *J Nutr Biochem* 2009.
- 554 [20] Romero-Navarro G, Cabrera-Valladares G, German MS, Matschinsky FM,
555 Velazquez A, Wang J, et al. Biotin regulation of pancreatic glucokinase and
556 insulin in primary cultured rat islets and in biotin-deficient rats. *Endocrinology*
557 *1999;140:4595–600.*
- 558 [21] Borboni P, Magnaterra R, Rabini RA, Staffolani R, Porzio O, Sesti G, et al. Effect of
559 biotin on glucokinase activity, mRNA expression and insulin release in cultured
560 beta-cells. *Acta Diabetol* 1996;33:154–8.
- 561 [22] Yoshikawa H, Tajiri Y, Sako Y, Hashimoto T, Umeda F, Nawata H. Effects of biotin
562 on glucotoxicity or lipotoxicity in rat pancreatic islets. *Metabolism* 2002;51:
563 163–8.
- 564 [23] Babu DA, Deering TG, Mirmira RG. A feat of metabolic proportions: Pdx1
565 orchestrates islet development and function in the maintenance of glucose
566 homeostasis. *Mol Genet Metab* 2007;92:43–55.
- 567 [24] Matschinsky FM. Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired
568 by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes* 1996;45:223–41.
- 569 [25] Porat S, Weinberg-Corem N, Tormovsky-Babaey S, Schyr-Ben-Haroush R, Hija A,
570 Stolovich-Rain M, et al. Control of pancreatic beta cell regeneration by glucose
571 metabolism. *Cell Metab* 2011;13:440–9.
- 572 [26] Coggeshall JC, Hegggers JP, Robson MC, Baker H. Biotin status and plasma glucose in
573 diabetics. *Ann N Y Acad Sci* 1985;447:389–92.
- 574 [27] Maebashi M, Makino Y, Furukawa Y, Ohinata K, Kimura S, Sato T. Therapeutic
575 evaluation of the effect of biotin on hyperglycemia in patients with non-insulin
576 dependent diabetes mellitus. *J Clin Biochem Nutr* 1993;14:211–8.
- 577 [28] Koutsikos D, Fourtounas C, Kapetanaki A, Agroyannis B, Tzanatos H, Rammos G,
578 et al. Oral glucose tolerance test after high-dose i.v. biotin administration in
579 normoglycemic hemodialysis patients. *Ren Fail* 1996;18:131–7.
- 580 [29] Baez-Saldana A, Zendejas-Ruiz I, Revilla-Monsalve C, Islas-Andrade S, Cardenas A,
581 Rojas-Ochoa A, et al. Effects of biotin on pyruvate carboxylase, acetyl-CoA
582 carboxylase, propionyl-CoA carboxylase, and markers for glucose and lipid
583 homeostasis in type 2 diabetic patients and nondiabetic subjects. *Am J Clin Nutr*
584 *2004;79:238–43.*
- 585 [30] Reddi A, DeAngelis B, Frank O, Lasker N, Baker H. Biotin supplementation
586 improves glucose and insulin tolerances in genetically diabetic KK mice. *Life Sci*
587 *1988;42:1323–30.*
- 588 [31] Zhang H, Osada K, Maebashi M, Ito M, Komai M, Furukawa Y. A high biotin diet
589 improves the impaired glucose tolerance of long-term spontaneously hyperglycemic
590 rats with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Nutr Sci Vitaminol*
591 *(Tokyo)* 1996;42:517–26.
- 592 [32] Singer GM, Geohas J. The effect of chromium picolinate and biotin supplementa-
593 tion on glycemic control in poorly controlled patients with type 2 diabetes
594 mellitus: a placebo-controlled, double-blinded, randomized trial. *Diabetes*
595 *Technol Ther* 2006;8:636–43.
- [33] Standing committee on the scientific evaluation of dietary reference intakes and its
596 panel on folate, OBV, and choline and subcommittee on upper reference levels of
597 nutrients. DRI dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B₆,
598 folate, vitamin B₁₂, pantothenic acid, biotin, and choline. In: press NA, editor.
599 Washington, D.C.: Food and Nutrition Board, Institute of Medicine; 1998. p. 374–89.
600
- [34] Weir GC, Laybutt DR, Kaneto H, Bonner-Weir S, Sharma A. Beta-cell adaptation and
601 decompensation during the progression of diabetes. *Diabetes* 2001;50(Suppl. 1):
602 S154–9.
- [35] Baez-Saldana A, Ortega E. Biotin deficiency blocks thymocyte maturation,
604 accelerates thymus involution, and decreases nose-rump length in mice. *J Nutr*
605 *2004;134:1970–7.*
- [36] Larrieta E, de la Vega-Monroy ML, Vital P, Aguilera A, German MS, El Hafidi M,
607 et al. Effects of biotin deficiency on pancreatic islet morphology, insulin sensitivity
608 and glucose homeostasis. *J Nutr Biochem* 2011.
- [37] Kim A, Miller K, Jo J, Kilimnik G, Wojcik P, Hara M. Islet architecture: a comparative
610 study. *Islets* 2009;1:129–36.
- [38] Han J, Liu YQ. Reduction of islet pyruvate carboxylase activity might be related to
612 the development of type 2 diabetes mellitus in Agouti-K mice. *J Endocrinol*
613 *2010;204:143–52.*
- [39] Esni F, Taljedal IB, Perl AK, Cremer H, Christofori G, Semb H. Neural cell adhesion
615 molecule (N-CAM) is required for cell type segregation and normal ultrastructure
616 in pancreatic islets. *J Cell Biol* 1999;144:325–37.
- [40] Dahl U, Sjodin A, Semb H. Cadherins regulate aggregation of pancreatic beta-cells
618 in vivo. *Development* 1996;2895–902.
- [41] Matschinsky FM. Assessing the potential of glucokinase activators in diabetes
620 therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2009;8:399–416.
- [42] Hiriart M, Aguilar-Bryan L. Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic
622 beta-cell. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008;295:E1298–306.
- [43] Jitrapakdee S, Wuttithathapornchai A, Wallace JC, MacDonald MJ. Regulation of
624 insulin secretion: role of mitochondrial signalling. *Diabetologia* 2010;53:1019–32.
- [44] Lazo-de-la-Vega-Monroy ML, Fernandez-Mejia C. Transcription factors in the
626 adult beta cell. *Rev Invest Clin* 2009;61:428–46.
- [45] Ravnskjaer K, Boergesen M, Rubi B, Larsen JK, Nielsen T, Fridriksson J, et al.
628 Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) potentiates,
629 whereas PPARgamma attenuates, glucose-stimulated insulin secretion in pan-
630 creatic beta-cells. *Endocrinology* 2005;146:3266–76.
- [46] Wang H, Kouri G, Wollheim CB. ER stress and SREBP-1 activation are implicated in
632 beta-cell glucolipotoxicity. *J Cell Sci* 2005;118:3905–15.
- [47] Aizawa T, Kaneko T, Yamauchi K, Yajima H, Nishizawa T, Yada T, et al. Size-related
634 and size-unrelated functional heterogeneity among pancreatic islets. *Life Sci*
635 *2001;69:2627–39.*
- [48] Ackermann AM, Gannon M. Molecular regulation of pancreatic beta-cell mass
637 development, maintenance, and expansion. *J Mol Endocrinol* 2007;38:193–206.
- [49] Crisp SE, Griffin JB, White BR, Toombs CF, Camporeale G, Said HM, et al. Biotin
639 supply affects rates of cell proliferation, biotinylation of carboxylases and
640 histones, and expression of the gene encoding the sodium-dependent multivita-
641 min transporter in JAr choriocarcinoma cells. *Eur J Nutr* 2004;43:23–31.
- [50] Valenciano AI, Mayordomo R, de La Rosa EJ, Hallbook F. Biotin decreases retinal
643 apoptosis and induces eye malformations in the early chick embryo. *Neuroreport*
644 *2002;13:297–9.*
- [51] Holland AM, Gonez LJ, Naselli G, Macdonald RJ, Harrison LC. Conditional
646 expression demonstrates the role of the homeodomain transcription factor
647 Pdx1 in maintenance and regeneration of beta-cells in the adult pancreas.
648 *Diabetes* 2005;54:2586–95.
- [52] Johnson JD, Bernal-Mizrachi E, Alejandro EU, Han Z, Kalynyak TB, Li H, et al. Insulin
650 protects islets from apoptosis via Pdx1 and specific changes in the human islet
651 proteome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:19575–80.
- [53] Teta M, Long SY, Wartschow LM, Rankin MM, Kushner JA. Very slow turnover of
653 beta-cells in aged adult mice. *Diabetes* 2005;54:2557–67.
- [54] Perl S, Kushner JA, Buchholz BA, Meeker AK, Stein GM, Hsieh M, et al. Significant
655 human beta-cell turnover is limited to the first three decades of life as determined
656 in vivo thymidine analog incorporation and radiocarbon dating. *J Clin*
657 *Endocrinol Metab* 2010;95:E234–9.
- [55] Finegood DT, Scaglia L, Bonner-Weir S. Dynamics of beta-cell mass in the growing rat
659 pancreas. Estimation with a simple mathematical model. *Diabetes* 1995;44:249–56.
- [56] Aguayo-Mazzucato C, Sanchez-Soto C, Godinez-Puig V, Gutierrez-Ospina G,
661 Hiriart M. Restructuring of pancreatic islets and insulin secretion in a postnatal
662 critical window. *PLoS One* 2006;1:e35.
- [57] Dakshinamurti K. Biotin – a regulator of gene expression. *J Nutr Biochem*
664 *2005;16:419–23.*
- [58] Larrieta E, Velasco F, Vital P, Lopez-Aceves T, Lazo-de-la-Vega-Monroy ML, Rojas
666 A, et al. Pharmacological concentrations of biotin reduce serum triglycerides and
667 the expression of lipogenic genes. *Eur J Pharmacol* 2010;644:263–8.
- [59] Revilla-Monsalve C, Zendejas-Ruiz I, Islas-Andrade S, Baez-Saldana A, Palomino-
669 Garibay MA, Hernandez-Quiroz PM, et al. Biotin supplementation reduces plasma
670 triacylglycerol and VLDL in type 2 diabetic patients and in nondiabetic subjects
671 with hypertriglyceridemia. *Biomed Pharmacother* 2006;60:182–5.
- [60] Meininger GE, Scott R, Alba M, Shentu Y, Luo E, Amin H, et al. Effects of MK-0941, a
673 novel glucokinase activator, on glycemic control in insulin-treated patients with
674 type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2011;34:2560–6.
- [61] Fiume MZ. Final report on the safety assessment of biotin. *Int J Toxicol*
676 *2001;20(Suppl. 4):1–12.*
- [62] Mock DM. Biotin. In: Shils ME, Shike M, Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, editors.
678 *Modern nutrition in health and disease*. 10th ed. Baltimore, MD, USA: Lippincott
679 Williams & Wilkins; 2006. p. 498–506.
- 680



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejphar

Endocrine Pharmacology

Pharmacological concentrations of biotin reduce serum triglycerides and the expression of lipogenic genes

Elena Larrieta^a, Fidel Velasco^a, Paz Vital^a, Teresita López-Aceves^b, María Luisa Lazo-de-la-Vega-Monroy^a, Alberto Rojas^a, Cristina Fernandez-Mejia^{a,*}^a Unidad de Genética de la Nutrición, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México/Instituto Nacional de Pediatría, Av. del Iman#1, 4th floor, CP 04530, Mexico City, Mexico^b Facultad de Química, Universidad Autónoma de Sinaloa, Ciudad Universitaria, C.P. 80000, Culiacán de Rosales, Sinaloa, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 January 2010

Received in revised form 29 June 2010

Accepted 11 July 2010

Available online 23 July 2010

Keywords:

Biotin supplementation

Triglyceride

Lipogenesis

ABSTRACT

Besides its role as a coenzyme prosthetic group, biotin regulates gene expression and has a wide repertoire of effects on systemic processes. Several studies have shown that pharmacological concentrations of biotin reduce hypertriglyceridemia. The molecular mechanisms by which pharmacological concentrations of biotin affect lipid metabolism are largely unknown. The present study analyzed the effects of pharmacological doses of biotin on triglyceridemia, insulin sensitivity and on mRNA expression of various lipogenic genes. Three-week-old male BALB/cAnN Hsd mice were fed a biotin-control or a biotin-supplemented diet (1.76 or 97.7 mg of free biotin/kg diet, respectively) over a period of eight weeks. Serum triglyceride concentrations, insulin and glucose tolerance and mRNA abundance of various lipogenic genes were investigated. The biotin-supplemented group showed 35% less serum triglycerides than control mice. In the liver, we found a significant ($P < 0.05$) reduction of mRNA levels of SREBP1-c, glucose transporter-2, phosphofructokinase-1, pyruvate kinase, acetyl-CoA carboxylase and fatty acid synthase, while glucose-6-phosphate dehydrogenase expression increased. No changes in glucokinase, stearoyl-CoA desaturase-1, FoxO1 or PPAR-gamma expression were observed. In adipose tissue, we found a decreased expression of SREBP1c, glucose-6-phosphate dehydrogenase, acetyl-CoA carboxylase, fatty acid synthase, stearoyl-CoA desaturase-1, phosphofructokinase-1 and PPAR-gamma, but no changes in FoxO1 expression. Moreover, the group fed a biotin-supplemented diet showed a significant decrease in adipose tissue weight. No differences in insulin sensitivity or serum insulin concentrations were observed between groups. Our results indicate that pharmacological concentrations of biotin decrease serum triglyceride concentrations and lipogenic gene expression in liver and adipose tissues.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Hypertriglyceridemia is a component of the metabolic syndrome, a common and important risk factor for cardiovascular disease and progression to type-2 diabetes mellitus (Ruderman and Shulman, 2006). The epidemic proportions of these illnesses make the development of new therapeutic agents for their prevention and control urgent.

Biotin is a water-soluble vitamin that acts as a prosthetic group of coenzymes. Unrelated to this role, biotin also regulates gene expression (Rodríguez-Melendez and Zemleni, 2003; Zemleni 2005) and has a wide repertoire of effects on systemic processes such as development (Watanabe, 1996), immunity (Báez-Saldaña et al., 1998; Báez-Saldaña and Ortega, 2004), growth (Báez-Saldaña et al.,

2009a,b), reproduction (Báez-Saldaña et al., 2009a,b), and metabolism (Dakshinamurti, 2005; Fernandez-Mejia, 2005). DNA microarray studies in HepG2 cells and in peripheral blood mononuclear cells have aided in the identification of thousands of genes affected by pharmacological concentrations of biotin (Rodríguez-Melendez et al., 2006; Wiedmann et al., 2004). Furthermore, the naturally occurring biotin analogue, bisnorbiotin, also possesses biotin-like activities regarding gene expression (Rodríguez-Melendez et al., 2006).

Several studies have shown that pharmacological doses of biotin reduce hyperlipidemia. In healthy volunteers, 0.9 mg/day of biotin supplementation affected plasma lipid concentrations (Marshall et al., 1980), while in patients with hyperlipidemia, Dokusova and Krivoruchenko (1972) found that the administration of 5 mg of daily biotin for 4 weeks decreased hypercholesterolemia. Studies in our laboratory (Revilla-Monsalve et al., 2006) revealed that 15 mg biotin for 28 days decreased serum triglyceride and VLDL concentrations, but not total cholesterol, in type 2 diabetic patients or in non-diabetic subjects with hypertriglyceridemia. Commercially available drugs containing

* Corresponding author. Tel.: +52 55 5606 35 58; fax: +52 55 56063489.

E-mail address: crisfern@biomedicas.unam.mx (C. Fernandez-Mejia).



Effects of biotin deficiency on pancreatic islet morphology, insulin sensitivity and glucose homeostasis[☆]

Elena Larrieta^a, Maria Luisa Lazo de la Vega-Monroy^a, Paz Vital^a, Asdrubal Aguilera^{a,b}, Michael S. German^c, Mohammed El Hafidi^d, Cristina Fernandez-Mejia^{a,*}

^aUnidad de Genética de la Nutrición, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México/Instituto Nacional de Pediatría, Mexico

^bUniversidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Mexico

^cCenter of Regeneration Medicine and Stem Cell Research, University of California, San Francisco, CA, USA

^dDepartamento de Biomedicina Cardiovascular, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Mexico

Received 12 January 2010; received in revised form 4 September 2010; accepted 6 January 2011

Abstract

Several studies have revealed that physiological concentrations of biotin are required for the normal expression of critical carbohydrate metabolism genes and for glucose homeostasis. However, the different experimental models used in these studies make it difficult to integrate the effects of biotin deficiency on glucose metabolism. To further investigate the effects of biotin deficiency on glucose metabolism, we presently analyzed the effect of biotin deprivation on glucose homeostasis and on pancreatic islet morphology. Three-week-old male BALB/cAnN Hsd mice were fed a biotin-deficient or a biotin-control diet (0 or 7.2 μmol of free biotin/kg diet, respectively) over a period of 8 weeks. We found that biotin deprivation caused reduced concentrations of blood glucose and serum insulin concentrations, but increased plasma glucagon levels. Biotin-deficient mice also presented impaired glucose and insulin tolerance tests, indicating defects in insulin sensitivity. Altered insulin signaling was linked to a decrease in phosphorylated Akt/PKB but induced no change in insulin receptor abundance. Islet morphology studies revealed disruption of islet architecture due to biotin deficiency, and an increase in the number of α-cells in the islet core. Morphometric analyses found increased islet size, number of islets and glucagon-positive area, but a decreased insulin-positive area, in the biotin-deficient group. Glucagon secretion and gene expression increased in islets isolated from biotin-deficient mice. Our results suggest that biotin deficiency promotes hyperglycemic mechanisms such as increased glucagon concentration and decreased insulin secretion and sensitivity to compensate for reduced blood glucose concentrations. Variations in glucose homeostasis may participate in the changes observed in pancreatic islets.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Biotin deficiency; Glucose homeostasis; Islet; Glucagon

1. Introduction

Biotin is a water-soluble vitamin that acts as a prosthetic group in carboxylases, which catalyze steps along various biochemical pathways. Unrelated to this role, several lines of evidence indicate that biotin also regulates gene expression and has a wide repertoire of effects on systemic processes [1–3].

Pioneer studies in biotin-deficient rats led to the discovery of the influence of biotin requirements on gene expression. Since then, biotin deficiency has been a useful tool to unravel the role of biotin deficiency on gene expression and biological functions, such as growth [4–6], immunity [5,7] and reproduction [8,9], as well as its role in carboxylase gene expression [10,11]. In cultured cells, biotin deficiency experiments have shed light on the biotin-signaling pathway [12–18]. The far-reaching effects of biotin deficiency on gene expression have been examined by microarray analysis, which has revealed that thousands of genes are modified in response to this deficiency [19].

Several studies have shown that adequate biotin intake is required to maintain normal glucose metabolism [20–25]. Pioneer studies by Dakshinamurti et al. [20] reported that glucose tolerance test curves of biotin-deficient rats were significantly higher than the curves of nondeficient rats. They further demonstrated that this effect was the result of a reduction in hepatic glucokinase activity [21], a critical enzyme in the regulation of glucose uptake in the liver. Later, with the arrival of molecular biology techniques, Chauhan and Dakshinamurti [22]

[☆] Supported by research grants from UCMexus CNO07-87, the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 44266-M, the Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México IN221908. Maria Luisa Lazo de la Vega and Asdrubal Aguilera are recipients of the CONACyT scholarship number CVU/Becario: 217876/207055 and 91634, respectively. Elena Larrieta was a postdoctoral fellow from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México.

* Corresponding author. Mexico City, CP 04530 Mexico. Tel.: +52 55 5606 35 58; fax: +52 55 56063489.

E-mail address: crisfern@biomedicas.unam.mx (C. Fernandez-Mejia).

Bases moleculares de la diabetes tipo 2

M en C Ma. Luisa LAZO DE LA VEGA-MONROY
Dra. Cristina FERNÁNDEZ MEJÍA

LA DIABETES se está posicionando como una de las enfermedades más frecuentes en el mundo. La diabetes es un grupo de enfermedades metabólicas que se caracterizan por hiperglucemia. Existen dos tipos principales de diabetes: tipo 1 y tipo 2. Es esta última cuyo aumento es considerado como epidémico. La diabetes tipo 2 se caracteriza por una acción debilitada de la insulina y/o una secreción deficiente de insulina. Una anomalía temprana de la enfermedad es la resistencia a la insulina, que es un estado en el cual la insulina plasmática es incapaz de ejercer sus efectos biológicos en sus tejidos blanco a concentraciones que son efectivas en los sujetos normales. Esta anomalía lleva a una profunda disminución en la captación de la glucosa y en la síntesis de glucógeno en los tejidos periféricos. También provoca un defecto en la supresión de la producción de glucosa hepática. Igualmente al evitar la acción antilipolítica de la insulina, se favorece la degradación de los triglicéridos en el tejido adiposo y la generación de ácidos grasos libres, los cuales interfieren con las señales del receptor de insulina. Los cambios en la concentración de adipocinas en el suero también son parte de este estado anormal de no respuesta a la insulina. En etapas previas al inicio de la diabetes tipo 2, la resistencia a la insulina tiene como consecuencia una menor entrada de glucosa, y por ende persistencia de concentraciones de glucosa elevadas en sangre, las cuales estimulan la secreción de insulina y

ocasionan hiperinsulinemia. Al inicio, esta hiperinsulinemia es capaz de mantener la respuesta a la insulina a pesar de la resistencia a la misma. El estado diabético se desarrolla cuando la secreción de insulina no puede compensar la resistencia a la misma, y es en esta etapa que la hiperglucemia tanto en ayuno como posprandial se hace aparente. Se han realizado abundantes esfuerzos para comprender las bases moleculares de la diabetes tipo 2. En la actualidad es aceptado que un defecto en la señalización de la insulina a nivel post-receptor, es la principal característica involucrada en la baja respuesta a la insulina en la diabetes tipo 2, como resultado las acciones metabólicas de la insulina se ven afectadas. Varios mecanismos como la desfosforilación de la tirosina del receptor de insulina, el desequilibrio en la fosforilación serina/treonina, o la internalización del receptor de insulina, debilitan la señalización de la insulina. Un número de moléculas asociadas a la resistencia a la insulina como los ácidos grasos libres, la interleucina-6 o TNF-alfa, afectan la señalización a nivel del receptor de insulina. Es interesante que la mayoría de ellos estén relacionados con el tejido adiposo. Los factores transcripcionales como el receptor gamma activado de proliferación de los peroxisomas (PPAR gamma) y el coactivador-1 alfa del receptor gamma activado de proliferación de los peroxisomas (PGC-1 alfa) también se han encontrado asociados a la falta de respuesta a la insulina. La función de la

Bases moleculares de la obesidad

M en C Ma. Luisa LAZO DE LA VEGA-MONROY
Dra. Cristina FERNÁNDEZ-MEJÍA

EL CUERPO HUMANO tiene un requerimiento constante de energía la cual obtiene de los alimentos. Parte de los nutrimentos que ingerimos es usada de inmediato y otra gran parte de ellos se almacenan para ser utilizados posteriormente para la obtención de energía en los períodos de ayuno. El tejido adiposo es el órgano con mayor capacidad para guardar energía, la cual es almacenada en forma de triacilglicéridos. Un exceso en el almacenaje de triacilglicéridos es la causante de la obesidad, uno de los mayores problemas de salud actuales. Este padecimiento es, por su origen, una enfermedad del tejido adiposo. La excesiva expansión del tamaño (hipertrofia) de los adipocitos produce alteraciones en su funcionamiento y es considerada como la principal desencadenante de las alteraciones presentes en la obesidad. Los adipocitos hipertróficos son resistentes a los efectos antilipolíticos de la insulina, lo que resulta en un aumento sostenido de la concentración de los ácidos grasos en la sangre. El incremento en los ácidos grasos aumenta la producción intracelular de compuestos derivados de éstos que producen resistencia a la insulina. Los adipocitos hipertróficos disminuyen la producción de adiponectina, una adipocina que tiene efectos positivos en la sensibilidad a la insulina y la homeostasis de la glucosa. En tanto que el aumento de tamaño de los adipocitos favorece la producción de citocinas que causan resistencia a la insulina, inflamación, aumentan la coagulación y favorecen la infiltración de los macrófagos. En estudios recientes se ha

encontrado que la mayor parte de los macrófagos en el tejido adiposo de los obesos se encuentran rodeando adipocitos hipertróficos muertos, lo que sugiere que la necrosis de éstas células desencadena la infiltración de los macrófagos en el tejido adiposo. Se ha propuesto que el aumento del tamaño de los adipocitos produce menor llegada de sangre a las células adiposas, lo que se traduce en menor aporte de oxígeno, necrosis, infiltración y activación de macrófagos en el tejido adiposo e incremento en la secreción de citocinas pro-inflamatorias, lo que sugiere que las alteraciones en la obesidad podrían estar mediadas por la hipoxia. Por otro lado, a pesar de la gran capacidad del tejido adiposo de expandirse, cuando se excede la capacidad de las células adiposas de almacenar grasa, los triacilglicéridos se trasladan y almacenan en otros órganos como el hígado, músculo, corazón o islotes pancreáticos, exacerbando la resistencia a la insulina. En el hígado, un aumento en los triacilglicéridos intracelulares aunado a un ambiente inflamatorio puede progresar a cirrosis y a fibrosis hepática, enfermedades asociadas a la obesidad.

Introducción

El cuerpo humano tiene un requerimiento constante de energía la cual obtiene de los alimentos. Parte de los nutrimentos que ingerimos son usados de inmediato y otra gran parte de ellos se almacenan para la obtención de energía en los períodos

Glucokinase as a target for the development of novel therapeutics for diabetes

Cristina Fernandez-Mejia Ph.D. & Maria Luisa Lazo de la Vega-Monroy, Ph.D. Candidate

SUMMARY

Diabetes mellitus is taking its place as one of the most important diseases in the world. In the past two decades the disease has experienced an explosive increase, now reaching epidemic proportions. Because of the chronic and ultimately debilitating nature of the illness it represents a tremendous economical, social and personal expense. The epidemic proportions of diabetes make urgent a development of new therapeutic agents for its prevention and control. Glucokinase has come into sight as a promising drug target that might lead to new perspectives in the development of therapeutic agents to fight diabetes. Its location at the first step in glucose metabolism, its presence in critical tissues that regulate glucose homeostasis along with its kinetics characteristics, as well as its nutrient and hormonal regulation confer to this enzyme a particular feature which allows it to regulate blood glucose levels. Cell-specific functions for glucokinase isoenzymes in glucose homeostasis have been demonstrated in transgenic animal models. The role of glucokinase as a glucosensor in the pancreatic beta cell and in the liver is well accepted. In the liver, glucokinase plays an important role in glycogen synthesis, glucose oxidation, and lipogenesis. In the pancreatic beta cell glucokinase, its activity is crucial for glucose induced insulin secretion. Glucokinase is also expressed in neuroendocrine cells and enterocytes; however its role as a glucose sensor in these cells is less well determined. The role of glucokinase as regulator of glucose homeostasis is compellingly demonstrated by the effect that activating and inactivating mutations of this enzyme have on glucose metabolism in humans leading to diseases such as: a) Mature Onset Diabetes of the Young-2 (MODY-2), recently replaced by the descriptive name of Familial Mild Fasting Hyperglycemia, b) Permanent Neonatal Diabetes Mellitus due to Glucokinase Deficiency, or c) Glucokinase-Linked Hypoglycemia. In view of the prominent role of glucokinase in glucose homeostasis, this enzyme has an enormous potential as drug target. Pharmacological activators of glucokinase represents a novel strategy for diabetic therapy. Changes on glucokinase expression and translocation may also lead to improved glucose sensing and hyperglycemia reduction. Active studies on different aspects of glucokinase will open new perspectives to tackle the epidemic proportions of type-2 diabetes.

Beta-Cell Function and Failure in Type 1 Diabetes

Maria-Luisa Lazo de la Vega-Monroy and Cristina Fernandez-Mejia
*Unidad de Genética de la Nutrición, Instituto de Investigaciones Biomédicas,
Universidad Nacional Autónoma de México/ Instituto Nacional de Pediatría,
Mexico City,
Mexico*

1. Introduction

Glucose is an essential energy source for all cells. Therefore, maintaining glucose levels within a normal range is essential for life in vertebrates. Glucose homeostasis in the organism is tightly regulated by insulin, a hormone that acts on the major glucose metabolic tissues such as muscle, liver and adipose tissue. Insulin's main effects include promoting glucose uptake, glycogen synthesis in the liver and muscle, triglyceride formation to be stored in adipocytes, and protein synthesis. Insulin secretion is held by the pancreatic beta-cells, and it is modulated by glucose levels. Insufficient insulin secretion and consequent impairment of insulin's actions lead to Diabetes Mellitus.

Diabetes is a group of metabolic diseases characterized by hyperglycemia, caused by a defect on insulin production, insulin action or both. Type 1 diabetes in particular is due to an autoimmune destruction of the insulin producing pancreatic beta-cell, which usually leads to absolute insulin deficiency (ADA 2009). This type of diabetes accounts for 5-10% of the total cases of diabetes worldwide, and although its onset is commonly during childhood and adolescence, it can occur at any age, even during late adulthood.

As the loss of beta-cells is determinant for the development of overt type 1 diabetes, understanding beta-cell's normal physiology, namely insulin secretion, and how it may be affected during the progression of this disease is essential. Moreover, the development of new therapeutic interventions for type 1 diabetes, such as islet transplantation, beta cell maintenance and replacement, or stem cell therapy, requires a profound knowledge of how the presence of different nutrients and signals may regulate insulin secretion and beta-cell mass.

In this chapter we aim to review the mechanisms involved in normal beta-cell function and beta-cell mass regulation, and how this function may be modulated by glucose, nutrients and signals in the beta-cell milieu. We also review how these mechanisms may be affected by the onset and progression of type 1 diabetes.

2. Normal function of the beta-cell - glucose stimulated insulin secretion

The pancreas is an endocrine and exocrine gland. The exocrine portion corresponds to acinar tissue, responsible for secreting digestive enzymes into the pancreatic juice, while the

ishes the proliferative response of splenocytes to Concanavalin A (11). The mechanisms by which biotin deficiency causes these alterations are still unknown. However, these effects are not directly correlated either in time of appearance or in magnitude with the decrease in the activity of PC and PCC. In the work reported herein, we further investigated the effect of biotin deficiency on immune system homeostasis by studying the effect of chronic biotin deficiency on the thymus, a primary lymphoid organ.

MATERIALS AND METHODS

Mice. The handling of mice at all stages of experimentation was performed in compliance with the standard procedures established by the Ethical Committee for Experimentation with Animals of the Biomedical Research Institute of the National University of Mexico.

Male Balb/cAnN Hsd mice were obtained from the breeding colony of our Institute. Mice were 4 wk old at the beginning of the experiment. They were maintained in barrier conditions with 12-h light:dark cycles, and were allowed to consume water and food ad libitum. Five lots of 50 to 80 mice were each divided into 3 experimental groups (control, sufficient, and deficient) of 15 to 30 mice. Each group was fed 1 of the 3 alternative diets previously described (11,12). Accordingly, 1 group (designated as the control group) was fed a commercial standard diet for experimental rodents (LM-485, Cat. T.7012.15, Harlan Teklad). Mice in the biotin-deficient group were fed a biotin-depleting diet lacking biotin and containing 30% dried egg white as the protein source (TD-01363, Harlan Teklad) (Table 1). Egg white contains avidin, a glycoprotein that binds biotin, forming a noncovalent complex that is not absorbed into the blood (4). The quantity of egg white contained in this diet was shown to reliably produce biotin deficiency in mice and rats (11–15). Finally, the biotin-sufficient group was fed a diet with the same composition as the biotin-depleting diet, but supplemented with 16.4 μmol biotin/kg (TD-01362, Harlan Teklad). This amount of biotin is sufficient to occupy all of the biotin-binding sites on avidin, and still

provide enough biotin to meet the metabolic requirements (11,12,16).

Three to 5 mice from each group were analyzed at the beginning of the experimentation (time 0), and at wk 2, 4, 8, 12, 16, and 20 after initiation of the experiment. Mice were weighed and bled from the axillaries' plexus under diethyl ether anesthesia. The nose-rump length was measured according to Hughes and Tanner (17) with slight modifications. Each mouse was placed over a metallic ruler, with the 4 extremities extended to the respective sides at approximately right angles, and it was measured from the distal point of the nose to the end of the buttocks. After the length of each mouse was determined, they were killed by cervical dislocation, and the liver, spleen, and thymus were obtained. Each organ was weighed, and livers were frozen at -70°C until they were used to measure the enzymatic activity of PCC and PC. Spleens and thymuses were employed for the determinations indicated in the next sections. To determine whether the 3 organs were equally affected by the corporal weight loss induced by the deficiency of biotin (11), we calculated the ratios of the weight of each organ over the respective corporal weight for each mouse.

Cellularity of spleens and thymuses. The spleen and thymus obtained from each mouse killed were gently dispersed to single-cell suspensions in PBS containing 5% FBS (Gibco BRL). An aliquot of each cell suspension was used to determine the number of leukocytes per liter using a Beckman Coulter T890 automatic cell counter. From this point onward, only thymus cell suspensions were used. The thymocyte suspension was treated with hemolyzing solution (18), and flow cytometry was used to determine the percentage of cells expressing different cell-surface antigens in an aliquot of the suspension. The remaining thymocyte suspension was centrifuged at $400 \times g$ for 5 min at 4°C , the supernatant was decanted, and the pelleted cells were stored at -70°C until used for determination of the enzymatic activity of PC and PCC.

Determination of specific activity of PC and PCC in thymocytes. The thymocytes, which had been kept at -70°C , were thawed immediately before the assay. The specific activity of PC and PCC was determined by a radioenzymatic method using $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ as

TABLE 1

Diets

Control diet LM-485	g/kg	Biotin-deficient	g/kg
Protein ¹	199.20	Egg white solids (spray-dried)	300.0
Nitrogen free extract ¹	536.6	Dextrose, monohydrate ²	537.344
Fat ¹	56.7	Corn oil	100.0
Fiber ¹	43.7	Cellulose	20.0
Linoleic acid ¹	29.0	Mineral mix, ⁴ AIN-76 (170915)	35.0
Ash ¹	64.8	Calcium phosphate, dibasic	3.41
Minerals ³	26.468	Vitamin B-12 (0.1% trituration in mannitol)	0.03
Calcium	9.8	Calcium pantothenate	0.066
Biotin	0.00077	Choline dihydrogen citrate	3.497
Cyanocobalamin	0.009	Folic acid	0.002
Pantothenic acid	0.087	Menadione	0.05
Choline	2.23	Niacin	0.099
Folic acid	0.0067	Pyridoxine · HCl	0.022
Menadione	0.0084	Riboflavin	0.022
Niacin	0.1001	Thiamin · HCl	0.022
Pyridoxine · HCl	0.0169	All-trans retinol palmitate (dry vitamin A palmitate 500,000 U/g)	0.04
Riboflavin	0.0137	Cholecalciferol (dry vitamin D-3, 500,000 U/g)	0.004
Thiamin · HCl	0.0953	2-ambo- α -Tocopherol acetate (dry vitamin E Acetate 500 U/g)	0.242
All-trans retinol (vitamin A)	0.059	Color (soluble)	0.15
Cholecalciferol (vitamin D-3)	0.0048		
2-ambo- α -Tocopherol (vitamin E)	0.0229		

¹ Nutrient composition indicated by Harlan Teklad.

² In the biotin-sufficient diet (TD.01362), 0.004 g dextrose/kg was substituted with 0.004 g (16.4 μmol) biotin.

³ Minerals (g/kg): phosphorus: 6.6; sodium: 3.2; chlorine: 5.4; potassium: 8.3; magnesium: 2.5; iron: 0.28411; manganese: 0.09334; zinc: 0.06359; copper: 0.02306; iodine: 0.00261; cobalt: 0.00072; selenium 0.00016.

⁴ Source: Ref. 54.