



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
FACULTAD DE QUÍMICA

EFFECTO DE LA BIOTINA SOBRE LA EXPRESIÓN
DE GENES EN EL ISLOTE PANCREÁTICO A LA
PRIMERA SEMANA POST-ABLACTACIÓN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

WILMA INES TIXI VERDUGO

TUTORA PRINCIPAL: DRA. CRISTINA FERNÁNDEZ MEJÍA
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Comité Tutorial Asesor:

Dra. Marta Alicia Menjivar Iraheta
Laboratorio 202, Facultad de Química, UNAM.

Dra. María Eugenia Gonsebatt
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

MÉXICO, D. F.

DICIEMBRE 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
FACULTAD DE QUÍMICA**

**EFFECTO DE LA BIOTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES EN EL ISLOTE
PANCREÁTICO A LA PRIMERA SEMANA POST-ABLACTACIÓN**

Ciudad Universitaria, México D.F., Noviembre del 2012

Tutor:

Dra. María Cristina Fernández Mejía
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Comité Tutoral Asesor:

Dra. Marta Alicia Menjivar Iraheta
Laboratorio 202, Facultad de Química, UNAM.

Dra. María Eugenia Gonsebatt
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Jurado del Examen de Grado:

PRESIDENTE

Dr. Ignacio Camacho Arroyo
Laboratorio 107, Facultad de Química, UNAM.

VOCAL

Dr. Samuel Canizales Quinteros
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

VOCAL

Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

VOCAL

Dr. Gabriel Gutierrez Ospina
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

SECRETARIO

Dr. Armando Tovar Palacio
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

A mi familia: Papá, Mamá,
hermano y hermana

*Que el camino salga a tu encuentro, que el viento sople siempre a tus espaldas, que el sol brille cálido sobre tu cara, que la lluvia caiga suavemente sobre tus campos y, hasta que volvamos a encontrarnos, que Dios te sostenga en la palma de Su mano. Que vivas por el tiempo que tú quieras y que siempre quieras vivir plenamente. Recuerda siempre olvidar las cosas que te entristecieron. Pero nunca te olvides de recordar las cosas que te alegraron. Recuerda siempre olvidar a los amigos que resultaron falsos. Pero nunca olvides recordar a aquellos que permanecieron contigo. Que siempre tengas palabras cálidas en un anochecer frío, Una luna llena en una noche oscura, Y que el camino siempre se abra a tu puerta. Que vivas cien años,
Con un año extra para arrepentirte!*

AGRADECIMIENTOS

Cuando una meta, un proyecto o un sueño se cumplen, no siempre se le atribuye al trabajo o al esfuerzo que pongamos en realizarlo. Detrás de cada sueño siempre existen personas que nos apoyan y que creen en nosotros, seres que nos animan a seguir adelante brindándonos, su compañía, solidaridad y cariño.

A la Dra. Cristina Fernández Mejía por brindarme el conocimiento y el apoyo necesario para la realización de mi Maestría, por ayudarme a crecer, gracias por su paciencia.

A mi Comité Tutorial Dra. Marta Menjivar Iraheta y la Dra. María Eugenia Gonsebatt, por sus consejos y críticas constructivas durante el desarrollo de mi proyecto de investigación.

A mis colegas y compañeros de laboratorio que más que eso fueron mi segunda familia en México, gracias por cada momento vivido. María Luisa Lazo de la Vega, gracias por todo el apoyo y enseñanzas, sobre todo por el “cariño maternal”. Maura Flores, fueron varios momentos, días y horas compartidas que al final no fueron solo trabajo, fue una amistad. Karen Méndez, el laboratorio no hubiese sido lo mismo sin las dos “pero juntas”. Rafael Ramírez, las pláticas con el “químico” y la compañía fueron de lo mejor. Daniel Boone gracias por estar siempre presto ayudarme, Asdrúbal Aguilera, Ivonne Mora gracias por el conocimiento y la ayuda brindada. Carolina Álvarez, la vida siempre puede ser más divertida, gracias por esos buenos momentos.

A mis amigas, Gabriela Echeverría, Ana Gómez, Carolina Quichimbo, María José Jaramillo, Liliana Becerra y María Gabriela Romero, gracias por todas y cada una de las vivencias compartidas, su compañía, amistad y apoyo fueron esenciales.

Finalmente a mi familia que son la parte más importante y el pilar de mi vida.

A mi papá, persona que más extrañé y el que siempre ha creído en mí.

A mi mamá por todo el cariño que siempre me ha brindado.

A mi hermano por sus consejos y apoyo incondicional

A mi hermana por ser mi amiga y compañera de vida.

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	2
2.1 Biotina	2
2.1.1 Estructura química de la biotina	3
2.1.2 Requerimientos de biotina y deficiencia de biotina	3
2.1.3 Papel de la biotina en las reacciones de carboxilación	5
2.1.4 Biotina sobre la expresión de genes	6
2.1.4.1 Mecanismos moleculares de la biotina sobre la expresión de genes	6
2.1.4.1.1 Activación de la guanilato ciclasa soluble	6
2.1.4.1.2 Biotinilación de histonas	7
2.1.5 Efectos de concentraciones farmacológicas de biotina en funciones Biológicas	7
2.1.6 Biotina en el metabolismo de carbohidratos	7
2.1.7 Efectos de la suplementación con biotina en diabetes	9
2.2 Páncreas	11
2.2.1 Secreción de insulina	13
2.2.3.1 Fosforilación de la glucosa	15
2.2.3.2 Funciones de la glucocinasa en la secreción de insulina	15
2.2.3.3 Canales de calcio en la célula beta	16
2.2.2 Factores transcripcionales que participan en el funcionamiento de la célula beta pancreática.	18
2.2.2.1 Homeobox 1 pancreático y duodenal (Pdx1)	19
2.2.2.2 Forkhead box A2 (Foxa2)	21
2.2.3 Genes involucrados en la arquitectura del islote pancreático	21
2.2.3.1 Moléculas de adhesión Neural 1 (Ncam1)	21
2.2.3.1.1 La expresión de NCAM durante la ontogenia pancreática	23
2.2.3.1.2 NCAM es requerido para las células de los islotes de tipo secretoras	23
2.2.3.2 Actina	24
2.2.3.3 Cadherina	25
2.2.4 Desarrollo postnatal del islote pancreático	29
2.2.4.1 Ventana Crítica postnatal	29
2.2.4.2 Genes y factores transcripcionales en el desarrollo postnatal	29
3 ANTECEDENTES DIRECTOS DE ESE TRABAJO	30
3.1 Efectos de la biotina sobre el islote pancreático en la post-ablactación	31
4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31
5 JUSTIFICACION	31
6 HIPÓTESIS	33
7 OBJETIVO GENERAL	32
7.1 OBJETIVOS PARTICULARES	32

8 METODOLOGÍA	33
8.1. Dietas experimentales	33
8.2. Modelo animal de experimentación	33
8.2.1. Grupos experimentales	34
8.3. Monitoreo del peso de los animales y del consumo de alimento	34
8.4. Ensayos	34
8.4.1. Pruebas de tolerancia a la glucosa	34
8.4.2. Pruebas de tolerancia a la insulina	34
8.4.3. Extracción de islotes	35
8.4.4. Extracción de RNA total de los islotes pancreáticos	35
8.4.5. Obtención del cDNA	35
8.4.6. Ensayos de PCR en tiempo real	36
8.4.6.1 Análisis de la expresión relativa	37
8.5 Análisis estadístico	37
9. RESULTADOS	38
9.1. Monitoreo de peso de los animales control y suplementados	38
9.2. Monitoreo del consumo de alimento control y suplementados	39
9.3. Curva de tolerancia a la glucosa	40
9.4. Curva de tolerancia a la insulina	41
9.5. Expresión de genes en el islote pancreático	43
9.5.1 Expresión de factores transcripcionales y genes relacionados con la secreción de insulina	43
9.5.2. Efectos de la suplementación con biotina sobre la expresión de moléculas de adhesión en la estructura del islote	45
9. DISCUSIÓN	46
10. CONCLUSIONES	49
11. REFERENCIAS	50

INDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICAS:

FIGURAS

Figura 1 Estructura química de la biotina	3
Figura 2 Anatomía del páncreas	12
Figura 3 Secreción de insulina estimulada por glucosa	14
Figura 4 Factores transcripcionales	19
Figura 5 Estructura de NCAM	22
Figura 6 Cadherina lugares de adhesión	26
Figura 7. Cadherina estructura	27

TABLAS

Tabla 1 Composición de la dieta control y suplementada	33
Tabla 2 Genes analizados	37
Tabla 3 Valores de glucosa en sangre (curva de tolerancia a glucosa)	41
Tabla 4 Valores de glucosa en sangre (curva de tolerancia a insulina)	42

GRÁFICAS

Gráfica 1 Curva de crecimiento	38
Gráfica 2 Curva de ingesta de alimento en el grupo control y suplementado	39
Gráfica 3 Curva de tolerancia a la glucosa, grupos control y suplementado	40
Gráfica 4 Curva de tolerancia a la insulina, grupos control y suplementado	42
Gráfica 5 Perfil de expresión de factores transcripcionales que regulan la secreción de insulina, Pdx1 y Foxa2 en respuesta a la suplementación con biotina.	43
Gráfica 6 Perfil de expresión de genes que participan en la secreción de insulina en respuesta a la suplementación con biotina, Ins2, Cacna1d y Gck	44
Gráfica 7 La suplementación con biotina modifica la expresión de genes que codifican para moléculas de adhesión del islote pancreático, Ncam, Act- β y Cadherina.	45

RESUMEN

La biotina es una vitamina hidrosoluble del complejo B que, además de participar como grupo prostético de las carboxilasas en concentraciones farmacológicas es capaz de modificar la expresión genética y diversas funciones biológicas como son la reproducción, el desarrollo y el metabolismo. Estudios previos en el laboratorio encontraron que la administración a partir del destete de una dieta conteniendo concentraciones farmacológicas de biotina durante 8 semanas aumenta la expresión de factores transcripcionales y proteínas que favorecen la secreción de la insulina en respuesta a la glucosa. Estudios en proceso indican que desde la primera semana de ingesta, la dieta suplementada con biotina acelera la maduración del islote produciendo cambios en la secreción de insulina y en la estructura del mismo. En este trabajo abordamos los cambios que se producen en la expresión de genes que participan en la arquitectura y la secreción de la insulina en este periodo. Dado que se conoce poco sobre los eventos moleculares que suceden durante el periodo de post-ablactación, los cambios que produce la biotina servirán para el estudio de los mecanismos moleculares que participan en la maduración del islote.

Ratones BALB/cAnN Hsd machos recién destetados fueron alimentados con una dieta control (0.8 mg/Kg de dieta) o una dieta suplementada con biotina (100 mg/Kg de dieta) durante 7 días. Al finalizar el tratamiento evaluamos la homeostasis de la glucosa a través de curvas de tolerancia a la glucosa e insulina. Se obtuvo el RNA total de los islotes, con el cual se midió la expresión de genes en el islote pancreático por PCR cuantitativo.

La suplementación con biotina produjo una disminución significativa en la expresión de genes estructurales como *Ncam* y *Actina-β*, exceptuando *Cadherina*, cuyo RNAm aumentó. La expresión del RNAm de factores transcripcionales que regulan la expresión y secreción de insulina, *Foxa2* y *Pdx1*, así como el RNAm de los *Canales de calcio* y de la *Insulina*, también se encontró disminuida de manera significativa. Sin embargo, no se encontraron cambios en la expresión de la glucocinasa. El análisis de la homeostasis de la glucosa reveló que la disminución en la expresión de estos RNAm no fue detrimental a la homeostasis de la glucosa ya que los ratones suplementados con biotina mostraron un aumento en la tolerancia a la glucosa. También se observó una mayor sensibilidad a la insulina.

En conclusión, las diferencias encontradas en la expresión de genes entre la primera y la octava semana de administración de la dieta suplementada con biotina sugieren que los efectos de la vitamina no se encuentran limitados al periodo temprano de post-ablactación y que existen otros cambios durante el transcurso de la administración de la dieta.

ABREVIATURAS

ACC	Acetil-CoA carboxilasa
Actb	Beta actina
ADP	Difosfato de adenosina
Akt/PKB	Proteína cinasa B
AMPc	AMP (monofosfato de adenosina) cíclico
ATP	Trifosfato de adenosina
Cacna1d	Subunidad alfa 1D del canal de calcio tipo L dependiente de voltaje.
Cdh1	Cadherina 1 ó E-Cadherina
ES	Error estándar
Foxa2	Forkhead box A 2
FoxO1	Forkhead box O1
Gck	Glucocinasa
GSK3	Cinasa 3 de la sintasa de glucógeno
GLUT	Transportador de glucosa
GMPc	Monofosfato de guanidina cíclico
HCS	Holocarboxilasa sintetasa
Hnf4 α	Hepatocyte Nuclear Factor 4 α
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato
Ins2	Insulina 2
K _{ATP}	Canal de K ⁺ sensible a ATP
MCC	B–metilcrotonil-CoA carboxilasa
MODY	Diabetes del adulto de inicio juvenil
NADPH	Dinucleótido de adenina nicotinamida reducida fosfato
Ncam1	Molécula de adhesion de células neurales 1
NeuroD1	Neurogenic differentiation 1
OLETF	Otsuka Long Evans Tokushima Fatty
PC	Piruvato Carboxilasa
PCC	Propionil-CoA carboxilasa
PDX-1	Pancreatic Duodenum Homeobox 1
PEPCK	Fosfoenol piruvato carboxicinasa
PKG	Proteína cinasa G
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinasa
PPAR γ	Peroxisome proliferator activated receptor gamma
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa reversa
UPE	Elemento promotor rio arriba

1 INTRODUCCION

El conocimiento de la función y de los mecanismos moleculares de las vitaminas ha permitido un avance sustancial en la comprensión de la regulación de diversas funciones biológicas (Carlberg, C. 1999; Christakos, S, et al., 2003). Ha sido a través del estudio de las vitaminas que se ha encontrado que, además de sus efectos clásicos, también poseen otras acciones como la regulación en la expresión de genes. Gracias a la investigación de las acciones de las vitaminas fue que lograron identificar importantes factores transcripcionales (Mangelsdorf, D.J. & Evans, R.M, 1995). De igual manera, la investigación de la acción de las vitaminas ha puesto de manifiesto sus efectos sobre diferentes funciones como el desarrollo embrionario (Clagett-Dame, M. & DeLuca, H.F. 2006; Duester, G 2008), la proliferación (Cheung, F.S.,et al., 2012,) y diferenciación celular (Balmer, J.E. & Blomhoff, R. 2002). El descubrimiento de estas acciones de las vitaminas ha desembocado en el desarrollo de medicamentos que en la actualidad son regularmente usados en el tratamiento de diversas afecciones, en particular de productos derivados de las vitaminas liposolubles A y D (Carlberg, C 2002; Christakos, S, et al., 2003; Hinds, T.S., et al., 1997; Wu-Wong, J.R, et al., 2004). Si bien existen pocos estudios sobre los efectos no clásicos de las vitaminas hidrosolubles, una de estas vitaminas, la niacina o vitamina B3, es usada desde 1955 en concentraciones farmacológicas en el tratamiento de dislipidemias, existiendo en la actualidad amplios conocimientos sobre sus mecanismos de acción, lo que ha desembocado en la generación de diversos fármacos (Lee, J.M. et al. 2009; Menon, R., et al., 2007). También a través de la investigación sobre los efectos de las vitaminas ha sido posible la identificación de nuevas moléculas; así, los estudios sobre los efectos de concentraciones farmacológicas de niacina permitieron la identificación de un receptor acoplado a proteínas G, denominado GPR109A (Tunaru, S. et al., 2003; Wise, A. et al., 2003), que media las acciones de control de los cuerpos cetónicos sobre la lipogénesis.

La biotina es una vitamina del complejo B, que durante mucho tiempo fue poco estudiada debido a los extraños casos de su deficiencia alimentaria. En la década de los 60 surgieron observaciones que sugerían su papel en la expresión de genes (Dakshinamurti, K. & Cheah-Tan, C. 1968). Fue hasta 1990 que se iniciaron estudios que permitieron demostrar que la biotina en concentraciones farmacológicas es capaz de modificar la expresión génica (Chauhan, J. & Dakshinamurti, K 1991) y posee diversos efectos sobre procesos sistémicos como, la reproducción (Pillai, M.K. & Medhukar, B.V 1969; Simmins, P.H. & Brooks, P.H. 1983), el desarrollo embrionario (Watanabe, T. 1996; Valenciano, A.I., et al., 2002), el metabolismo de carbohidratos y de lípidos (revisado en Fernandez-Mejia, C, 2005; Vilches-Flores, A. & Fernandez-Mejia, C 2005). Las

observaciones sobre multiplicidad de efectos que posee esta vitamina en las funciones biológicas, abre nuevos caminos de estudio que se encuentran en etapas aún poco exploradas. De manera análoga a la trayectoria del estudio de otras vitaminas, la investigación de las acciones y de los mecanismos moleculares a través de los cuales la biotina ejerce sus efectos pleiotrópicos permitirán el avance en el conocimiento de la participación de la vitamina, o metabolitos derivadas de ella, en los procesos sistémicos permitiendo de esta manera la ampliación del conocimiento científico y la posibilidad de desarrollar estrategias terapéuticas a partir de ésta.

Los estudios que dan origen a esta tesis se basan en investigaciones (Lazo de la Vega-Monroy et al., 2012) donde se encontró que la biotina aumenta la expresión de genes críticos en el desarrollo del islote pancreático y produce cambios en la estructura del islote, lo que sugiere que la vitamina participa en la morfogénesis de éste, área de estudio muy activa en el campo de la diabetes, que sirve actualmente como base en estrategias para la obtención de células beta funcionales para terapias de trasplante.

A continuación revisamos conocimientos referentes a las acciones metabólicas y farmacológicas de la vitamina. Igualmente, se revisarán las bases de la función y desarrollo pancreático y a las proteínas que se han encontrado modificadas por la administración de biotina en los islotes.

2 ANTECEDENTES

2.1 Biotina

La biotina es una vitamina hidrosoluble del complejo B (vitamina B₈), llamada también vitamina H (del alemán *haut*, piel). Los mamíferos no pueden sintetizar la biotina por lo que es necesario su consumo en la dieta diaria.

2.1.1 Estructura química de la biotina

Está compuesta de un anillo imidazólico fusionado con un anillo tetrahidrotiofeno. Un ácido valérico sustituido que se une a uno de los átomos de carbono del anillo tetrahidrotiofeno. Hay tres formas de biotina: biotina libre (la única útil para los seres humanos), biocitina (e-biotina-L-Lisina) y dos sulfóxidos L y D biotina. La biotina se encuentra en los alimentos, en la mayoría

de ellos unida al grupo ϵ -amino de una lisina, formando el dímero conocido como biocitina. Para su absorción se requiere romper este enlace semipeptídico por acción de la biotinidasa pancreática (Hymes J, Wolf B. 1996)

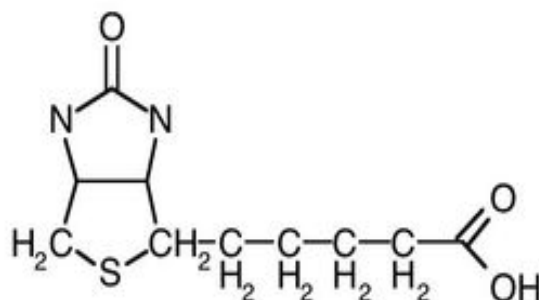


Figura 1 Estructura química de la biotina

2.1.2 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 (Mock, D.M. 2006; Said, H.M. 2012). Sin embargo, se ha estimado una ingesta diaria recomendada de biotina de 35 μg para niños y 30 μg para adultos (Food and Nutrition Board. National Academy Press, Institute of Medicine, Washington, DC, 1998).

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 (Mock, D.M. 2006; Said, H.M. 2012). También se ha descrito deficiencia subclínica de biotina durante el embarazo (Mock, D.M., 1997), el alcoholismo (Bonjour, J. 1991) y en pacientes con enfermedad intestinal inflamatoria, dermatitis seborréica o enfermedad de Leiner (Said, H.M. 2012).

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 días (Combs, G.F. 1992).

2.1.3 Papel de la biotina en las reacciones de carboxilación

Su función más conocida en los organismos eucariotes es la de participar como grupo prostético de las carboxilasas. En los mamíferos se han identificado 5 carboxilasas dependientes de Biotina: La piruvato carboxilasa (PC), la acetil CoA carboxilasa (ACC) 1 y 2, la propionil CoA carboxilasa (PCC) y la β-metilcrotonil-CoA carboxilasa (MCC). (Voet, D., J.G 2002). Estas enzimas participan en diversos procesos metabólicos como la gluconeogénesis, la lipogénesis y el catabolismo de aminoácidos.

La acetil CoA carboxilasa (ACC) 1 y 2 catalizan la carboxilación de Acetil-CoA para la formación de Malonil-CoA que sirve como precursor en la síntesis de ácidos grasos, otras carboxilasas como la Propionil-CoA carboxilasa (PCC) cataliza reacciones esenciales en el metabolismo de los aminoácidos, colesterol y cadenas de ácidos grasos. La β-metilcrotonil-CoA carboxilasa (MCC) participa en el metabolismo de la leucina, convirtiendo al 3-metilcrotonil-CoA en 3-metilglutaconil-CoA, finalmente la piruvato carboxilasa (PC) que es una enzima clave de la gluconeogénesis, en hígado y riñón, que cataliza el paso de piruvato a oxaloacetato. También está presente en los tejidos lipogénicos, en los que actúa en la síntesis de ácidos grasos. (Lamhonwah A, Quan F et al. 1987)

La biotina tiene un papel fundamental en numerosas reacciones de carboxilación puesto que es un acarreador específico de CO₂. Los grupos carboxilo son activados en una reacción que consume ATP y une CO₂ al complejo formado por la biotina y la enzima correspondiente. El CO₂ será transferido a una molécula aceptora para completar la reacción de carboxilación. (Lehninger et al, 2001, cap. 16, pp. 585-586)

Las carboxilasas dependientes de biotina son sintetizadas como precursores inactivos o apoenzimas. La proteína activa u holoenzima se forma cuando la molécula de biotina se une a un residuo de lisina localizada en una secuencia Met-Lys-Met conservada, esta reacción se lleva a cabo en dos etapas. En la primera, la biotina es activada empleando ATP para formar el intermediario biotinil-5'-adenilato (biotinil-AMP). En la segunda etapa, el grupo biotinilo se transfiere a la apoenzima para unir al residuo de lisina previamente mencionado, liberándose AMP. Una vez formada la holoenzima, procede la reacción de carboxilación del sustrato. (Lamhonwah A, Quan F et al. 1987)

2.1.4 Biotina sobre la expresión de genes

Se conoce poco acerca de las vitaminas hidrosolubles como moduladores genéticos. Sin embargo, los ejemplos de sus efectos sobre la expresión genética van en aumento. En adición a su papel como grupo prostético de las carboxilasas, en los últimos años se ha encontrado que concentraciones farmacológicas de biotina son capaces de modificar la expresión génica (Rodríguez-Melendez, R. & Zemleni, 2003). El efecto de la biotina sobre la expresión de genes no está confinado a la molécula de biotina como tal y al parecer tampoco este es un resultado de su actividad de carboxilasa. Análogos sintéticos de la biotina como el diaminobiotina y desthiobiotina, que no participan como grupos prostéticos tienen actividades similares a la biotina sobre la expresión de genes. Se ha visto que la Bisnorbiotina, posee capacidad de modificar la expresión de genes, se trata de un metabolito resultante de la beta-oxidación de la cadena valérica de la biotina, éste no puede ser activado bajo el enlace con AMP, que es un prerrequisito para la unión a las carboxilasas. (Rodríguez-Melendez R et al. 2006)

El efecto de la biotina sobre la expresión del RNA mensajero se encuentra actualmente bien establecido (Rodríguez-Melendez R, 2003; Zemleni, J, 2005). Se sabe que la biotina participa en la regulación de la transcripción de enzimas que requieren de ella como grupo prostético y sustrato, como son la holocarboxilasa sintetasa (Rodríguez-Melendez, R., 2001; Solorzano-Vargas S 2002); la acetil-Coenzima A carboxilasa-1; la propionil Coenzima A carboxilasa-A (Solorzano-Vargas S 2002); así como de aquellas proteínas que no la necesitan como cofactor. (Chauhan, J. 1991, Dakshinamurti, K 1994, Maeda, Y. 1996, Wiedmann S et al. 2004). La acción de la biotina sobre la expresión genética parece ser muy amplia: en un estudio de microarreglos en células mononucleadas de sangre periférica humana, se encontró que una suplementación de biotina en una dosis de 8.8 $\mu\text{mol/d}$ durante 21 días, afecta positivamente la expresión de 139 genes, mientras que disminuye la de otros 131 (Wiedmann S et al. 2004)

El efecto de la biotina sobre la expresión de genes también se produce al nivel postranscripcional (Collins JC et al. 1988, Rodríguez-Melendez R et al. 2005). La expresión del receptor de asialoglicoproteína está disminuido en células HepG2 deficientes en biotina (Collins JC et al. 1988). La adición de biotina restaura completamente la expresión proteica del receptor de asialoglicoproteína, mientras que la expresión del mRNA no se modifica. Este mismo efecto se observa sobre la expresión del receptor de la insulina. También, estudios de proteómica, identificaron cambios en la expresión de proteínas en respuesta a concentraciones

farmacológicas de biotina; la mayoría de ellas corresponden a proteínas que juegan un papel en la señalización celular, estructura nuclear y transporte (Rodríguez-Melendez R et al. 2005).

2.1.4.1 Mecanismos moleculares de la biotina sobre la expresión de genes

Se han identificado diferentes vías, no necesariamente excluyentes, que podrían participar en la acción genética de la vitamina:

2.1.4.1.1 Activación de la guanilato ciclasa soluble

Estudios de *Vesely D. en 1982* descubrieron que la adición de 1 μM de biotina a extractos celulares aumentaba la actividad de la guanilato ciclasa soluble. Posteriormente, Spence y Koudelka (1984) encontraron que el aumento producido por la biotina en la actividad de la glucocinasa hepática estaba precedido por un incremento en las concentraciones intracelulares de GMPc, lo que sugería que la biotina ejercía su efecto génico a través de este segundo mensajero. Solorzano y colaboradores (2002), proponen que el compuesto biotinil-AMP es el vínculo en la cascada de fosforilación involucrada en la regulación de la expresión genética por la biotina. Estos autores encontraron que la regulación de la expresión de la acetyl -CoA carboxilasa 1, la propionilCoA carboxilasa y de la propia holocarboxilasa sintetasa requiere de la actividad enzimática de la holocarboxilasa sintetasa. Con base en sus resultados proponen que el biotinil-AMP, por un mecanismo aún no conocido, activa la guanilato ciclasa soluble, y que, de esta manera, se incrementa el contenido de GMPc, que a su vez activa a la PKG favoreciendo así una serie de fosforilaciones que modifican la expresión de los genes.

Poco es conocido sobre los mecanismos por los cuales la biotina estimula la guanilato ciclasa soluble. Un reporte (*Rodríguez-Melendez R et al. 2009*) ha sugerido que la biotina ejerce su efecto a través de la vía de la sintasa del oxido nítrico. Estudios en la línea celular Jurkat de linfoma humano, encontraron que la concentración de oxido nítrico, la abundancia del RNAm de la sintasa del oxido nítrico endotelial e inducible así como la actividad del PKG, dependían de la concentración de biotina en el medio (*Rodríguez-Melendez R et al. 2009*) sin embargo en estudios in vivo, la sintasa el oxido nítrico no parece estar involucrada en la acción hipotensora de la biotina (*Watanabe-Kamiyama M et al. 2008*). Se requiere de investigación adicional para determinar el papel del oxido nítrico en la estimulación de la guanilato ciclasa soluble mediada por biotina.

La cascada de eventos posteriores a la activación de la guanilato ciclasa/ PKG en la expresión de genes mediado por la biotina ha sido pobremente investigada. Estudios en nuestro

laboratorio en islotes pancreáticos aislados descubrieron que posterior a la activación de la PKG, se aumenta la producción de ATP, a su vez el incremento de ATP induce la secreción de insulina a través de los canales de potasio sensibles ATP. La insulina así secretada activa la señalización PI3K/Akt, lo cual incrementa la expresión del RNAm de glucocinasa.

2.1.4.1.2 Biotinilación de histonas.

Otro mecanismo molecular que podría estar involucrado en el efecto de la biotina sobre la expresión genética es la biotinilación de histonas. La presencia en el núcleo de dos enzimas claves en el metabolismo de la biotina, la biotinidasa y la holocarboxilasa sintetasa (Hymes J, et al., 1999; Stanley JS, et al., 2001) así como su capacidad de biotinar histonas apoyan esta hipótesis. Algunos estudios sugieren que la biotinilación de histonas podría estar ligada a la proliferación celular (Stanley et al, 2001) así como a la reparación y replicación del ADN (Peters et al, 2002)

Varios estudios han demostrado que la biotina se une a proteínas de histonas de manera específica en varios tipos celulares y sugiere que podría modificar la expresión génica a este nivel molecular (Hassan y Zemleni, 2006). Entre las funciones relacionadas con la biotinilación de histonas está un decremento de linfocitos polimorfonucleares durante la proliferación celular (Zemleni et al., 2001), cambios durante el ciclo celular de células de sangre periférica humana (Stanley et al., 2001), incremento en la biotinilación de histonas por luz ultravioleta en células Jurkats (Peters et al., 2002) y cambio en el patrón de biotinilación de histonas en *Drosophila m.* (Hoi et al., 2007). Sin embargo estudios recientes han cuestionado el papel de la biotinilación de histonas como mediador de los efectos de la biotina (Bailey et al., 2008; Healy et al., 2009)

2.1.5 Efectos de concentraciones farmacológicas de biotina en funciones biológicas

Asociado con la expresión de genes se ha encontrado que la biotina en concentraciones farmacológicas posee diversos efectos sobre procesos sistémicos como el desarrollo (Watanabe, T. 1996), la reproducción (Baez-Saldana, A. et al., 2009; Simmins, P.H. & Brooks, P.H. 1983) y el metabolismo de lípidos y de carbohidratos (Fernandez-Mejia, C. 2005)

2.1.6 Biotina en el metabolismo de carbohidratos

La suplementación con biotina modula también la expresión de genes críticos en la homeostasis de la glucosa. Genes como la glucocinasa hepática (Chauhan, J. & Dakshinamurti, K 1991) y el receptor de insulina (De La Vega, L.A. & Stockert, R.J 2000) aumentan su expresión en

respuesta a la suplementación con biotina, mientras que genes gluconeogénicos como la PEPCK (Dakshinamurti, K. & Li, W 1994) y glucosa-6-fosfatasa, así como los factores transcripcionales HNF-4alfa y FoxO-1 (Sugita, Y., Shirakawa et al., 2008) disminuyen su expresión.

La biotina también aumenta la expresión de genes del islote pancreático. Estudios en nuestro grupo (Vilches-Flores, A., 2009, Romero-Navarro, G et al., 1999) han encontrado que la 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 (Matschinsky, F.M. 1996) y un factor determinante en la masa y la regeneración de la célula beta (Porat, S. et al 2011). Efectos similares sobre la glucocinasa fueron observados en la línea celular de insulinoma RIN 1046-38 (Borboni, P. et al 1996). La expresión del gen de la insulina (Romero-Navarro, G. et al., 1999) y del factor transcripcional PDX-1, determinante en el desarrollo pancreático (Yoshikawa, H. et al., 2002), también se incrementan con la suplementación con biotina.

En estudios *in vitro* realizados por nuestro grupo (Vilches-Flores, et al., 2009; Romero-Navarro, G. et al. 1999) y otros (Sone, H. et al 2000; Sone, H. et al., 1999) se ha encontrado 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 (Romero-Navarro, G. et al., 1999), como en perfusión de páncreas total (Sone, H. et al. 1999) o islotes pancreáticos (Sone, H. et al., 2000). 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 estimuladoras (16 mmol/l) de glucosa (Vilches-Flores, A., et al., 2009; Romero-Navarro, G. et al., 1999; Sone, H. et al., 2000). La biotina es la única vitamina del complejo B que incrementa la secreción de insulina (Sone, H. et al., 2000), efecto que ha demostrado ser dependiente de la dosis de biotina (Sone, H. et al., 1999).

En estudios recientes (Lazo de la Vega-Monroy. et al., 2012) que dan origen a este proyecto encontramos que en ratones la administración durante ocho semanas de una dieta conteniendo concentraciones farmacológicas de biotina 55 veces la presente en la dieta control incrementó la secreción estática de insulina y la expresión de este gen, así como el RNAm de proteínas participan en la secreción de insulina en respuesta a la glucosa: *Glucocinasa*, el canal de calcio alfa 1d (*Cacna1d*) y *acetil-CoA carboxilasa*. En concordancia con estos efectos, los islotes provenientes de los ratones suplementados con biotina mostraron un aumento en la secreción

estática de insulina. Estos ratones también mostraron una mejora en la tolerancia a la glucosa y un incremento de insulina en sangre en respuesta a la glucosa, sin observarse cambios en los niveles basales de glucosa ni en la tolerancia a la insulina.

También, la expresión del RNAm de factores transcripcionales que son determinantes en el desarrollo del islote y que en la etapa adulta regulan la síntesis y secreción de insulina, como *Foxa2*, *Pdx1* y *Hnf4a* se encontraron incrementados.

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. De forma inesperada, en la arquitectura de los islotes se observó un porcentaje más elevado de islotes con células alfa localizadas hacia el centro del islote con respecto a los controles. El análisis de la expresión de proteínas de adhesión encontró una disminución en la expresión del RNAm de *Ncam1*, indispensable en el mantenimiento de la arquitectura del islote. No se encontró diferencia en la abundancia del RNAm de la cadherina (*Cdh1*) entre el grupo suplementado y el grupo control, en tanto que el mensajero de β -actina (*Act β*), se encontró incrementado.

2.1.7 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 (Coggeshall, J.C., et al., 1985; Koutsikos, D. et al., 1996) como en modelos diabéticos (Zhang, H., et al., 1997; Zhang, H. et al., 1996), aunque estos efectos no se han observado en todos los estudios (Watanabe-Kamiyama, M. et al., 2008; Revilla-Monsalve, C. et al., 2006).

En pacientes con diabetes tipo 1 a los cuales se suplementó con 16 mg/día de biotina durante una semana, sin recibir insulina exógena, la glucosa en ayuno disminuyó de forma significativa (Coggeshall, J.C., et al., 1985). 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 biotina (Maebashi, M. et al., 1993). En pacientes de hemodiálisis, dosis de 50 mg/día de biotina por 2 meses mejoraron también la tolerancia a la glucosa (Koutsikos, D. et al., 1996). 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 (Baez-Saldana, A. et al., 2004; Revilla-Monsalve, C. et al.,

2006). La discrepancia entre los estudios puede deberse a la variabilidad genética y/o a diferencias en el estado diabético de las poblaciones 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, modelo animal de diabetes tipo 2 moderada que se caracteriza por un estado prediabético debido a una 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 insulina (Reddi, A., et al., 1988). Otro estudio encontró que la tolerancia a la glucosa de las ratas con diabetes inducida con estreptozotocina mejora parcialmente con el tratamiento durante 15 días con biotina (100 µg/día) (Zhang, H., et al., 1997). Asimismo, en las ratas OLETF, un modelo que desarrolla diabetes tipo 2 de manera espontánea, la suplementación con 1 a 2 mg/día de biotina durante 24 semanas, también mejoró la tolerancia a la glucosa (Zhang, H. et al., 1996). Sin embargo, otros estudios no han encontrado efectos de la suplementación con biotina (60 µg/kg de peso) sobre la tolerancia a la glucosa ni en ratas diabéticas ni en un modelo de ratas con hipertensión espontánea (Watanabe-Kamiyama, M. et al., 2008). 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 2 (Albarracin, C., et al., 2005; Singer, G.M. & Geohas, J. 2006). Estos productos contienen concentraciones farmacológicas de biotina que representan de 40 a 166 veces más la ingesta de biotina recomendada (Food and Nutrition Board, National Academy Press, Institute of Medicine, Washington, DC, 1998). Si bien las investigaciones acerca del efecto de la biotina sobre el metabolismo de carbohidratos aportan evidencia de que la biotina modifica la expresión de genes que favorecen la captación de glucosa y reduce los niveles de glucosa sanguínea en condiciones de hiperglucemia, nuestras observaciones sobre el efecto de la biotina sobre el aumento del tamaño de los islotes y el cambio en la proporción de la distribución de las células en el islote, indican que es necesario ahondar en los mecanismos que producen estos efectos para determinar la inocuidad de la biotina.

2.2 Páncreas

Es un órgano que se ubica en la curva del duodeno en forma de C, y está conectado a éste por la Ámpula de Vater, donde el ducto pancreático se une con la vesícula biliar, cubierto por el estomago y extendido transversalmente desde el duodeno hasta el bazo. Se trata de una glándula mixta; es decir está compuesta de tejido glandular de secreción tanto exocrina como endocrina.

El páncreas en los mamíferos consiste de tres compartimentos epiteliales principales:

El sistema ductal transporta las proenzimas digestivas producidas por el tejido exocrino acinar hacia el duodeno.

La porción exocrina que constituye el 80-85%, comprende el denominado tejido tubulo-acinar responsable de la secreción de enzimas digestivas incluyendo proteasas, amilasas, lipasas y nucleasas, muchas de estas secretadas como precursores inactivos, que inician su actividad después de que entran al duodeno. La glándula exocrina segrega el jugo digestivo que contiene grandes cantidades de iones sodio y bicarbonato que neutralizan el material ácido que entra al intestino delgado desde el estómago.

Parte endocrina: está representada por los islotes de Langerhans que son agrupaciones de varios tipos de células distribuidas entre el tejido acinar, encargadas de la secreción de distintas hormonas. Se han designado 5 tipos celulares dentro de los islotes de Langerhans como: **α , β , γ , δ , ϵ y PP.**

- **Las células alfa.-** se encargan de sintetizar el glucagon, hormona con actividad glucogenolítica y gluconeogénica en el hígado. Su porcentaje en los islotes de los mamíferos varían dependiendo de la especie, pero su número es menor a las células beta. Representan aproximadamente el 10 al 20% del volumen del islote y se distribuyen en forma periférica.
- **Células beta.-** Se localizan comúnmente en el centro del islote, son las encargadas de sintetizar la insulina. El número de estas células es mayor al resto de las células en los islotes, más del 50% en humanos y en ratas del 67%
- **Células delta.-** contienen somatostatina, sustancia que inhibe la liberación tanto de insulina como de glucagon. Se distribuyen de igual manera que las células alfa, en la periferia del islote, pero su número es muy reducido.

- **Células PP.**- Son células que al igual que las células alfa y delta, se encuentran en la periferia del islote, producen y liberan polipéptido pancreático, ejerce diversos efectos en el aparato digestivo, como son la estimulación de la secreción de gastrina, de enzimas intestinales y la inhibición de la motilidad intestinal.
- **Células ϵ .**- Son células que se encuentran en la periferia del islote y secretan grelina, que regula el apetito y la hormona de crecimiento. (Diaz, C, 2008)

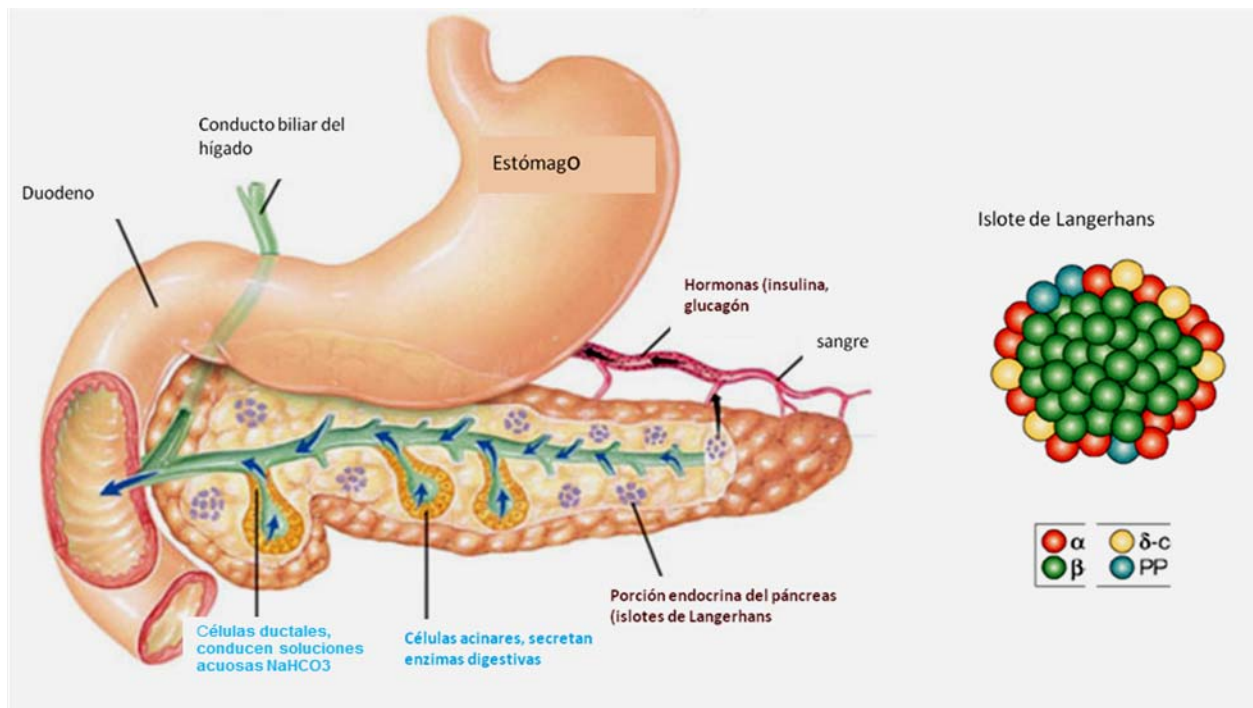


Figura 2 Anatomía del páncreas

El páncreas maduro adyacente al duodeno, la parte exocrina, compuesta por el tejido acinar, encargado de producir y secretar las enzimas digestivas, y subsecuentemente transportadas al intestino. La parte endocrina del páncreas o islotes de Langerhans, que consisten de 4 tipos celulares productores de hormonas: células alfa (rojo, secretan glucagón), beta (verde, secretan insulina), delta (amarillas, secretan somatostatina) y las células PP (azules, polipetido pancreático).

Modificada de <http://blogdefarmacia.com>.

El páncreas endocrino representa tan solo de 1 al 5% de la masa pancreática total (Kim SK, 2001), en el islo las células beta abarcan de 70 a 80% del total de las células, de modo que la mayoría de los estudios acerca de los factores transcripcionales y su función en los islotes pancreáticos se centran en la célula beta por la dificultad de evaluar otras células cuyo porcentaje en el páncreas es muy pequeño.

La célula beta adulta es un tipo celular altamente especializado que se encarga de controlar la producción, procesamiento, almacenamiento y modulación de la secreción de insulina. La célula beta responde a cambios metabólicos, hormonas circulantes y neurotransmisores (Hellerstrom C, 1984, Weir GC, 1997).

2.2.1 Secreción de Insulina

La secreción de insulina en respuesta a glucosa es un proceso complejo de múltiples pasos que requiere del transporte y la oxidación de la glucosa, cambios electrofisiológicos y la fusión de gránulos secretores que contienen insulina en la membrana plasmática de la célula.

La glucosa entra a la célula por difusión facilitada mediada por un grupo de proteínas transportadoras de glucosa relacionadas (GLUT), en la célula beta pancreática de roedores, la glucosa es transportada por la isoforma 2 del transportador de glucosa (GLUT2). 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 (Matschinsky FM, 2002). La generación de ATP por la glucólisis y el ciclo de Krebs provoca el cierre del canal de K^+ sensible a 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. El cierre de los canales de K^+ ocasiona una despolarización de la membrana plasmática y un flujo de calcio extracelular al interior de la célula. Este proceso lleva a la fusión de los gránulos secretores que contienen insulina con la membrana plasmática y la liberación de insulina hacia la circulación. (citado por Lazo de la Vega M.L, 2010). 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 dependiente de K_{ATP}), seguida de una segunda fase sostenida que depende de una vía de amplificación (o un mecanismo independiente de K_{ATP}) (Henquin, J.C et al., 2000; Aizawa, T., et al., 2002)

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 (Aizawa, T. & Komatsu, M. 2005). Los gránulos de liberación inmediata son los primeros en secretar insulina en respuesta al incremento del $[Ca^{2+}]_i$ durante la fase de disparo, ocasionando la primera fase de secreción de insulina. 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, presuntamente a través de la movilización de la reserva de gránulos de insulina y la reposición de los gránulos de liberación inmediata.

Diversos estudios han demostrado un papel autócrino de la insulina sobre la función y sobrevivencia de la célula beta (Aikin R, 2009, Navarro- Tableros V 2004). En este proceso, la unión de la insulina a su receptor promueve la autofosforilación del mismo, catalizando a su vez la posterior fosforilación en tirosina de proteínas como IRS (IRS1 e IRS2). Una vez fosforiladas, interactúan con moléculas de señalización, lo cual resulta en una cascada de fosforilaciones en las que se activan secuencialmente PI3K, PDK y Akt, una cinasa de serina/treonina que regula procesos como la sobrevivencia celular, la proliferación, el crecimiento y el metabolismo.

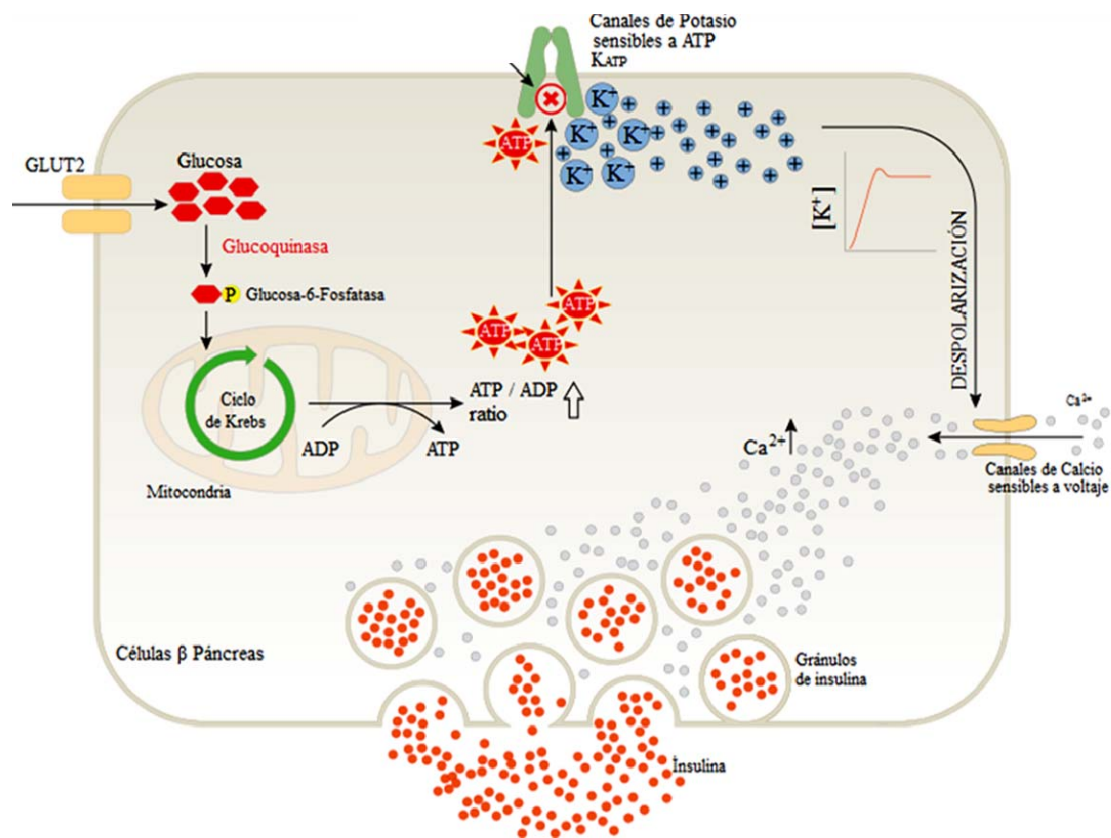


Figura 3 Secreción de insulina estimulada por glucosa, en las células beta pancreáticas.

La glucosa entra en la célula por difusión facilitada, en la célula beta pancreática, es transportada por la isoforma 2 del transportador de glucosa (GLUT2). La glucosa es fosforilada para formar glucosa-6-fosfato por la glucoquinasa. La generación de ATP por la glucólisis y el ciclo de Krebs provoca el cierre del canal de K^+ sensible a ATP, la despolarización de la membrana y una subsecuente apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje. El incremento en las concentraciones intracelulares de calcio facilita la fusión de los gránulos secretores que contienen insulina con la membrana plasmática y la liberación de insulina hacia la circulación.

http://commons.wikimedia.org/File:Glucosa_Liberacion_Insulina_Pancreas.svg

2.2.3.1 Fosforilación de la glucosa

En la célula beta pancreática, la glucosa luego de ser transportada por la isoforma dos del transportador de glucosa (GLUT2), será fosforilada para formar glucosa-6-fosfato a través de la glucocinasa. La glucocinasa es una enzima que está presente en las células cuya función requiera una respuesta fisiológica a las concentraciones de glucosa. Esta enzima se expresa también en los hepatocitos, enterocitos tipo K y L, y algunas células neuroendocrinas del hipotálamo.

2.2.3.2 Funciones de la glucocinasa en la secreción de insulina

La glucocinasa es una de las cuatro isoenzimas que catalizan el primer paso en el metabolismo de la glucosa, la clave de su cinética es la baja afinidad por el sustrato ($S_{0.5} 7-9\text{mM}$) su saturación fisiológica con el segundo sustrato Mg ATP, y su cooperatividad, (Matschinsky FM, et al., 1996) la afinidad de la enzima por el Mg ATP está muy por debajo de las concentraciones intracelulares de glucosa y de la cantidad de glucocinasa dentro de la célula, es importante la falta significativa de inhibición por producto final dado por glucosa-6-fosfato dado que la catálisis no se ve disminuida cuando las concentraciones de glucosa aumentan.

La cooperatividad de la glucocinasa hacia la glucosa no puede ser explicada por el clásico mecanismo de alosteridad para multisubunidades, debido a que la glucocinasa es catalíticamente activa en un estado monomérico (Cardenas ML, 1978) la enzima existe en dos formas diferentes, una abierta y una cerrada. La forma abierta representa una baja afinidad a la glucosa, y catalíticamente lenta de la enzima. La conformación cerrada se correlaciona con una alta afinidad de la glucocinasa por la glucosa y con unión al ATP en el sitio activo durante la catálisis (Aleshin AE, 1998)

La glucocinasa juega un papel importante en el metabolismo, porque permite un rápido equilibrio entre los niveles de glucosa plasmáticos y los intracelulares (Whitesell RR, 1991). Como la glucocinasa no está bajo un control de inhibición por retroalimentación, provocado por metabolitos de glucosa, como la glucosa 6 fosfato, su actividad depende de la disponibilidad de glucosa más que de la concentración de su producto.

Detrás de su papel como regulador metabólico para la secreción de insulina estimulada por glucosa, se ha propuesto que la fracción proteica de la glucocinasa podría jugar un papel aun desconocido en la regulación del movimiento de los gránulos de insulina a lo largo de los filamentos de tubulina, como una co-localización con kinesina, esto ha sido demostrado por

medio de inmunohistoquímica y FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) analizados a través de un photobleaching en células MIN6 (Baltrusch S, 2007).

El RNAm de glucocinasa es transcrito desde dos diferentes promotores que son utilizados de manera “tejido específico”, el promotor río arriba está involucrado en la producción del RNAm de Glucocinasa de las células beta, duodeno, pituitaria y cerebro, mientras que el promotor río abajo es utilizado en el hígado (Magnuson MA, 1990) existen dos secuencias diferentes que son funcionalmente importante en las células beta, referidos como un elemento promotor río arriba (UPE) y sitios Pal (Shelton KD, et al., 1992).

Los UPEs son elementos ricos en A y T que parecen ser regulados positivamente por PDX1 (Shelton KD, et al., 1992) además están involucrados con genes esenciales en la función y secreción de las células beta así como en el desarrollo del páncreas (Ohlsson H, et al., 1993) y Glut2 (Waeber G, et al., 1996). Beta 2 o NeuroD1 se enlazan específicamente en una región comprendida dentro del promotor endógeno de Glucocinasa de las células beta. Los datos sugieren que Neuro D1:E47 se enlaza específicamente y activan el promotor río arriba de Glucocinasa en los islotes y en el intestino. Además del papel de NeuroD1 como activador transcripcional, juega un papel significativo en el desarrollo del páncreas, cerebro y otras células endocrinas. Ratones deficientes de NeuroD1 resultan en una formación comprometida de las células de los islotes. (Naya FJ, et al., 1995)

2.2.3.3 Canales de Calcio en la célula beta

Cuando la glucosa extracelular aumenta, es captada en las células beta por su transportador GLUT2. El metabolismo de la glucosa conduce a un cambio en la proporción ATP/ADP, resultando en el cierre de los canales de K_{ATP} y la despolarización de la membrana. Lo cual lleva a la activación de canales de calcio dependientes de voltaje (VDCC), esta variación de potencial de membrana y el incremento de las concentraciones intracelulares de calcio provocan la exocitosis de insulina. (Hiriart M, 2008).

El movimiento del calcio en respuesta a un incremento de glucosa extracelular, de 3 a 20mM, involucra una disminución en la concentración de calcio, seguidas por una lenta y grandes oscilaciones de calcio con picos rápidos y superpuestos, estas oscilaciones reflejan un relleno y vaciado de pools de calcio, particularmente desde el retículo endoplasmático. (Gilon P, 1999, Henquin JC, 2006, Henquin JC, 1998)

La respuesta inicial es considerada debido a la entrada de calcio en el retículo endoplásmico, preparando a las células beta para responder a diferentes hormonas y neurotransmisores, los cuales movilizarían el calcio desde el retículo endoplásmico vía IP_3 y de otros canales calcio. El mecanismo por el cual un incremento en las concentraciones de calcio, aumenta por la liberación de Calcio desde el retículo endoplásmico es conocido como CICR (liberación de calcio estimulada por calcio).

Los canales de calcio dependientes de voltaje, VDCCs están clasificados de acuerdo a si son activados con bajo voltaje (Tipo T) o alto voltaje (L, N P/Q y R). En ambos casos, están compuestos por un complejo heteromérico formado por las subunidades alfa 1, alfa 2, beta (se han distinguido 4 genes, $Ca_v\beta 1$, $Ca_v\beta 2$, $Ca_v\beta 3$, $Ca_v\beta 1$) y la subunidad gamma. Los canales de calcio tipo L son considerados los más importantes para la entrada de Calcio porque controla la secreción de insulina en las células beta, estos canales están localizados cerca de los gránulos de insulina en las células beta. Una de las razones que explica la secreción bifásica de la insulina es la liberación secuencial de los distintos gránulos de insulina, los cuales están asociados con diferentes subtipos de canales de Calcio tipo L. (Yang SN, Berggren PO., 2005)

Las ratas y los ratones expresan dos subunidades diferentes alfa 1 en los canales de calcio tipo L, que son alfa 1D ($Ca_v1.3$) y Alfa 1C ($Ca_v1.2$). Se sabe que la subunidad alfa 1D contribuye mayoritariamente en la secreción de insulina estimulada por glucosa. (Liu G, 2003, Navarro-Tableros V, 2007, Scholze A, 2001). Interesantemente en las células beta de los humanos un bloqueo de la subunidad alfa 1D en los canales de calcio tipo L bloquea la secreción de insulina (Braun M et al., 2008, Misler S, et al., 1992). A diferencia de los ratones la secreción de insulina no fue afectada por una falta de la subunidad alfa 1D (Vignali S, et al., 2006) sin embargo una pérdida de la subunidad alfa 1C disminuye las concentraciones de calcio intracelular, además del bloqueo de los canales de calcio tipo L, lo cual indica que es el principal tipo de canal de calcio en estas células (Babenko AP, et al., 2003).

Es posible que en las células beta de los ratones, alfa 1D sea requerido para la adecuada regeneración durante el periodo posnatal, ratones con expresión nula para alfa 1D, resultaron mucho más pequeños al momento del nacimiento con respecto a su camada control y exhibieron hipoinsulinemia e intolerancia a la glucosa, sin embargo la sensibilidad a la glucosa y la secreción de insulina fueron normales, resultado de una sobreexpresión de la subunidad alfa 1C, aun cuando el número de islotes fue igual que el Wild type (Jing X et al., 2005; Yang SN et al., 2005).

Es importante mantener la idea de que la localización y el número de canales, es importante para mantener una función normal. En ratas neonatales las células beta poseen una respuesta secretoria hacia la glucosa más baja que las células adultas; este efecto ha sido asociado con corrientes de calcio más cortas, y aunque la respuesta secretoria mejora después del nacimiento, pero al día 28 aun es menor que en los adultos (Aguayo-Mazzucato C, 2006)

2.2.2 Factores transcripcionales que participan en el funcionamiento de la célula beta pancreática

Los factores transcripcionales son proteínas que regulan la transcripción de mRNA al unirse a secuencias específicas en los promotores y otros elementos *cis* de un gen determinado. Estas secuencias específicas se denominan elementos de respuesta, y a pesar de ser indispensables para la unión del factor transcripcional al DNA, el efecto activador o represor de los factores transcripcionales sobre sus genes blanco depende de:

- La cantidad, localización y actividad del factor en el núcleo.
- Su interferencia o sinergia con otros factores transcripcionales y/o maquinaria de transcripción.
- El ambiente cromatínico del gen que regulan (*Sperling S. 2007*)

Dada la participación en la modulación específica de la expresión de proteínas que le otorgan a una célula la capacidad de realizar las funciones características de su tipo celular diferenciado, los factores transcripcionales juegan un papel crucial durante el desarrollo y mantenimiento del fenotipo de un organismo, incluyendo el páncreas (*Sperling S. 2007*). La identificación de los factores de transcripción y el estudio del fenotipo que se presenta en modelos de ratones knockout para estas proteínas, han permitido ampliar el conocimiento con respecto a las funciones de la célula beta adulta y su regulación, revelando que muchos de ellos participan no solo en la diferenciación sino también en el mantenimiento de las características propias de la célula beta adulta.

pdx1 tienen alterada la función de la célula beta y presentan fenotipos diabéticos. (Ahlgren U, 1998; Stoffers DA 1997)

Se ha sugerido que la disminución en la actividad de Pdx1 puede ser un factor de susceptibilidad para la aparición de diabetes tipo 2 (Brissova M, 2002) además mutaciones en el homólogo humano de Pdx1 (Ipf1) son causantes de MODY4 (Stoffers DA, 1997). Pdx1 participa en el mantenimiento y la proliferación de las células beta (Holland AM, 2005). Muchos de los genes blanco de Pdx1 son cruciales para el funcionamiento de la célula beta, ya que además de regularse a si mismo (Chakraborti SK, 2002), este gen regula también el transportador de glucosa *glut2* (Ahlgren U, 1998), a otros factores transcripcionales de la célula beta como MafA (Raum JC, 2006), *hnf4α* (Thomas H, 2001) y a la misma insulina (Chakraborti SK, 2002).

Los genes mitocondriales también son un blanco importante para Pdx1, ya que estos participan en la producción de ATP, (Gauthier BR, 2004), compuesto crítico en la secreción de insulina en respuesta a glucosa, entre estos genes se encuentran la subunidad nd1 de la NADH deshidrogenasa del complejo uno de la cadena respiratoria, de esta forma, la pérdida de función de Pdx1 está asociada a una baja en la concentración total de ATP y NADPH (Brissova M, 2002; Gauthier BR, 2004).

Pdx1 reconoce secuencias específicas en el DNA con una gran afinidad, dependiendo del estado de apertura de la cromatina (Chakraborti SK, 2002). Aumentan el grado de acetilación de las histonas H3 y H4 en el promotor del gen de insulina (Docherty HM, 2005). El gen de Pdx1 posee una región conservada 2kb antes del codón de inicio de la transcripción en mamíferos llamada Área I-II-III, que abarca sitios de unión a diversos factores de transcripción como Foxa2 (Ben-Shushan E, 2001) HNF1α (Ben-Shushan E, 2001) PPARγ y el mismo Pdx1 (Marshak S, 2000). Las áreas I y II se han relacionado con la expresión específica de este gen en el islote durante el desarrollo tardío y la etapa adulta (Van Velkinburgh JC, 2005).

Pdx1 está sujeto a regulaciones postraduccionales además de la fosforilación (Petersen HV, 1998) como sumoilación (Kishi A, 2003) glicosilación (Gao Y, 2003). Se ha sugerido que la fosforilación es el principal mecanismo responsable de su activación por niveles elevados de glucosa, modificación en las que participan diversas cinasas de proteína como PI3K (Elrick LJ, 2001). Además, la fosforilación de Pdx1 por GSK3 se ha asociado con su degradación en el proteosoma, regulando su actividad en estados de estrés oxidativo (Boucher MJ, 2006)

2.2.2.2 Forkhead box A2 (Foxa2)

Foxa2 (HNF3 β) es un factor transcripcional que pertenece a la familia de proteínas winged hélix/Forkhead (FOX) (Carlsson P, 2002). Este factor es capaz de competir por sitios de unión comunes con otras proteínas de la misma familia, particularmente FOXO1, y durante el desarrollo del ratón su ocupación de sitios en los enhancers de Pdx1, aumenta conforme aumenta la edad gestacional (Gao N, 2008). Los ratones Knockout homocigotos para *foxa2* no sobreviven mas allá de la etapa embrionaria E10-11, alrededor de la cual se diferencian el hígado y el páncreas, por lo cual se ha propuesto como una proteína clave en la regulación de la morfogénesis hepática y pancreática (Weinsten DC, 1994)

Otros modelos de mutación del gen *foxa2* exclusivamente en células beta no sobreviven más allá de los días P9 y P12, presentando hipoglicemia e hiperinsulinismo, a pesar de que los islotes secretan insulina, lo hacen principalmente en respuesta a aminoácidos y no a las altas concentraciones de glucosa. (Lantz KA, 2004) Foxa2 a través de sus efectos sobre los diversos genes participa tanto en la síntesis como en la secreción de insulina. Este factor transcripcional regula genes que participan en la producción de insulina en respuesta a glucosa y el metabolismo de la célula beta, como la Glucocinasa (Wang H, 2002), Glut2 (Wang H, 2002), piruvato carboxilasa. (Boonsaen T, 2007) y los factores transcripcionales Pdx1 (Lantz KA, 2004) HNF4 α , HNF1 α (Wang H, 2002) MafA (Raum JC, 2006) se ha establecido su papel como transactivador de genes *Sur1* y *Kir6.2* que forman las subunidades del canal de potasio sensible a ATP. (Lantz KA, 2004, Wang H, 2002). Además, se ha observado que Foxa2 también participa en la regulación de genes del proceso de anclaje de vesículas y secreción de insulina

2.2.3 Genes involucrados en la arquitectura del islote pancreático.

Entre los genes que están involucrados con el mantenimiento de la arquitectura de los islotes y su morfología están las moléculas de adhesión neural 1, (*Ncam1*), cadherina 1 (*Cdh1*) y actina beta (*act-beta*)

2.2.3.1 Moléculas de adhesión Neural 1 (*Ncam1*)

Pertenece a la superfamilia de las Inmunoglobulinas que a diferencia de las cadherinas y las selectinas, son moléculas de adhesión celular independientes de Calcio.

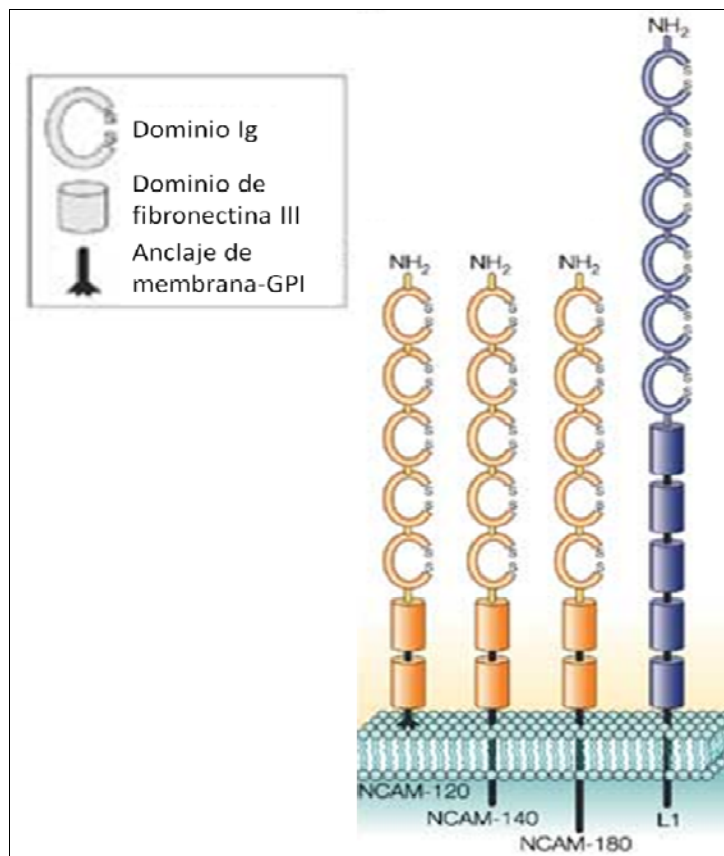


Figura 5 Estructura de NCAM

Las tres isoformas de NCAM, la parte extracelular está compuesta de 5 dominios de inmunoglobulinas y 2 repeticiones de fibronectina tipo III, NCAM 140 y 180, son transmembranales difieren únicamente de su longitud intracelular. NCAM 120 se une a la membrana a través de un anclaje glicofosfatidilinositol.

Modificada de http://www.nature.com/nrn/journal/v5/n12/box/nrn1555_BX1.html

Las moléculas de adhesión (N-CAM), son miembros de las inmunoglobulinas de la familia de CAMs mediadoras de interacciones homofílicas y heterofílicas células-células, además ha propuesto que participan en algunos procesos del desarrollo del sistema nervioso (Schachner, 1989) Las tres isoformas de N-CAM pueden ser reconocidas dentro de tres principales grupos de acuerdo a su colas citoplasmáticas y su asociación con las membranas de las superficies celulares. N-CAM-120, 140 y 180, sus números se refieren a los pesos moleculares relativos, estas tres isoformas son generadas por un splicing alternativo de un pre-mRNA, codificado de un solo gen. (Cunningham et al., 1983; Chung and Edelman, 1984, Gennarini et al 1984). En animales adultos N-CAM esta expresado en varias células neuronales y en las células del páncreas endocrino (Langley et al 1989. Rouller et al 1990; Moller et al 1992).

Las interacciones célula-célula mediada por las moléculas de adhesión (CAMs) (Esni F, 1999) son cruciales en la organogénesis y la formación de tejidos, porque implica regulación de la migración, agregación, disociación espacial y temporal de las células.

Se considera que la organización de las células endócrinas en los islotes de Langerhans se estabiliza a través de una serie de eventos de morfogénesis, que involucran la clasificación, y la migración celular, procesos en los cuales la adhesión de las células es importante (Pictet and Rutter, 1972; Slack, 1995). Se ha demostrado que los mecanismos moleculares que regulan la secreción de insulina depende del contacto de las células beta además de las interacciones célula- célula dentro de los islotes de Langerhans (Lernmark, 1974; Halban et al 1982; Bosco et al 1989; Salomon and Meda, 1986). Recientemente se ha demostrado que los miembros de la familia de CAMs son requeridos para la agregación de las células endocrinas dentro de los islotes pancreáticos (Dahl et al 1996).

2.2.3.1.1 La expresión de N-CAM durante la ontogenia pancreática.

La expresión de N-CAM es mayor en los periodos iniciales del desarrollo, pero en los estados tardíos de este y en los tejidos adultos su expresión llega a ser más restringida. Durante el estado temprano de ontogenia del páncreas, N-CAM es expresado tanto en el mesénquima pancreático como en el endodermo. Gradualmente N-CAM, es restringido solo a la agregación de las células endocrinas. Además de las terminales nerviosas de la periferia y de los ganglios, en los ratones adultos solo las células pancreáticas endocrinas expresan N-CAM. A diferencia de los islotes pancreáticos en las ratas, los cuales expresan niveles más altos de N-CAM en las células no-beta que en las células beta, los ratones parecen expresar niveles similares de N-CAM en todas las células pancreáticas endocrinas. (Rouiller et al, 1990; Moller. et al, 1992). En conclusión, el patrón de expresión de N-CAM durante la organogénesis pancreática sugiere su participación en la morfogénesis de los islotes.

2.2.3.1.2 N-CAM es requerido para las células de los islotes de tipo secretoras.

Un páncreas normal, tendrá todos los tipos de células pancreáticas, islotes de tamaño y numero normal dispersos dentro del tejido exocrino. En animales con mutaciones de NCAM se revelan alteraciones en la organización y en la morfología de los islotes, estos cambios se observan aparentemente en ambos heterocigotos (N-CAM +/-) y homocigotos (N-CAM -/-).

2.2.3.2 Actina

Actinas son componentes esenciales del citoesqueleto, con un papel crítico en un amplio rango de procesos celulares, sus funciones se atribuyen a la habilidad de la actina para formar filamentos que pueden ensamblarse y desensamblarse rápidamente de acuerdo a las necesidades de la célula. Existen seis isoformas de actina altamente conservadas en vertebrados. Cuatro de estas isoformas están expresadas en el músculo y solo dos de ellas son citoplasmáticas la beta-actina y la gamma-actina. Uno de los papeles más estudiados de la actina es su papel en la motilidad de la célula, procesos fundamentales en el desarrollo embrionario y respuestas inmunológicas. La migración celular es ampliamente manejado por la polimerización de actina, la cual proporciona una fuerza de protrusión que presiona la membrana hacia adelante (Pollard and Borisy, 2003) la γ -actina no es requerida para la motilidad celular (Bunnell and Ervasti, 2010) se encuentra más uniformemente distribuida en la célula. Un estudio demostró que la sobreexpresión de β -actina conduce a un incremento en la protrusión en la membrana y a la migración celular (Peckham et al., 2001)

La remodelación de F-actina juega un papel importante en la secreción de insulina estimulada por glucosa (Howell SL, 1982) la despolimerización de F-actina en respuesta a glucosa, el movimiento de los gránulos secretorios hacia la membrana y la consecuente secreción de insulina es facilitada por la disrupción de la vía de actina (Thurmond DC, 2003). La polimerización de la F-actina limita el acceso de los gránulos de insulina hacia la membrana (Nevins AK, 2003). Dado que se forma una red cortical que previene la difusión pasiva de los gránulos de insulina hacia la membrana celular.

Una interrupción transitoria de la asociación de F-Actina/t-SNARE con una redistribución de los gránulos de insulina hacia las regiones más periféricas de las células beta facilita la secreción de insulina.

La exocitosis de los gránulos de insulina requiere el acoplamiento y la fusión de las vesículas secretoras con los sitios de liberación de la membrana. Esto es mediado por la maquinaria de receptores SNAP asociados a membrana (SNAREs), los cuales pueden ser clasificados dentro de dos subfamilias: vesicle- SNAREs y target-SNAREs (Wheeler, M. B, 1996). En las células beta, las proteínas VAMP-2, v-SNARE interactúa específicamente con las proteínas syntaxina1 y sinaptosoma, t-SNARE, en el movimiento de las vesículas hacia la membrana, aproximando las dos membranas que permiten la fusión de las mismas. (Regazzi, R, 1995, Sadoul, K, 1995)

F-actina actúa como un regulador negativo debido a que la despolimerización de F-actina ya sea con *Clostridium botulinum* C2 toxin or Cytochalasin B, que potencian la secreción de insulina en los islotes pancreáticos (Li G, 1994, Wilson JR 2001), los gránulos de insulina aislados fueron encontrados por cosedimentar con los filamentos de actina, y su interacción fue disminuyendo en presencia de calcio (Howell SL. 1979) sin embargo, se reporto que la secreción estimulada por glucosa incremento la fracción de F-actina en un homegenado de células beta pancreáticas preparados de islotes de ratones. La despolimerización de actina con latrunculin B, potencializa la secreción de insulina estimulada por glucosa en una línea de células beta, en la primera y segunda fase de secreción de insulina en islotes aislados de ratas.

Se observó una mejora en la secreción de insulina en respuesta a glucosa luego de una ruptura de la red de los microfilamentos por Citocalasina B (metabolito fúngico que tiene la capacidad de enlazarse con los filamentos de actina y bloquear su polimerización y la elongación de la actina) (Orci et al., 1972)

2.2.3.3 Cadherina

La familia de cadherinas, media las interacciones de adhesión que son requeridas en la formación y el mantenimiento de los tejidos, están agrupadas en varias subfamilias de acuerdo a la estructura y la función. Los más estudiados son los miembros que forman las Cadherinas tipo 1 clásicas, que incluyen las cadherinas E-, N-, R- y P-.

Las N-Cadherinas controlan una variedad de procesos celulares tales como la clasificación, migración y re-agregación celular durante el desarrollo, se ha demostrado que la N-Cadherina esta expresada en el epitelio pancreático al día E9.5 (Radice et al., 1997), pero más tarde se restringe a los agregados endocrinos en ratón (Esni et al., 2001).

Las cadherinas constituyen una superfamilia de glicoproteínas transmembranales que median interacciones homofílicas dependientes de calcio, entre células. (Geiger and Ayalon, 1991). Las cadherinas se extienden a través de la superficie de la célula y con la ayuda de iones calcio, se adhiere a las células vecinas. Esta interacción suele ser específica, se extienden a través de la membrana celular y dentro de la célula, unen fuertemente el citoesqueleto de la célula, en algunos casos, una parte de cadherina forma desmosomas que forman puntos de soldadura para unir células. En otros casos, otra porción de cadherina se enlaza con los filamentos de actina dentro de la célula formando uniones adherentes. En estas uniones las cateninas forman el enlace entre las colas de cadherina y los largos filamentos de actina (Goodsell D.S, 2002)

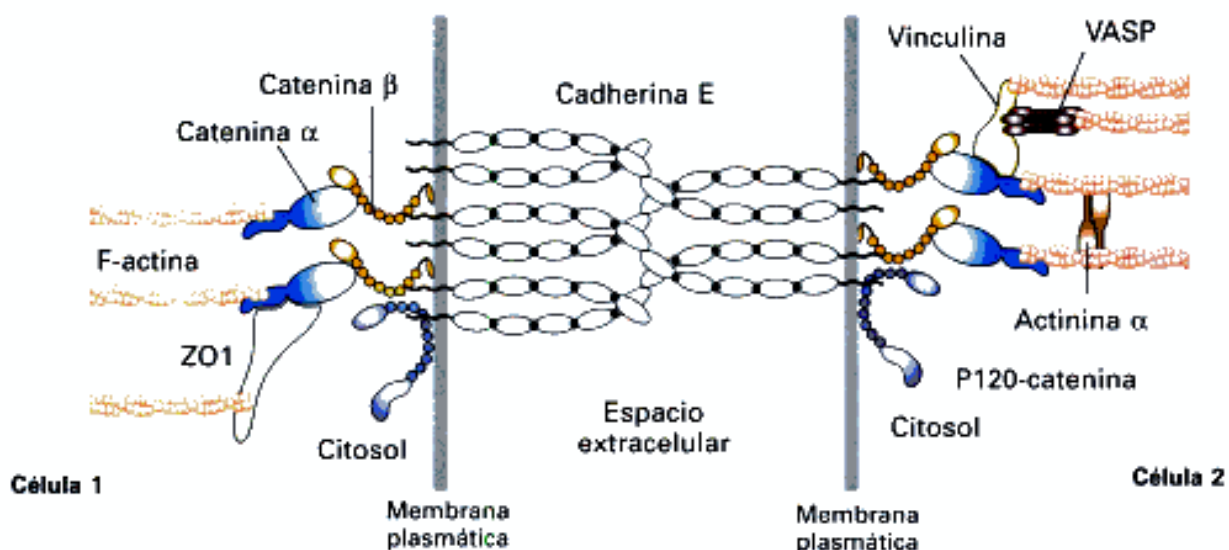


Figura 6 Cadherina lugares de adhesión. El dominio citoplasmático de las cadherinas se une a la actina a través de proteínas intermedias cuyo conjunto recibe el nombre de complejo de las cateninas. El complejo comprende cateninas (alfa, beta y gamma) y proteínas de una unión a actina, P120-catenina, vinculina.

Lodish Harvey & Berk Arnold. Biología Celular y Molecular. 5ta Edición. Capítulo 6. Integración de células en tejidos. Pág. 204.

Una molécula de cadherina está formada por tres regiones: la región extracelular que contiene un grupo amino. Esta región contiene los sitios que determina la especificidad de la molécula para unirse a otras moléculas. Después de la N-terminal se encuentra la región transmembranal, que atraviesa la membrana celular. En el citoplasma de la célula se ubica la región intracelular o carboxiterminal, esta región conecta las cadherinas con los filamentos de actina al citoesqueleto, unión que es necesaria para estabilizar la adhesión intercelular dependiente de cadherinas.

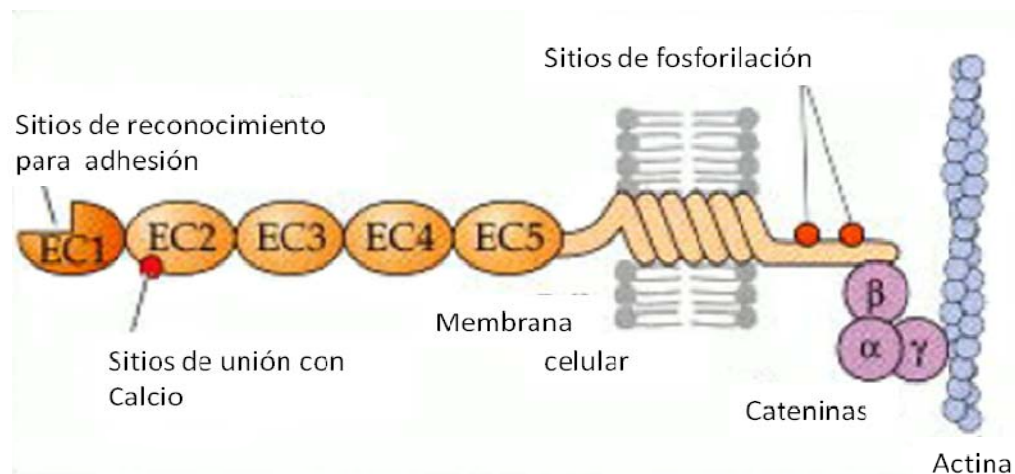


Figura 7 Cadherina estructura.

Las cadherinas poseen tres regiones: extracelular, transmembranal e intracelular. La región extracelular que contiene sitios que van a permitir la unión con otras proteínas, está formada por cinco dominios (EC1 hasta EC5), estos dominios contienen sitios de unión a iones calcio los cuales tienen una función de protección frente a enzimas de degradación.

Modificada de http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cad_Est.png

Miembros de la familia de la cadherina están organizados en sitios de unión célula-célula llamados uniones adherentes las cuales contienen una capa citoplasmática asociado con el citoesqueleto de actina. Los dominios citoplasmáticos de cadherinas interactúan con los componentes citoplasmáticos alfa, beta y gamma catenina que median el enlace con los filamentos de actina (Nagafuchi and Takeichi 1998; Ozawa et al., 1989, 1990; Reynolds et al., 1994; Shibamoto et al., 1995)

En estudios en los cuales se produjo una interferencia en la actividad de la cadherina endógena se observó que se perturbó la localización de las células alfa productoras de glucagón en la periferia de los islotes pancreáticos (Dahl et al. 1996)

Varias observaciones sugieren que las moléculas de adhesión están involucradas con la actividad secretora de insulina de las células beta: Bajo condiciones que estimulan la secreción de insulina se observó la expresión rápida de PSA- NCAM en la superficie de las células beta fueron observadas bajo condiciones que estimulan la secreción de insulina (Kiss et al., 1994) El bloqueo de la adhesión celular mediado por E-cadherina en los islotes pancreáticos bloqueó la secreción de insulina y el incremento de Ca^{++} intracelular, estimulado por la glucosa, lo que sugiere que la pérdida de E-cadherina en las células beta están asociadas con la inadecuada secreción de insulina (Yamagata et al., 2002). Finalmente los niveles de expresión de E-

cadherina fue reducido en un modelo de animales con diabetes tipo 2, en los cuales la estructura normal de los islotes fue modificada (Shin et al., 2002).

2.2.4 Desarrollo postnatal del islote pancreático.

El islote pancreático se diferencia en las etapas embrionarias (Seymour et. al., 2011), es en este lapso de tiempo cuando se genera la diversidad celular de linaje pancreático (Gilbert, 2003). Pero es hasta después de la ablactación cuando el desarrollo normal de la célula beta culmina en dos eventos cruciales de maduración:

- A) Se perfecciona la maquinaria sensora de glucosa y se aumenta la producción de insulina por célula, lo que resulta en la maduración de la secreción de insulina en respuesta a glucosa (Kim, et al., 2006; Bruin, et al., 2008).
- B) Se establece un número suficiente de células beta en proporción con el peso corporal del individuo (Teta et al. 2005; Meier, et al., 2008), y se lleva a cabo la remodelación del islote pancreático, el cual adquiere la citoarquitectura típica de un islote adulto (Habener et al., 2005; Liang et al., 2008).

Dichos procesos determinan la maduración del islote, lo que marca el final de los procesos de desarrollo encaminados a alcanzar la plena capacidad funcional de la célula (Gilbert, 2003). Cabe señalar que este periodo se considera una ventana crítica postnatal para el islote donde es dúctil a factores externos (Lucas, 1998; Aguayo et al., 2006).

2.2.4.1 Ventana crítica postnatal

Una ventana crítica es definida como un periodo de cambios importantes tanto estructurales como funcionales que se dan durante el desarrollo normal de un órgano cuando este es expuesto a cambios en su medio que podría originar consecuencias en la vida tardía (Lucas A, 1998). El desarrollo pancreático postnatal temprano, es de vital importancia para alcanzar un efectivo control de su glicemia en los adultos.

Las células beta fetales y neonatales muestran una secreción de insulina escasa y sin respuesta a la glucosa, comparada con las células beta de los animales adultos (Hughes SJ, 1994, Heinze E, et al. 1971). Esta condición refleja una inmadurez funcional. Durante el primer mes de vida de manera normal. Los roedores son expuestos a cambios críticos que empiezan con el nacimiento, seguidas de un periodo de lactancia y finalmente el destete que se produce alrededor del día 21. Se ha observado una disminución de la proliferación de la célula beta y un

incremento en los eventos apoptóticos cuyo pico ocurre entre los días postnatales d13 y d17 (Scaglia L., et al. 1997). No se encuentra bien determinado cuando es el momento en el que se adquiere la respuesta adecuada de secreción de insulina estimulada por glucosa, sin embargo, se cree que este cambio está dado en etapas tempranas del destete y podría estar asociada por una reorganización morfofisiológica del islote, lo cual también se observa en este periodo.

El tamaño de los islotes, su número y composición, pueden ser alterados en respuesta a cambios nutricionales (Petrik J, et al., 2001) Se ha encontrado que las dietas con un alto contenido de carbohidratos durante la lactancia pueden causar hiperinsulinemia y obesidad en las ratas adultas (Aslinkeel R, et al., 2001, Srinivasan M, et al., 2001). Estas modificaciones podrían derivar en un alto riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 (Aslinkeel R, et al., 2001; Srinivasan M, et al., 2001).

2.2.4.2 Genes y factores transcripcionales en el desarrollo postnatal.

El desarrollo y la maduración de las células beta después del nacimiento ha sido reconocida por más de 40 años, sin embargo, los mecanismos de esta maduración postnatal aun no son muy claros. La maduración de las células beta viene acompañada por cambios en la expresión de varios marcadores. Recientemente, Aguayo-Mazzucato et al. (2011) indicó en células beta de ratas recién nacidas que los mRNAs de Insulina2, Glut2, Glucocinasa en esas células estuvieron expresados aproximadamente en un 10% de los niveles que se expresan en las células beta adultas. Entre los factores transcripcionales que regulan la maduración de las células beta adultas como Pdx1, NeuroD1, MafA, Nkx6.1 y Mafb muestran un incremento en la expresión al destete en comparación al momento del nacimiento. Al día postnatal 2 los factores transcripcionales Pdx1, NeuroD1, MafA, Nkx6.1 y Mafb, poseen una expresión de tan solo el 3 al 12% de la expresión de un adulto, presentando un incremento sostenido entre los días postnatales 7 y 9, sin embargo, al día postnatal 7 la expresión de Pdx1 y NeuroD1 no difiere de un adulto, en contraste con la expresión de MafA que permanece significativamente más baja que la de un adulto hasta el día postnatal 21 (Aguayo-Mazzucato et al. 2011). Pdx1 es conocido por regular la expresión de genes claves en la célula beta en los que se incluyen Ins2 (insulina), Glut2 y Gck (glucocinasa). La inactivación de Pdx1 en ratones resulta en una reducción en la función de las células beta (Ahlgren et al. 1998). Se ha visto que MafA regula la expresión de genes involucrados en la biosíntesis y secreción de insulina (Zhang et al. 2005; Wang et al. 2007) una falta en la expresión de MafA conduce a una baja capacidad secreción de insulina en respuesta a secretagogos como la glucosa o al arginina (Zhang et al. 2005;

Artner et al. 2010), sin embargo una sobreexpresión de MafA en islotes de ratas neonatales fue suficiente para incrementar la expresión de genes claves en la función de las células beta y una mejora en la secreción de insulina en respuesta a glucosa a niveles cercanos a los de una célula beta adulta, ya que se ha visto que la sobreexpresión de Pdx1 incrementa el RNAm de MafA, NeuroD1, glucocinasa y el contenido de insulina. Pero la sobreexpresión de MafA resulta en un incremento del RNAm de NeuroD1 y Glucocinasa, pero no hay cambio en el contenido de insulina (Aguayo-Mazzucato et al. 2011). Un estudio reciente de Gu et al. (2010) señala el papel de NeuroD1 en el establecimiento y el mantenimiento de las células beta maduras.

3 ANTECEDENTES DIRECTOS DE ESTE TRABAJO

3.1 Efectos de la biotina sobre el islote pancreático en la post-ablactación.

Estudios que se encuentran realizándose en el laboratorio en ratones recién destetados de 21 días de nacidos que son alimentados con una dieta control o una dieta suplementada con biotina durante una semana han encontrado que el grupo que recibió la dieta suplementada adquiere la capacidad de secretar insulina en respuesta a concentraciones estimuladoras de glucosa (15.6 mM), secreción que no se produce en los ratones del grupo control sino hasta la segunda semana después del destete. Lo que sugiere que la vitamina acelera el proceso de maduración de la secreción de la hormona.

También se ha encontrado que la morfología del islote sufre transformaciones más rápidamente en los ratones que ingirieron la dieta suplementada con biotina. A través de estudios histológicos se observó que los ratones del grupo suplementado presentan mayor número de islotes por unidad de área del páncreas y un incremento en el tamaño de los islotes que el grupo control. También el análisis reveló que las formas típicas de islotes inmaduros (cúmulos celulares pequeños, aglomerados de células endocrinas acordonados con constricciones, células interconectadas de linaje endocrino que presentan una disposición alargada (Jo et al., 2011) disminuyeron en los ratones bajo la dieta rica en biotina.

Para averiguar si el incremento en el área total del islote está relacionado con cambios sobre la proliferación y la apoptosis, se analizaron estos procesos mediante citometría de flujo, encontrando un incremento en la tasa de proliferación en células beta aislada de ratones suplementados con la vitamina, lo que podría explicar el incremento en el área total del islote. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos en la tasa de muerte celular.

4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Estudios previos en el laboratorio (Lazo-de la Vega-ML, et al., 2012) encontraron que la administración a partir del destete de una dieta conteniendo concentraciones farmacológicas de biotina durante 8 semanas mejora la tolerancia a la glucosa y aumenta el tamaño de los islotes y la expresión de genes que regulan la producción y secreción de insulina, favoreciendo la funcionalidad y la masa de las células beta. Estos cambios podrían estar dados por cambios graduales como resultado crónico de la administración de la vitamina o bien estos aumentos podrían producirse de manera rápida en el periodo inicial del destete, una etapa en la cual se producen dinámicos cambios para perfeccionar la maquinaria sensora de glucosa, aumentar la producción de insulina (Kim, et al., 2006; Bruin, et al., 2008) y remodelar la estructura del islote.

5 JUSTIFICACIÓN

Estudios en proceso han revelado que la administración de la dieta suplementada con biotina produce cambios en la estructura de los islotes y en la secreción de la insulina desde la primera semana de la administración de la vitamina, lo que sugiere que la vitamina acelera la maduración del islote. En este trabajo investigamos los cambios que se producen sobre la expresión de genes en este período de cambio en la arquitectura y la secreción de la insulina. Dado que se conoce poco sobre los eventos moleculares que suceden durante el periodo de post-ablactación, los cambios que produce la biotina servirán para el entendimiento de mecanismos moleculares que participan en la maduración del islote.

6 HIPOTESIS

Los cambios en la expresión de genes en el islote que produce la administración de una dieta suplementada con biotina durante las 8 semanas, ocurren en las etapas tempranas del destete.

7 OBJETIVO GENERAL.

Analizar el efecto de la suplementación de biotina durante la primera semana de tratamiento posterior al destete sobre la expresión de genes en el islote que se encontraron modificados a las 8 semanas de la administración de la dieta.

7.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Analizar el efecto de la suplementación de biotina durante la primera semana de tratamiento posterior al destete sobre la expresión de genes de proteínas que participan en la producción y la secreción de la insulina.
2. Analizar el efecto de la suplementación de biotina durante la primera semana de tratamiento posterior al destete sobre la expresión de genes de proteínas que participan en la estructura del islote.
3. Analizar el efecto de la suplementación de biotina durante la primera semana de tratamiento posterior al destete sobre la homeostasis de la glucosa.

8 METODOLOGÍA

8.1 Dietas experimentales

- Dieta control: dieta que contiene 0.8 mg de biotina total por kg de alimento.
- Dieta suplementada: dieta cuya cantidad de biotina total fue de 100 mg / kg de alimento.

Para la elaboración de las dietas control y suplementada, se partió de una dieta base: dieta Teklad Global 18% Protein Rodent Diet (Sterilizable) **2018S** de Harlan, la cual previamente fue triturada, en el caso de la dieta suplementada se añadió el excedente de biotina, se mezcló, se formaron nuevamente los pellets, posteriormente fueron secados y esterilizados, procedimiento que se realizó simultáneamente tanto para la dieta control como para la dieta suplementada. Día

Composición de la dieta control y suplementada utilizada en la experimentación:

COMPONENTES	CONTROL (ESTÉRIL)	SUPLEMENTADA (ESTÉRIL)
Información de macronutrientes		
Proteína cruda	18.6%	18.6%
Grasas	6.2%	6.2%
Fibra Cruda	3.5%	3.5%
Densidad energética	3.1 kcal/g	3.1 kcal/g
	13.0 kJ/g	13.0 kJ/g
Calorías por proteína	24%	24%
Calorías por Grasas	18%	18%
Calorías por Carbohidratos	58%	58%
BIOTINA	0.80mg/kg	100mg/kg

Tabla 1 Composición de la dieta.

8.2 Modelo animal de experimentación

Ratones de la cepa BALBc/AnN Hsd, machos de 21 días de nacidos, que se mantuvieron en el bioterio con ciclos de 12 horas de luz y 12h oscuridad, con un consumo de agua y alimento al *libitum*. Todos los procedimientos se realizaron con la aprobación del Comité Ético de Experimentación del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los animales fueron divididos en dos grupos. El grupo control que recibió una dieta que contiene 0.8 mg de biotina total por kg de alimento; el grupo suplementado recibió una dieta cuya cantidad de biotina total fue de 100 mg / kg de alimento, durante un periodo de 7 días.

8.2.1 Grupos experimentales.

Dada la importancia de utilizar ratones, exactamente de 21 días de nacidos, se procedió a realizar las cruces con ratones BALBc/AnN Hsd machos y hembras adultos de aproximadamente 8 semanas de edad, se colocaron 3 hembras y un macho por jaula, a los tres días los machos fueron retirados para posteriormente esperar entre 19 a 21 días, tiempo que dura la gestación, una vez registradas las fechas de nacimiento el tratamiento inició a los 21 días de lactancia.

Los ratones machos se destetaron y dividieron en dos grupos; control y suplementado, los cuales fueron alimentados por 7 días, pasados los cuales se les privó del alimento durante aproximadamente 16h previas al sacrificio. Este día se procedió a anestésiar a los ratones con Sevoflurane® (Sevoflurane, Abbott Laboratories, Mexico DF, Mexico), posteriormente se les extrajo el páncreas para el inmediato aislamiento de islotes.

8.3 Monitoreo del peso de los animales y del consumo de alimento

El monitoreo de peso de los animales y del alimento consumido, se realizó día a día durante todo el periodo de tratamiento a partir del día 1 del destete hasta el día de su sacrificio, utilizando una balanza analítica.

8.4 Ensayos

8.4.1 Prueba de tolerancia a la Glucosa:

Cumplidos los 6 días de alimentación, los ratones control y suplementados fueron privados del alimento por 16h. Se realizó una medición inicial de glucosa en sangre determinada como tiempo cero (T=0), las concentraciones de glucosa se determinaron a partir de muestras de sangre tomadas de la vena de la cola, utilizando un glucómetro (Precisión QID, MediSense, Inc., Abbott Laboratories Company, Mexico City, Mexico) luego de 15, 30, 60 y 120 minutos de haber administrado vía intraperitoneal una dosis de glucosa de 2 g / kg de peso del animal.

8.4.2 Prueba de tolerancia a la Insulina:

La curva de tolerancia a la insulina fue realizada luego de 7 días de tratamiento. Se realizó una medición inicial de glucosa en sangre determinada como tiempo cero (T=0), las concentraciones de glucosa se determinaron a partir de muestras de sangre tomadas de la vena de la cola, utilizando un glucómetro (Precisión QID, MediSense, Inc., Abbott Laboratories

Company, Mexico City, Mexico) después de 15, 30, 60 y 90 minutos de haber administrado 1U / Kg de insulina intraperitonealmente, en los animales control y suplementado

8.4.3 Extracción de islotes

Los islotes pancreáticos fueron aislados mediante una digestión con colagenasa tipo 4 (Sigma-Aldrich, Saint Louis), Los páncreas extraídos fueron colocados en una solución salina balanceada de Hank's al 0.5% BSA (w/v) y antibiótico Gentamicina (1 ul/ml). Posteriormente se lavó y se tamizó el homogenado para eliminar grasa y sangre. Los islotes se separaron del resto del tejido acinar por medio de un gradiente de Ficoll (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO). Para finalmente ser recuperados con la ayuda de un microscopio estereoscópico, y agrupados en grupos de 200 a 300 islotes.

8.4.4 Extracción de RNA total de los islotes pancreáticos

El RNA total fue extraído de muestras, utilizando Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA), de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Todo el material empleado en la extracción fue previamente esterilizado y tratado con dietilpirocarbonato (DEPC) para evitar degradación del RNA.

La cantidad y pureza de RNA fue determinada por espectrofotometría, donde se considera que su pureza es aceptable si la muestra tiene un cociente de valores de absorbancia a $A_{260}/A_{280} > 1.8$.

8.4.5 Obtención del cDNA

A partir del RNA total extraído, se obtuvo el DNA complementario (cDNA), mediante una reacción de transcripción inversa. Se utilizó 0.4 ug del RNA total, preparando una reacción con un volumen final de 20 ul, a la cual se adicionó:

- 4 μ l por cada muestra de buffers 5x [250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂]
- 1 μ l por cada muestra de Dithiothreitol 0.1mM
- 2 μ l por cada muestra de dNTPs 5mM (dCTP, dATP, dGTP, dTTP)
- 1 μ l por cada muestra de oligo dT primers
- 1 μ l por cada muestra de transcriptasa reversa MMLV RT 200 U

La mezcla se llevó a un volumen final de 20ul, con agua DPEC, se incubo a 37°C por 50 minutos y 70°C por 15 minutos. Para almacenarlo a -20°C, hasta el momento de ser procesado. Todo el material utilizado fue de Invitrogen, Carlsbad, CA.

8.4.6 Ensayos de PCR en Tiempo Real

Al término del periodo experimental se determinaron los niveles de RNAm de los genes de interés, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus iniciales en ingles), técnica que permitió la amplificación y la obtención de múltiples copias de un fragmento del DNA específico, por acción de la DNA polimerasa, mediante la detección y cuantificación de un fluoróforo reportero, (FAM y VIC TaqMan® de Applied Biosystems), ligado al extremo 5' de una sonda de hibridación para ese gen, esta señal irá aumentando de manera proporcional a la cantidad del producto de PCR en la reacción. En la fase de extensión del ciclo del PCR, se rompe la sonda de hibridación por Taq DNA polimerasa, se libera el fluoróforo reportero el cual emite la fluorescencia, que es detectada por el termociclador ABI-PRISM 7300 Applied Biosystems, que cuantifica la señal emitida por el fluoróforo reportero en tiempo real.

La fluorescencia emitida a la mitad de la fase exponencial se utilizó para la cuantificación. Esto es determinado por la identificación del número de ciclos al cual la intensidad de emisión del fluoróforo aumenta con respecto a la fluorescencia de fondo: es decir 10 veces más la desviación estándar de la línea base.

Este número de ciclo se llama ciclo umbral (Ct: threshold cycle). El Ct está determinado en la fase exponencial de la reacción y no al punto final del ciclo. El Ct es inversamente proporcional al número de copias del templado, por lo tanto a mayor concentración del templado, menor Ct medido.

Se utilizaron sondas para la amplificación de: Homeobox1 pancreático y duodenal (Pdx1), Forkhead box A2 (Foxa2), Glucoquinasa (Gck), Insulina 2 (Ins2), Canales de calcio dependientes de voltaje tipo L-alfa (Cacna1d), Molécula de adhesión neural 1 (Ncam1), Chadherina 1 o Cadherina E (Cdh1), Actina-beta (Act β) y el gen 18s ribosomal como control interno que fueron diseñadas en base a la secuencia reportada por el Gene Bank y fabricadas por Applied Biosystems.

GEN DE INTERÉS	Identificación en Applied Biosystems (Assay ID)
Foxa2 (Forkhead box A2)	Mm00839704_mH
Pdx1 (Pancreatic and duodenal homeobox 1)	Mm00435565_m1
Gck (Glucokinase)	Rn00561265_m1
Ins2 (Insulin 2)	Rn01774648_g1
Cacna1d (Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha)	Mm00551384_m1
Actb (actin, beta)	Rn00667869_m1
Ncam1 (neural cell adhesion molecule 1)	Mm00456815_m1
Cdh1 (Cadherin 1 o Cadherin E)	Mm 01247357_m1

Tabla 2 Genes analizados. Ensayos de Applied Biosystems para evaluar la expresión genética (TaqMan® Gene Expression Assays) cada ensayo contiene dos oligonucleótidos de inicio y una sonda capaz de emitir fluorescencia.

La reacción se llevó a cabo con el termociclador ABI Prism 7000, los resultados se registraron utilizando un software de ABI Prism 7000 SDS, versión 1.1, cada reacción se hizo por triplicado siguiendo el protocolo del fabricante (Applied Biosystems). Como control interno se utilizó el ensayo de expresión genética del RNAr 18S.

8.4.6.1 Análisis de la expresión relativa

Se obtuvo el Ct. La relación de expresión del gen problema fue determinado por $2^{-\Delta\Delta Ct}$ donde:

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (gen suplementado) - ΔCt (gen control) si el

ΔCt (gen suplementado) = Ct (gen problema) - Ct (gen de referencia) y el

ΔCt (gen control) = Ct (gen problema) - Ct (gen de referencia)

8.5 Análisis estadístico

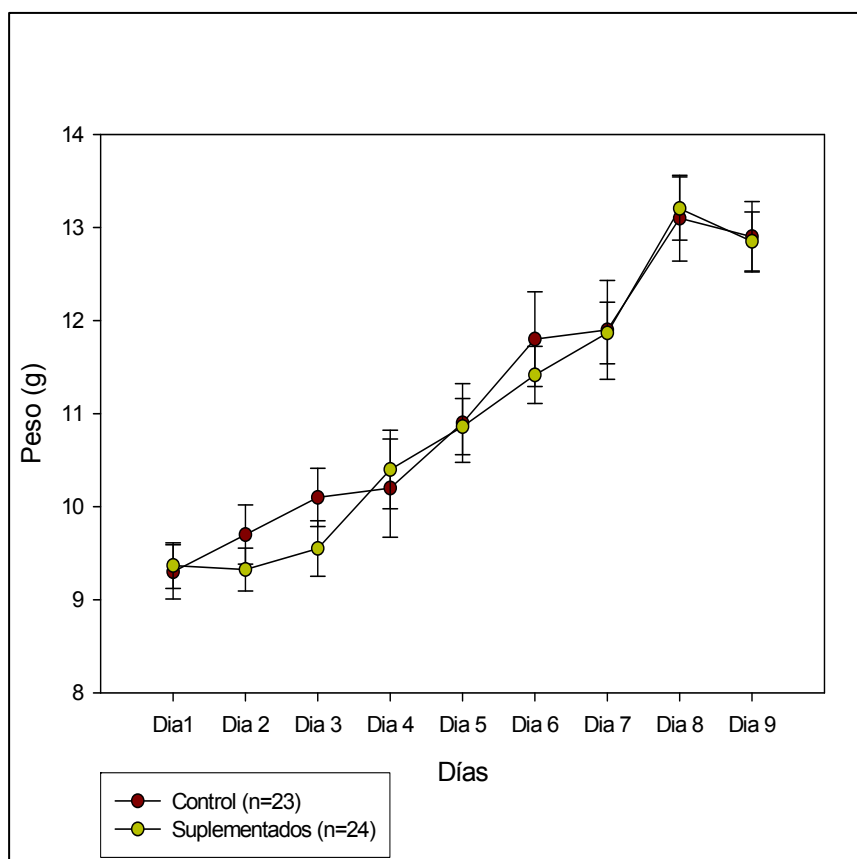
Los datos que se presentan en este trabajo corresponden a la media \pm error estándar, donde **n** representa el número de animales que fueron utilizados en el experimento. El análisis estadístico se realizó con el software v.4.5 Statview (Abacus Concepts, Berkeley, CA, EE.UU.). Los datos se analizaron por medio de una prueba de t de Student. Los valores de **p menores a 0.05** son considerados como estadísticamente significativos

9 RESULTADOS

9.1 Monitoreo de peso de los animales control y suplementados.

El peso de los animales fue registrado a lo largo del experimento. **La Gráfica de curva de crecimiento** indica el peso promedio en gramos de ratones BALB/cAnN Hsd, controles y suplementados durante los 7 días de tratamiento. Se observa una ganancia diaria de peso tanto para los controles como los suplementados durante los 7 días; la baja que se observa al día 8, día de sacrificio se debe a que los animales se encontraban en ayuno. La suplementación con biotina no modificó el peso corporal de los ratones (control: 12.9 ± 0.3 g, suplementado: 12.85 ± 0.3 g).

Gráfica 1. Curva de crecimiento

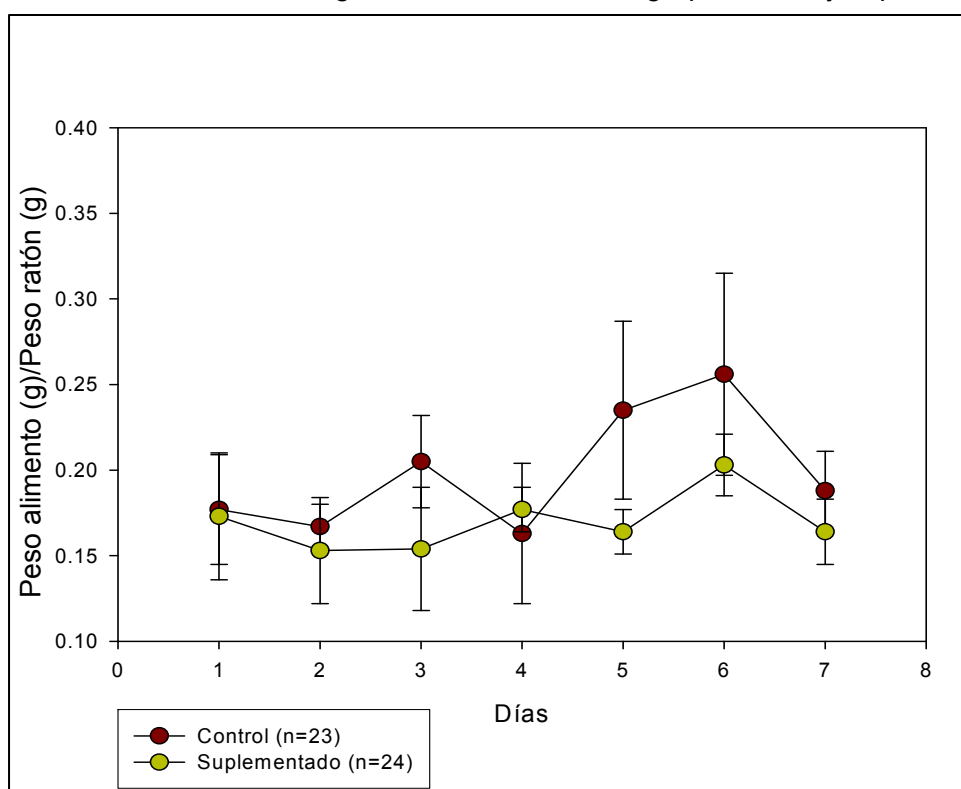


Gráfica 1. Peso en gramos presentados diariamente durante la experimentación de ratones control (círculos marrón) y ratones suplementados con biotina (círculos verdes). Los datos representan la media \pm ES del grupo control con una $n=23$ comparado con el suplementado $n=24$ ratones. Datos presentados como media \pm Error estándar.

9.2 Monitoreo del consumo de alimento en los grupos controles y suplementados

La **gráfica 2** indica el peso promedio del consumo de alimento en gramos por gramo de peso de ratón, durante los 7 días de alimentación. Al finalizar el periodo de administración de las dietas de biotina, la ingesta diaria promedio de alimento fue de 0.19 ± 0.013 g de alimento/g peso corporal para el grupo control y 0.18 ± 0.006 g de alimento/g peso corporal para el grupo suplementado. Los resultados indican que durante los días de experimentación no existieron diferencias significativas entre la cantidad de alimento consumido, por los ratones suplementados y los controles.

Gráfica 2. Curva de ingesta de alimento en el grupo control y suplementado

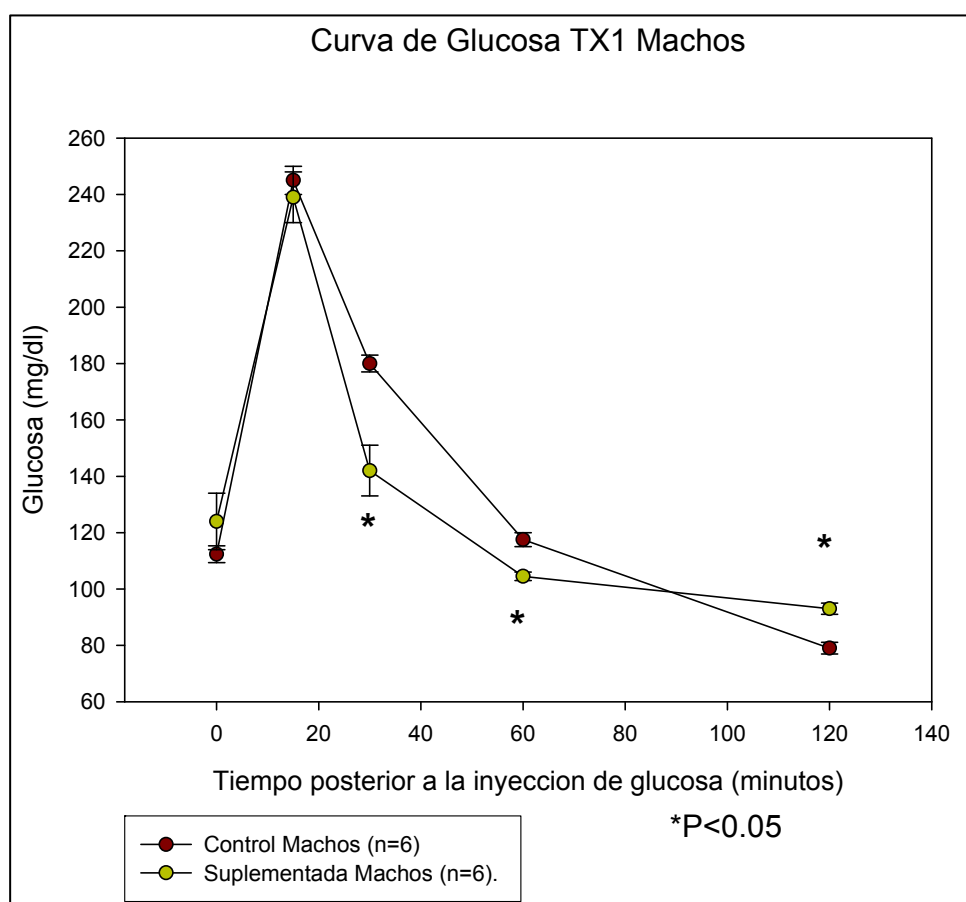


Gráfica 2. Peso en gramos de alimento/gramos de peso corporal presentados durante los 7 días de experimentación. Ratones control (círculos marrón) y ratones suplementados con biotina (círculos verdes). Los datos representan la media \pm ES del grupo control con una $n=23$ comparado con el suplementado $n= 24$ ratones. **Datos presentados como media \pm Error estándar**

9.3 Curva de tolerancia a glucosa

Esta se realizó al sexto día de tratamiento. De acuerdo con el patrón de las curvas de tolerancia a la glucosa, se observó un aumento en los niveles de glucosa a los 15 minutos con una subsecuente disminución de los niveles de glucosa sanguínea. La comparación entre las curvas correspondientes a los ratones control con respecto a los suplementados reveló que las concentraciones de glucosa son menores en los ratones del grupo suplementado a los 30 y 60 minutos, en tanto que existe un aumento al minuto 120 con respecto a su control. Estos datos son un indicativo de una mejor tolerancia a la glucosa por parte del grupo suplementado con respecto al control.

Gráfica 3 Curva de tolerancia a la glucosa, grupos control y suplementado



Gráfica 3 Curva intraperitoneal de tolerancia a la glucosa de ratones control (círculos marrón) y ratones suplementados con biotina (círculos verdes). Los datos representan la media \pm ES. *p<0.05 comparado con el control, n=6 ratones por grupo experimental. Datos presentados como media \pm Error estándar.

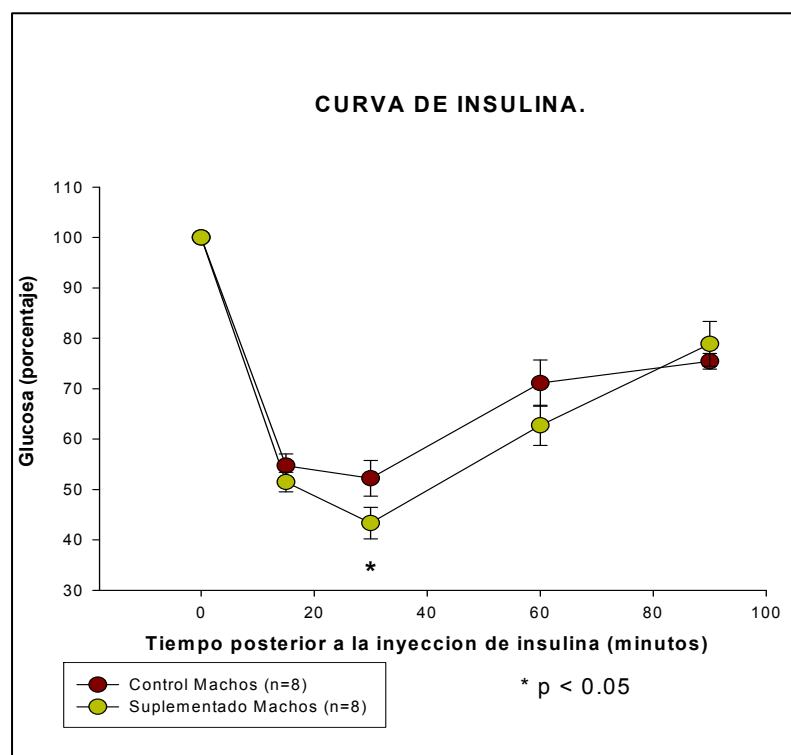
Prueba T-student, *diferencia estadísticamente significativa *P<0.05 con respecto a su control

Tabla 3. Valores de glucosa en sangre en la curva de tolerancia a la glucosa.

	VALORES DE GLUCOSA EN SANGRE (mg/dL)				
	T0	15min	30min	60min	120min
<i>Control</i>	112.33 ± 2.96	245 ± 5	180 ± 3	117.5 ± 2.5	79 ± 20.8
<i>Suplementado</i>	124 ± 10	239 ± 9	142 ± 9 *	104.5 ± 1.5*	93 ± 2 *

9.4 Curva de tolerancia a la insulina

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. De acuerdo con el comportamiento típico de esta prueba existió una disminución de las concentraciones de glucosa sanguínea en los minutos 15 y 30 con un aumento progresivo en los niveles de glucosa en sangre hasta recuperar los niveles iniciales. Los resultados encontraron que los ratones suplementados con biotina presentan niveles significativamente menores de glucosa en sangre al minuto 30 con respecto a los del grupo control, lo que indica que la suplementación con biotina durante 7 días aumenta la sensibilidad a la insulina.

Gráfica 4. Curva de tolerancia a la insulina, grupos control y suplementados

Gráfica 4. Curva intraperitoneal de tolerancia a la insulina de ratones control (círculos marrón) y ratones suplementados con biotina (círculos verdes). Los datos representan la media \pm ES. $P < 0.05$ comparado con el control, $n=8$ ratones por grupo experimental. Datos presentados como media \pm Error estándar. Prueba T-student, *diferencia estadísticamente significativa $*P < 0.05$ con respecto a su control

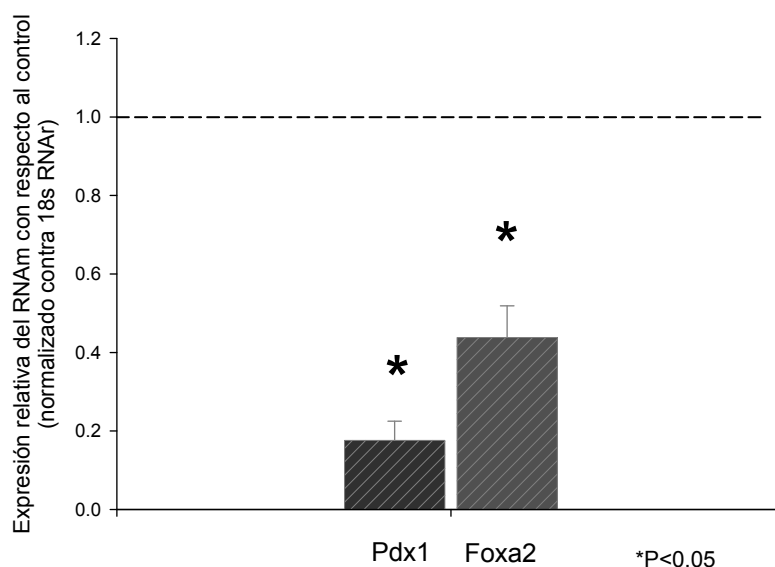
Tabla 4 Valores de glucosa en sangre en la curva de tolerancia a la insulina, expresados en porcentaje con respecto al tiempo cero.

	VALORES DE GLUCOSA EN SANGRE (porcentaje)				
	T0	15min	30min	60min	90min
Control	100 \pm 0	54.8 \pm 2.1	51.6 \pm 3.6	71.2 \pm 4.4	75.6 \pm 1.6
Suplementado	100 \pm 0	51.6 \pm 2.0	43.6 \pm 2.8	62.8 \pm 4	79.2 \pm 4

9.5 Expresión de genes en el islote pancreático.

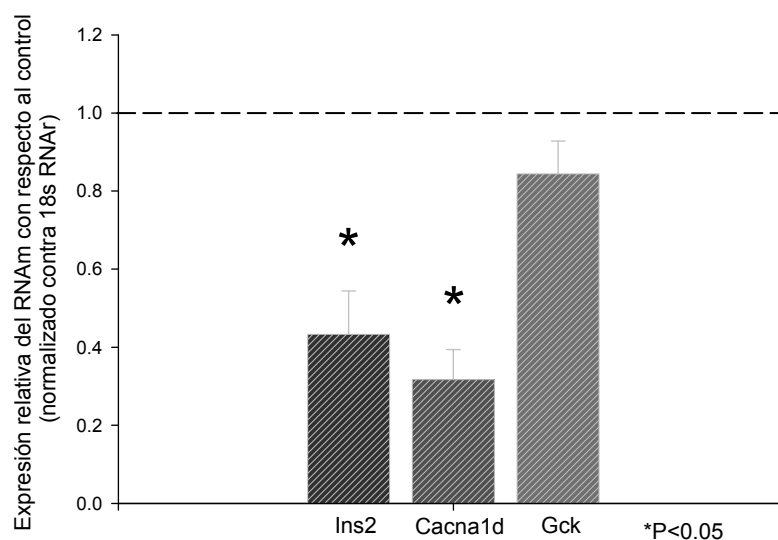
9.5.1 Expresión de factores transcripcionales y genes relacionados con la secreción de insulina

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, decidimos analizar la expresión de factores transcripcionales de la célula beta. Se procedió a analizar la expresión del RNAm de Pdx-1 y Foxa-2, factores transcripcionales críticos en la expresión de genes que participan en la secreción de la insulina y la expresión de la misma, que a las ocho semanas de tratamiento con biotina mostraron aumentos en su expresión. Los resultados revelaron que la administración durante 7 días de una dieta suplementada con biotina produjo una disminución significativa ($*p<0.05$) en el RNAm de los dos factores transcripcionales, observándose que Pdx-1 se expresó únicamente en un 17.6% (0.17 ± 0.05) y el factor transcripcional Foxa2 (forkhead box A) en tan solo el 43.7% (0.43 ± 0.08) para el factor transcripcional Foxa2 (forkhead box A).



Gráfica 5 Perfil de expresión de factores transcripcionales que regulan la secreción de insulina, Pdx1 y Foxa2 en respuesta a la suplementación 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. $*p<0.05$ comparado con la expresión del control. $n=6$ grupos de 200 islotes por condición experimental. En función del tratamiento con biotina (Con = control, Sup = suplementada). Factores transcripcionales: Pdx-1, Pancreatic and duodenal homeobox 1; Foxa2, Forkhead box A2. $n = 6$ muestras, $*P<0.05$

También examinamos la expresión del gen de la insulina, así como la de diversos genes que participan en la secreción de insulina en respuesta a glucosa. Se observó que la suplementación con biotina provocó una disminución significativa en la abundancia del RNAm del gen de insulina expresándose en tan solo el 43.3% (0.43 ± 0.11). De manera similar la expresión del gen que codifica para los canales de calcio dependientes de voltaje, necesarios para la entrada e incremento de calcio intracelular y el subsecuente movimiento de los gránulos de insulina disminuyó al 31.7% (0.31 ± 0.07). Sin embargo no se observan cambios significativos en la expresión de glucocinasa, enzima responsable de la fosforilación de glucosa, considerada el sensor de glucosa en el proceso de secreción de la hormona en respuesta a la glucosa.

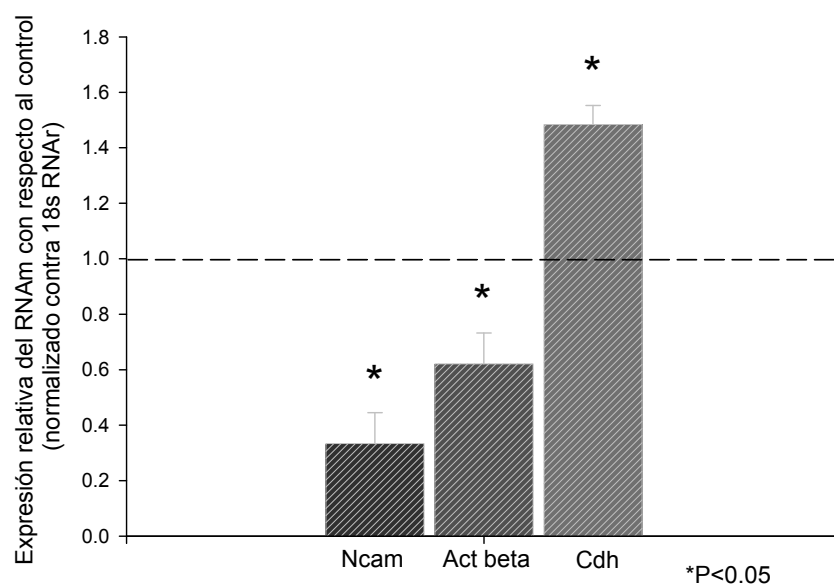


Gráfica 6 Perfil de expresión de genes que participan en la secreción de insulina en respuesta a la suplementación con biotina, Ins2, Cacna1d y Gck

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. * $p < 0.05$ comparado con la expresión del control. $n = 6$ grupos de 200 islotes por condición experimental. En función del tratamiento con biotina (Con = control), (Sup = suplementada). Gck = Glucocinasa, Ins2 = insulina, Cacna1d = Canales de calcio dependientes de voltaje. $n = 6$ muestras, * $P < 0.05$

9.5.2 Efectos de la suplementación con biotina sobre la expresión de moléculas de adhesión en la estructura del islote:

Se ha observado que la molécula de adhesión NCAM-1 juega un papel crucial en la distribución celular dentro del islote, y participa en la distribución subcelular de cadherinas y redes de actina. Por otro lado, la Cadherina 1 (Cdh1, también llamada E-cadherina) participa en la agregación de las células del islote. Al evaluar la expresión de estas proteínas encontramos que la suplementación con biotina durante una semana provocó una disminución significativa para el mensajero de Ncam (Neural cell adhesion molecule 1) al 33.4% (0.33 ± 0.11). De igual forma la expresión del gen que codifica para Actina beta, disminuyó al 62.1% (0.62 ± 0.11). Sin embargo, el gen que codifica para Cadherina aumentó su expresión al 148.4% (1.48 ± 0.06)



Gráfica 7 La suplementación con biotina modifica la expresión de genes que codifican para moléculas de adhesión del islote pancreático, Ncam, Act-β y Cadherina.

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, Ncam (Neural cell adhesion molecule), Act-β (Actina-Beta) y Cdh (Cadherina) 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 ± ES. *p<0.05 comparado con la expresión del control. n=6 grupos de 200 islotes por condición experimental.

9 DISCUSION

A diferencia de los resultados de nuestro trabajo previo que encontró que ocho semanas de una dieta conteniendo concentraciones farmacológicas de biotina incrementa la expresión del RNAm de: a) insulina, b) proteínas que participan en la secreción de insulina: *glucocinasa*, el canal de calcio *Cacna1d*, c) factores transcripcionales determinantes en el desarrollo del islote que en la etapa adulta regulan la transcripción y secreción de insulina, como *Foxa2* y *Pdx1*; los resultados de este trabajo encontraron que, a excepción de la expresión del gen de la *glucocinasa*, las expresiones de *Cacna1d*, *Foxa2*, *Pdx1* e *insulina* disminuyeron a la primera semana de tratamiento. Estos resultados no apoyan nuestra hipótesis inicial que esperaba que los aumentos producidos a las 8 semanas de tratamiento se realizaran en los primeros días después del destete un periodo en el que el islote es muy dúctil.

La disminución en la expresión de genes importantes en la producción y secreción de la insulina y en el desarrollo del islote como *Cacna1d*, *Foxa2*, *Pdx1* e *insulina* no se encuentra acorde con observaciones en nuestro laboratorio (Tesis Doctoral de Maura Flores, en proceso) que indican que durante este periodo la biotina aumenta la maduración del islote y la secreción de la insulina inducida por la glucosa; ni con los resultados en las curvas de tolerancia a la glucosa obtenidas en esta tesis que muestran capacidad de respuesta al reto de glucosa.

Una explicación de la menor expresión de genes críticos del desarrollo del islote, a pesar de evidencias que apoyan que la administración de la dieta suplementada con biotina a la primera semana después del destete posee efectos benéficos en la maduración del islote y la secreción de la insulina, podría estar dada por una reversión a un abrupto aumento en el RNAm y proteínas de estos genes en tiempos anteriores a los 7 días de tratamiento; ya que en otros estudios (Tesis Doctoral de Dolores Ronquillo, en proceso) se observa un aumento pronunciado en el RNAm de Cyp-1a hepático en el primer día de tratamiento, proseguido por disminuciones en el contenido del RNAm en los días posteriores. Por lo que en trabajos futuros será necesario comparar la expresión del RNAm de los genes analizados en este trabajo a periodos menores a una semana de la administración de las dietas.

Dado que Foxa2 y Pdx-1 se encuentran río arriba de la expresión de la glucocinasa (Lazo de la Vega, Factores transcripcionales de la célula beta 2009) podría esperarse que la expresión de esta enzima estuviese disminuida como la expresión del gen de la insulina, sin embargo, no hubo diferencia en la expresión del mensajero esta enzima. Estos datos sugieren que otros factores transcripcionales además de Pdx-1 y Foxa-2 participan en la expresión de la glucocinasa. Entre los genes que podrían participar se encuentran MafA y Rfx3, factores cuya expresión emerge en etapas finales de maduración del islote y que regulan la expresión de la glucocinasa (Ait-Lounis A et al. 2010, Aguayo-Mazucatto 2011). El factor transcripcional Rfx3 aparece al final del desarrollo embrionario y es crítico en la expresión de la glucocinasa pero no de la insulina o de Pdx-1. Igualmente, el factor transcripcional MafA, cuya expresión irrumpe a partir del día 7 post-natal. La sobreexpresión de este factor regula la expresión de la glucocinasa, pero no de la insulina (Aguayo.Mazucatto 2011). Otro factor plausible es NeuroD1 quien se enlaza específicamente en una región comprendida dentro del promotor endógeno de glucocinasa de las células beta, activando la expresión del gen de glucocinasa. Por lo que podría ser posible que estos factores transcripcionales se encuentren compensando por la reducción de la red transcripcional de Foxa2 y Pdx-1.

Con respecto a la expresión de genes estructurales del islote nuestros resultados indican que, de igual manera al efecto observado sobre la expresión del ARNm genes del desarrollo del islote y de la síntesis y secreción de la insulina, existen divergencias entre el efecto producido por la dieta suplementada con biotina a la semana y a las ocho semanas de tratamiento. A diferencia del aumento en el ARNm de actina a las ocho semanas de la administración de la dieta, a la semana de tratamiento se observó una disminución; en tanto que la expresión de cadherina no se modificó a la octava semana pero a la primera se encontró aumentada. El único gen de los analizados en el que se observó un patrón similar de expresión en los dos periodos fue el de N-cam, cuyo mRNA mensajero disminuyó.

La cadherina es una molécula de adhesión que participa en la agregación de las células que forman en islote. Durante la maduración del islote en la etapa post-destete se promueve este proceso. En estudios histológicos encontramos que la administración de biotina durante una semana después del destete aumenta los agregados celulares del islote, en la aceleración de

este proceso podría estar participando el aumento en la expresión de cadherina que aquí reportamos.

N-cam1 participa en la distribución celular dentro del islote. En ratones knock-out homo- y hetero-cigotos para *N-cam1* se producen cambios en la cito-arquitectura del islote observándose un aumento en la localización de células alfa hacia el centro del islote. En nuestros estudios previos (Lazo de la Vega 2012) encontramos que a las ocho semanas de la administración de la dieta suplementada con biotina los ratones del grupo que recibió la vitamina presentó un porcentaje significativamente mayor de islotes con células-alfa al centro que los animales que recibieron la dieta control. La menor expresión de *N-cam* a la primera y a la octava semana de la administración de la dieta rica en biotina sugiere que la mayor distribución central de las células-alfa podría estar dada desde el inicio de la dieta. Sin embargo, en estudios histológicos hemos encontrado que el patrón de maduración normal durante el periodo posterior al destete la distribución de las células alfa hacia la periferia se va incrementando conforme el tiempo y que en el grupo suplementado con biotina porcentaje significativamente mayor de sus islotes en formación presentan las células alfa localizadas en la periferia, lo que no resulta congruente con la disminución de la expresión de *N-cam* hace poco probable que la disminución de esta proteína se encuentre participando en los cambios en la distribución de los islotes. Los efectos de la biotina sobre la expresión de *N-cam* y de actina son puntos de interés en los que debe de ahondarse.

Los datos de esta tesis indican que la administración durante una semana de dieta suplementada con biotina además de modificar la expresión de genes en el islote produce cambios en la homeostasis de la glucosa. Los ratones del grupo que recibió la dieta suplementada con la vitamina presentaron una mejor tolerancia a la glucosa, encontrándose disminuciones más rápidas de la glucosa sanguínea a los 30 y 60 minutos de la prueba. Por otro lado la prueba de tolerancia a la insulina reveló una mayor sensibilidad a la hormona. Dado que la respuesta glucémica en la curva de tolerancia a la glucosa depende de la secreción de insulina en respuesta a la glucosa y a la capacidad de los tejidos periféricos para captar la glucosa dependiendo de su sensibilidad a la insulina, la conjunción de nuestras observaciones indican que los ratones suplementados con biotina poseen mejor tolerancia a la glucosa, debido a un aumento a la sensibilidad a la insulina. Investigaciones futuras analizarán los mecanismos moleculares que participan en el aumento de la sensibilidad a la insulina.

10 CONCLUSIÓN

En conclusión, las diferencias encontradas en la expresión de genes entre la primera y la octava semana de administración de la dieta suplementada con biotina sugieren que los efectos de la vitamina no se encuentran limitados al periodo temprano de post ablactación y que existen otros cambios durante el transcurso de la administración de la dieta. Estudios subsecuentes serán necesarios para determinar cuáles son estos cambios y los mecanismos moleculares que los producen.

11 REFERENCIAS

1. Aguayo-Mazzucato C, Koh A, El Khattabi I, LiW-C, Toschi E, Jermendy A, Juhl K, Mao K, Weir GC, Sharma A, et al. 2011. MafA expression enhances glucose-responsive insulin secretion in neonatal rat β cells. *Diabetologia* 54: 583–593.
2. Aguayo-Mazzucato C, Sanchez-Soto C, Godinez-Puig V, Gutierrez- OspinaG, Hiriart M. Restructuring of pancreatic islets and insulin secretion in a postnatal critical window. *PLoS ONE* 1:e35. (2006)
3. Ahlgren U, 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. *Gene Dev* 12(12): 1763-8 (1998)
4. Aikin R, Hanley S, Maysinger D, et al. Autocrine insulin action activates Akt and increases survival of isolated human islets, *Diabetologia* 49(12): 2900-09 (2006)
5. Ait-Lounis A et al. Rfx3 is required for the differentiation and function of mature β -cells and regulates the Beta-cell promoter of the glucokinase gene. *Diabetes* 59:1674– 1685, 2010
6. Aizawa, T. & Komatsu, M. Rab27a: A new face in beta cell metabolism-secretion coupling. *J Clin Invest* 115, 227-30. (2005)
7. Aizawa, T., Sato, Y. & Komatsu, M. Importance of nonionic signals for glucose-induced biphasic insulin secretion. *Diabetes* 51 Suppl 1, S96-8 (2002)
8. 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).
9. 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).
10. Aleshin AE, Zeng C, Bartunik HD, et al., Regulation of hexokinase I: crystal structure of recombinant human brain hexokinase complexed with glucose and phosphate. *J Mol Biol.* 282:345-357. (1998)
11. Artner I. et al. MafA y MafB Regulate genes Critical to Beta cells in a Unique Temporal Manner. *Diabetes.* 59(10):2530-9. (2010)
12. Aslinkeel R, et al. Programming into adulthood of islet adaptations induced by early nutritional intervention in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*281(3):E640-8. (2001)
13. Aslinkeel R, Srinivasan M, Song F, Patel MS,. Programming into adulthood of islet adaptations induced by early nutritional intervention on the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281: E640-E648 (2001)
14. Babenko AP, Bryan J. Sur domains that associate with and gate KATP pores define a novel gatekeeper. *J Biol Chem* 278: 41577–41580 (2003)
15. Baez-Saldana A, Camacho-Arroyo I, Espinosa-Aguirre JJ, et al. Biotin deficiency and biotin excess: effects on the female reproductive system. *Steroids* 74(10-11):863-869. (2009)
16. 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).

17. Bailey L.M., Ivanov R, A., Wallace J, C., Polyak S, W. Artifactual detection of biotin on histonas by streptavidin. *Anal Biochem.* 373 (1), 71-77 (2008)
18. Balmer, J.E. & Blomhoff, R. Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res* 43, 1773-808 (2002).
19. Baltrusch S, Lenzen S. Novel insights into the regulation of the bound and diffusible glucokinase un MIN6 beta-cells. *Diabetes* 56:1305-1315 (2007)
20. Benschoter, C.A. Effect of dietary biotin on reproduction of the house fly. *J Econ Entomol* 60, 1326-8 (1967).
21. Ben-Shushan E, Marshak S, Shoshkes M, Cerasi E, Melloul D. A pancreatic beta -cell-specific enhancer in the human Pdx1 gene is regulated by hepatocyte nuclear factor 3beta (HNF3beta), HNF-1alpha, and SPs transcription factors. *J Biol Chem* 276(20): 17533-40 (2001)
22. Bonjour, J. Biotin. in *Handbook of Vitamins: Nutritional, Biochemical and Clinical Aspects* (ed. Machlin, L.) 403 (Marcel Dekker, New York, 1991).
23. 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* 405(2): 359-67. (2007)
24. 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).
25. Bosco, D., L. Orci, and P. Meda. Homologous but not heterologous contact increase the insulin secretion of individual pancreatic B-cells. *Exp. Cell res.* 184:72-80 (1989)
26. 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* 281(10). 6395-403 (2006)
27. Braun M, Ramracheya R, Bengtsson M, Zhang Q, Karanauskaite J, Partridge C, Johnson PR, Rorsman P. Voltage-gated ion channels in human pancreatic beta-cells. Electrophysiological characterization and role in insulin secretion. *Diabetes* 57: 1618–1628. (2008)
28. Brissova M, Shiota M, Nicholson WE, et al. Reduction in pancreatic transcription factor Pdx-1 impairs glucose-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem* 277(13): 11225-32. (2002)
29. Bruin, J. et al. Fetal and neonatal nicotine exposure in Wistar rats causes progressive pancreatic mitochondrial damage and beta cell dysfunction. *PLoS ONE* 3, e3371 (2008).
30. Bunnell TM, Ervasti JM,. Delayed embryonic development and impaired cell growth and survival in Actg1 null mice. *Cytoskeleton, Hoboken* 67, 564-572. (2010)
31. Capuzzi, D.M. et al. Efficacy and safety of an extended-release niacin (Niaspan): a long-term study. *Am J Cardiol* 82, 74U-81U; discussion 85U-86U (1998).
32. Cardenas ML, Rabajille, Niemeyer H. Maintenance of the monomeric structure of glucokinase under reating conditions. *Arch Biochem Biophys* 190:142-148. (1978)
33. Carlberg, C. Lipid soluble vitamins in gene regulation. *Biofactors* 10, 91-7 (1999).
34. Carlsson P, Mahlapuu M. Forkhead transcription factors: key players in development and metabolism. *Dev Biol* 250(1): 1-23 (2002)

35. 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* 277(15):13286-93. (2002)
36. Chauhan, J. and K. Dakshinamurti,. Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats. *J Biol Chem* 266(16): p. 10035-8. (1991)
37. Cheung, F.S., Lovicu, F.J. & Reichardt, J.K. Current progress in using vitamin D and its analogs for cancer prevention and treatment. *Expert Rev Anticancer Ther* 12, 811-37
38. Choung, C.M., and G.M. Edelman. Alterations in neural cell adhesion molecules during development of different regions of the nervous system. *J. Neurosci* 4:2354-2368. (1984)
39. Christakos, S., Dhawan, P., Liu, Y., Peng, X. & Porta, A. New insights into the mechanisms of vitamin D action. *J Cell Biochem* 88, 695-705 (2003).
40. Clagett-Dame, M. & DeLuca, H.F. The role of vitamin A in mammalian reproduction and embryonic development. *Annu Rev Nutr* 22, 347-81 (2002).
41. 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).
42. Cohen, E. & Levinson, H.Z. Disrupted fertility of the hidebeetle *Dermestes maculatus* (Deg.) due to dietary overdosage of biotin. *Experientia* 24, 367-8 (1968).
43. Collins JC, Paietta E, Green R, et al. Biotin-dependent expression of the asialoglycoprotein receptor in HepG2. *J Biol Chem* 263(23):11280-11283. (1988)
44. Combs, G.F. Biotin. In: *The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health*, 329-343 (Academic Press Inc., U.S.A., 1992).
45. Cunningham, B.A., S Hoffman, U. Rutishauser, J.J. Hemperly, and G.M. Edelman. Molecular topography of the neural cell adhesion molecule N-CAM: surface orientation and location of sialic acid-rich and binding regions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 80:3116-3120. (1983)
46. Dahl, U., A. Sjonidin, and H. Semb. Cadherins regulate aggregation of pancreatic beta-cells in vivo. *Development* 122:2895-2902. (1996)
47. Dakshinamurti, K. and W. Li, Transcriptional regulation of liver phosphoenolpyruvate carboxykinase by biotin in diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 132(2): p. 127-32. (1994)
48. Dakshinamurti, K. Biotin--a regulator of gene expression. *J Nutr Biochem* 16, 419-23 (2005).
49. 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).
50. Diaz, C., *E Páncreas Anatomía e Histología*. 2da Edición, Pachuca, Hidalgo, Mexico: Universidad Autónoma de Hidalgo. (2008)
51. Docherty HM, Hay CW, Ferguson LA, Barrow J, Durward E, Dorcherty K. Relative contribution of Pdx1, MafA and E47/beta2 to the regulation of the human insulin promoter. *Biochem J* 389(Pt 3): 813-20 (2005)
52. Duester, G. Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. *Cell* 134, 921-31 (2008).
53. Elrick LJ, Docherty J. Phosphorylation-depnt nucleocytoplasmic shuttling of pancreatic duodenal homeobox-1. *Diabetes* 50(10): 2244-52. (2001)

54. Esni F, Johansson BR, Radice GL, Semb H. Dorsal pancreas agenesis in N-cadherin deficient mice. *Dev Biol.* 238:202-212 (2001)
55. Esni F, Taljedal IB, Perl AK, Cremer H, Christofori G, Semb H. 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)
56. Fernandez-Mejia, C. Pharmacological effects of biotin. *J Nutr Biochem* 16, 424-7 (2005).
57. 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).
58. 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).
59. Futamura M, Hosaka H, Kadotani, et al. An allosteric activator of glucokinase impairs the interaction of glucokinase regulatory protein and regulates glucose metabolism. *J Biol Chem.* 281:37668-37674 (2006)
60. Gao N, LeLay J, Vatamaniuk MZ, Rieck S, Friedman JR, Kaestner KH. Dynamic regulation of Pdx1 enhancers by Foxa 1 y Foxa2 is essential for pancreas development. *Genes Dev.* 22(24): 3435-48 (2008)
61. Gao Y, Miyazaki, Hart GW. The transcription factor Pdx1 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.* 415(2): 155-63 (2003)
62. 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* 279(30): 32112-30. (2004)
63. Gennarini, G., Rougon, H. Deagostini-Bazin, M. Hirn, and C. Goidis. Studies of the transmembrane disposition of neural cell adhesion molecule N-CAM. *Eur. J. Biochem.* 142:57-64 (1984)
64. 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).
65. Gilon P, Arredouani A, Gailly P, Gromada J, Henquin JC. Uptake and release of Ca²⁺ by the endoplasmic reticulum contribute to the oscillations of the cytosolic Ca²⁺ concentration triggered by Ca²⁺ influx in the electrically excitable pancreatic B-cell. *J Biol Chem.* 274:20197-20205. (1999)
66. Goodsell D.S., The molecular perspective: Cadherin. *The oncologist.* 7:467-468. (2002)
67. Guz Y, Montminy MR, Stein R, Leonard J, Gamer LW, Wright CV, Teitelman G. 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.* 121:11-8. (1995)
68. Habener, J. et al. Minireview: transcriptional regulation in pancreatic development. *Endocrinology* 146, 1025-34 (2005).

69. Halban. P.A., C.B. Wollheim, B. Blondel, P. Meda, E.N. Neisor, and D.H. Mintz. The possible importance of contact between pancreatic islet cells for the control of insulin release. *Endocrinology*. 111:86-94 (1982)
70. Hassan Y, I., Zemleni, J.. Epigenetic regulation of chromatin structure and gene function by biotin. *J Nutri*. 136 (7), 1736-1765 (2006).
71. Healy S., Perez-Cadahia B., Jia D., McDonald M, K., Dave J, R., Gravel R, A. 2009. Biotin is not a natural histone modification. *Biochim Biophys Acta*. 1789 (11-12), 719-33
72. Heinze E, Steinke J. Glucose metabolism of isolated pancreatic islets: difference between fetal, newborn and adults rats. *Endocrinology*. 88: 1259-1263 (1971)
73. Hellerstrom C. The life story of the pancreatic B cell. *Diabetologia*. 26(6): 393-400 (1984)
74. Henquin JC, Dufrane D, Nenquin M. Nutrient control of insulin secretion in isolated normal human islets. *Diabetes* 55:3470-3477. (2006)
75. Henquin JC, Jonas JC Gilon P. Functional significance of Ca²⁺ oscillations in pancreatic beta cell. *Diabetes Metab*. 24:30-36. (1998)
76. Henquin, J.C. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* 49, 1751-60. (2000)
77. 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).
78. Hiriart M, Aguilar Bryan L. Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic beta-cell. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 29:510.1152 (2008)
79. Hoi J, T., Eissenberg J,C., Shoemaker J,D., Neckameyer W,S., Ilvarson A, M., Harshman L. G., Schkegel V, L., Zemleni J. Feeding *Drosophila* a biotin-deficiente diet for multiple generations increases stress resistance and lifespan and alters gene expression and histones biotinylation patterns. *J Nutr*. 137. (9), 2006-20012
80. 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-cell in the adult pancreas. *Diabetes* 54(9): 1586-95. (2005)
81. Howell SL, Tyhurst M. Interaction between insulin storage granules and f-actin in vitro. *Biochem J*. 178: 367-371. (1979)
82. Howell SL, Tyhurst M. Microtubules, microfilaments and insulin-secretion. *Diabetologia*. 22:301-308. (1982)
83. Hughes SJ et al. The role of reduced glucose transporter content and glucose metabolism in the immature secretory responses of fetal rat pancreatic islets. *Diabetologia* 37: 134–140. (1994)
84. Hymes J, Fleischhauer K, Wolf B. Biotinylation of histones by human serum biotinidase: assessment of biotinyl-transferase activity in sera from normal individuals and children with biotinidase deficiency. *Biochem Mol Med*. 56: 76-83. (1995)
85. Hymes J, Wolf B. Biotinidase and its roles in biotin metabolism. *Clin Chim Acta*. 225:1-11. (1996)
86. Hymes J, Wolf B. Human biotinidase isn't just for recycling biotin. Review. *J Nutr*. 129(2S Suppl.): 485S-489S. (1999)
87. Jing X, Li DQ, Olofsson CS, Salehi A, Surve VV, Caballero J, Ivarsson R, Lundquist I, Pereverzev A, Schneider T, Rorsman P, Renstro'm E. Cav2.3 calcium channels control second-phase insulin release. *J Clin Invest* 115: 146–154. (2005)

88. Kim SK, Hebrok M. Intercellular signals regulating pancreas development and function. *Genes Dev.* 15 (12): 111-27 (2001)
89. Kim, T. et al. Dense-core secretory granule biogenesis. *Physiology (Bethesda)* 21, 124–133 (2006).
90. Kinal, S. et al. The influence of administration of biotin and zinc chelate (Zn-methionine) to cows in the first and second trimester of lactation on their health and productivity. *Pol J Vet Sci* 14, 103-10.
91. 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.* 284(4): E830-E840 (2003)
92. Kiss JZ, Wang C, Olive S, Rougon, G, Lang J, Baetens D, Harry D & Pralong WF. Activity-dependent mobilization of the adhesion molecule polysialic NCAM to the cell surface of neurons and endocrine cells. *EMBO J.* Nov 15;13(22):5284-92. (1994)
93. 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).
94. Lamhonwah AM, Quan F, Gravel RA. Sequence homology around the biotin-binding site of human propionyl-CoA carboxylase and pyruvate carboxylase. *Arch Biochem Biophys.* 254 (2):631-636. (1987)
95. Langley, O. K., M.C. Aletsee-Ufrecht, N.J. Grant, and M. Gratzl. Expression of neural cell adhesion molecule N-CAM in endocrine cells. *J. Histochem. Cytochem.* 37:781-791. (1989)
96. Lantz KA, Vatamaniuk MZ, Brestelli JE, Friedman JR, Matschinsky FM, Kaestner KH. Foxa2 regulates multiple pathways of insulin secretion. *J Clin Invest* 114(4): 512-20. (2004)
97. Lazo de la Vega-Monroy, M.L., Larrieta, E., German, M.S., Baez-Saldana, A. & Fernandez-Mejia, C. Effects of biotin supplementation in the diet on insulin secretion, islet gene expression, glucose homeostasis and beta-cell proportion. *J Nutr Biochem.*
98. 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).
99. 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).
100. Lee, J.M. et al. Effects of high-dose modified-release nicotinic acid on atherosclerosis and vascular function: a randomized, placebo-controlled, magnetic resonance imaging study. *J Am Coll Cardiol* 54, 1787-94 (2009)
101. Lehninger A, Nelson DL, Cox MM. *Principios de Bioquímica.* Barcelona, Omega (2001)
102. Lenmark, A. The preparation of, and studies on, free cell suspensions from mouse pancreatic islets. *Diabetologia.* 10:431-438 (1974)
103. Li G, Rungger-Brandl E, Just I, Jonas JC, Aktories K, Wolheim CB. Effect of disruption of actin filaments by Clostridium botulinum C2 toxin on insulin secretion in HIT-T15 cells and pancreatic islets. *Mol Biol Cell* 5:1199-1213 (1994)

104. Liu G, Dilmac N, Hilliard N, Hockerman GH. Cav1.3 is preferentially coupled to glucose-stimulates insulin secretion in the pancreatic beta cell line INS-1. *J Pharmacol Exp Ther.* 305:271-278. (2003)
105. Lucas A. Programming by early nutrition. An experimental approach. *J Nutr.* 128: 401S-406S. (1998)
106. 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.* 14:211-218. (1993)
107. Maeda, Y., et al., Biotin deficiency decreases ornithine transcarbamylase activity and mRNA in rat liver. *J Nutr.* 126(1): p. 61-6 (1996)
108. Magnuson MA: Glucokinase gene structure: functional implications of molecular genetic studies. *Diabetes* 39:523–527. (1990)
109. Mangelsdorf, D.J. & Evans, R.M. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83, 841-50 (1995).
110. Marshak S, Benshushan E, Shoshkes M, Havin L, Cerasi E, Melloul D. Functional conservation of regulatory elements in the Pdx1 gene: Pdx1 and hepatocyte nuclear factor 3beta transcription factors mediate beta-cell-specific expression. *Mol Cell Biol.* 20(20): 7583-90. (2000)
111. Matschinsky FM. Regulation of pancreatic beta-cell glucokinase: from basics to therapeutics. *Diabetes.* 51 Suppl 3:S394-404. (2002)
112. Matschinsky FM: Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes.* 45:223-241. (1996)
113. Meier, J. et al.. Beta-cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of beta-cell mass in humans. *Diabetes* 57, 1584–1594 (2008).
114. Menon, R., Tolbert, D. & Cefali, E. The comparative bioavailability of an extended-release niacin and lovastatin fixed dose combination tablet versus extended-release niacin tablet, lovastatin tablet and a combination of extended-release niacin tablet and lovastatin tablet. *Biopharm Drug Dispos* 28, 297-306 (2007).
115. Mislis S, Barnett DW, Gillis KD, Pressel DM. Electrophysiology of stimulus-secretion coupling in human beta -cells. *Diabetes* 41: 1221–1228. (1992)
116. 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).
117. 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).
118. Moller, C.J., S. Christgau, M.R. Williamson. O.D. Madsen, N. Zhan-Po, E. Bock, and S. Baekkeskov. Differential expression of neural cell adhesion molecule and cadherins in pancreatic islets, glucagonomas, and unsulinomas. *Mol. Endocrinol.* 6:1332-1342. (1992)
119. Navarro- Tableros V, Sanchez-Soto MC, Garcia S, Hiriart M. Autocrine regulation of single pancreatic beta-cell survival, *Diabetes.* 53 (8): 2018-23. (2004)
120. Navarro-Tableros V, Fiordelisio T, Hernandez-Cruz A, Hiriart M. NGF promotes maturation of rat beta cell. Nerve growth factors promotes development of glucose-

- induced insulin secretion in the rat neonate pancreatic beta cell by modulating calcium channels. *Channels*. 1:408-416. (2007)
121. Naya FJ, Huang HP, Qiu Y, et al. Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/ neuro D-deficient mice. *Genes Dev*. 11(18):2323-24. (1997)
 122. Naya FJ, Stellrecht CMM, Tsai MJ. Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor. *Gen and Dev*. 9:1009-1009. (1995)
 123. Nevins AK, Thurmond DC. Glucose regulates the cortical actin network through modulation of Cdc42 Cycling to stimulate insulin secretion. *Am J Physiol*. 285:C698-C710. (2003)
 124. Ohlsson H, Karlsson K, Edlund T. IPF1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene. *Embo J*. 12:4251-9. (1993)
 125. Orci, L., Gabbay, K.H & Malaisse, W.J. Pancreatic beta-cell, its possible role in insulin secretion. *Science*. 175, 1128-1130. (1972)
 126. Paul, P.K. & Dutttagupta, 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).
 127. Peckham M, Miller G, Wells C, Zicha D, Dunn GA. Specific changes to the mechanism of cell locomotion induced by overexpression of beta actin. *J Cell Sci*. 114, 1367-1377. (2001)
 128. Peters DM, Griffin JB, Beck MM, Zemleni J, Exposure to UV light causes increased biotinylation of histones un Jurkat cells, *Am J Physiol Cell Physiol*. 283:C878-84. (2002)
 129. Petersen HV, Peshavaria M, Pedersen AA, et al. Glucose stimulates the activation domain potential of the Pdx1 homeodomain transcription factor. *FEBS Lett*. 431(3): 362-6. (1998)
 130. Petrik J, Srinivaan M, Aalunkeel R, Cookell S, Arany E, et al. A long-term high carbohydrate diet causes an altered ontogeny of pancreatic islets of langerhans in the neonatal rat. *Peadiatr Res*. 49: 84:92. (2001)
 131. Pictet, R., and W.J. Rutter. Development of the embryonic endocrine pancreas. In *Handbook of Physiology*, American Physiology Society, section 7.D.F. Steiner, and N. Frenkel, editors. Williams and Wilkins, Washington, DC. 1:25-66 (1972)
 132. Pillai, M.K. & Medhukar, B.V. Effect of biotin on the fertility of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* (L.). *Naturwissenschaften* 56, 218-9 (1969).
 133. Pollard TD, Borisy GC. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*. 112, 453-465. (2003)
 134. Porat, S. et al. Control of pancreatic beta cell regeneration by glucose metabolism. *Cell Metab* 13, 440-9 (2011).
 135. Radice GL, Rayburn H, Matsunami H, Knudsen KA, Takeichi M, Hynes RO. Development defects in mouse embryos lacking N-Cadherin. *Dev Biol*. 181:64-78 (1997)
 136. Raum JC, Gerrish K, Artner I, et al. FoxA2, Nkx2.2 and Pdx1 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*. 26(15): 5735-43. (2006)

137. 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).
138. Regazzi, R., Wollheim, C. B., Lang, J., Theler, J.M., Rosssetto, O., Montecucco, C., Sadoul, K., Weller, U., Palmer, M., and Thorens, B. VAMP-2 and cellubrevin are expressed in pancreatic beta cells and are essential for Ca²⁺ but not for GTP γ S-induced insulin secretion. *EMBO J.* 14,2723-2730. (1995)
139. 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).
140. Rodriguez-Melendez R, Griffin JB, Zemleni J. The expression of genes encoding ribosomal subunits and eukaryotic translation initiation factor 5A depends on biotin and bisnorbiotin in HepG2 cells. *J Nutr Biochem.* 17(1):23-30. (2006)
141. Rodriguez-Melendez R, Zemleni J. Nitric oxide signaling depends on biotin in Jurkat human lymphoma cells. *J Nutr.* 139(3):429-433. (2009)
142. Rodriguez-Melendez, R. & Zemleni, J. Regulation of gene expression by biotin (review). *J Nutr Biochem* 14, 680-90 (2003).
143. 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).
144. Rodriguez-Melendez, R., Griffin, J.B., Sarath, G. & Zemleni, J. High-throughput immunoblotting identifies biotin-dependent signaling proteins in HepG2 hepatocarcinoma cells. *J Nutr* 135, 1659-66 (2005)
145. 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).
146. Rouiller, D.G., V. Cirulli, and P.A. Halban. Differences in aggregation properties and levels of neural cell adhesion molecule (NCAM) between islet cell types. *Exp. Cells Res.* 191:305-312. (1990)
147. Sadoul, K., Lang, J., Montecucco, C., Weller, U., Regazzi R., Catsicas, S., Wollheim, C.B., and Halban, P.A. SNAP-25 is expressed in islets of langerhans and is involved in insulin release. *J. Cell Biol.* 128, 1019-1028. (1995)
148. 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).
149. Salomon, D., And P. Meda. Heterogeneity and contact- dependent regulation of hormone secretion by individual B cells. *Exp. Cell res.* 162:507-520. (1986)
150. Scaglia L., Cahill C, Finegood DT, Bonner-Weir S. Apoptosis participates in the remodeling of the endocrine pancreas in the neonatal rat. *Endocrinology.* 138: 1736-1741. (1997)
151. Schachner, M. Families of neural adhesion molecules. *Ciba Found Symp.* 145:156-169. (1989)

152. Scholze A, Plant TD, Dolphin AC, Nurnberg B. Functional expression and characterization of a voltage-gated CaV1.3 (alpha1D) calcium channel subunit from an insulin-secreting cell line. *Mol Endocrinol.* 15:1211-1221. (2001)
153. Seymour, P.A., and Sander, M. Historical perspective: beginnings of the beta-cell: current perspectives in beta-cell development. *Diabetes* 60, 364–376 (2011).
154. Shelton KD, Franklin A, Khour A, Beechem J, Magnuson MA: Multiple elements in the upstream glucokinase promoter are necessary for transcription in insulinoma cells. *Mol Cell Biol* 12:4578–4589. (1992)
155. 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. *PNAS.* 99:03818-3823. (2002)
156. Simmins, P.H. & Brooks, P.H. Supplementary biotin for sows: effect on reproductive characteristics. *Vet Rec* 112, 425-9 (1983).
157. 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).
158. Slack JMW. Development biology of the pancreas *Development* 121: 1569-1580. (1995)
159. Solorzano-Vargas S, Pacheco-Alvarez D, León-Del-Río 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* 99(8): 5325-30. (2002)
160. 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).
161. 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).
162. 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.* 259(10): 6393-6. (1984)
163. Sperling S. Transcriptional regulation at a glance. *BMC Bioinformatics.* 8 (Suppl.6): S2 (2007)
164. Srinivasan M, Laychock SG, Hill DJ, Patel MS,. Neonatal nutrition: metabolic programming of pancreatic islets and obesity. *Exp Biol Med.* 228: 15-23. (2001)
165. Stanley JS, Griffin JB, Zemleni J,. Biotinylation of histones in human cells: Effects of cell proliferation. *Eur J Biochem.* 268: 5424-5429. (2001)
166. Stoffers DA, Ferrer J, Clarke WL, Habener JF. Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. *Nat Genet.* 17(2):138-9. (1997)
167. Stoffers DA, Heller RS, Miller CP, Habener JF. Developmental expression of the homeodomain protein IDX-1 in mice transgenic for an IDX-1 promoter/lacZ transcriptional reporter. *Endocrinology.* 140:5374–81. (1999)

168. 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).
169. Teta, M. et al. Very slow turnover of beta-cells in aged adult mice. *Diabetes* 54, 2557–2567 (2005).
170. Thomas H, Jaschkowitz 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.* 10(19): 2089-97. (2001)
171. Thurmond, D.C., Gonelle- Gispert, C., Furukawa, M., Halban, P.A., and Pessin, J.E. Glucose-stimulated insulin secretion is coupled to the interaction of actin with the t-SNARE (target membrane soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor complex). *Mol. Endocrinol.* 17, 732-742. (2003)
172. Tina M. Bunnell, Brandon J. Burbach, Yoji Shimizu, James M. Ervasti. Beta-Actin specifically controls cell growth, migration, and the G-actin pool. *Mol Biol Cell.* 4047-4058. (2011)
173. Tunaru, S. et al. PUMA-G and HM74 are receptors for nicotinic acid and mediate its anti-lipolytic effect. *Nat Med* 9, 352-5 (2003).
174. 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).
175. Van Velkinburgh JC, Samaras 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.* 280(46): 38438-43. (2005)
176. Vesely DL. Biotin enhances guanylate cyclase activity. *Science.* 216(4552):1329-1330. (1982)
177. Vignali S, Leiss V, Karl R, Hofmann F, Welling A. Characterization of voltage-dependent sodium and calcium channels in mouse pancreatic A and B-cells. *J Physiol* 572: 691–706. (2006)
178. Vilches-Flores, A. and C. Fernández-Mejía, Efecto de la biotina sobre la expresión genética y el metabolismo. *Rev Inv Clin.* (57): p. 716-24. (2005)
179. 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).
180. Vitale ML, Seward EP, Trifaron JM. Chromaffin cell cortical actin network dynamics control the size of the release- ready vesicle pool and the initial rate of exocytosis. *Neuron.* 14:353-363. (1995)
181. Voet, D., J.G. Voet, and C.W. Pratt, *Fundamentals of Biochemistry.* USA: John Wiley & ons. (2002)
182. Waeber G, Thompson N, Nicod P, Bonny C: Transcriptional activation of the GLUT2 gene by the IPF-1/STF-1/IDX-1 homeobox factor. *Mol Endocrinol* 10:1327–1334. (1996)

183. 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.* 277(20): 17564-70. (2002)
184. Watanabe, T. Morphological and biochemical effects of excessive amounts of biotin on embryonic development in mice. *Experientia* 52, 149-54 (1996).
185. Watanabe-Kamiyama M, Kamiyama S, Horiuchi K, et al. Antihypertensive effect of biotin in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Br J Nutr.* 99(4):756-763. (2008)
186. Weinstein DC, Ruiz Altaba A, Chen WS, et al. The winged-helix- transcription factor HNF3 beta is required for notochord development in the mouse embryo. *Cell.* 78(4): 575-88. (1994)
187. 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.* 34 (3): 177-84. (1997)
188. Wheeler, M. B., Sheu, L., Ghai, M., Bouquillon, A., Grondin, G., Weller, U., Beaudoin, A.R., Bennett, M.K., Trimble, W.S., And Gaisano, H.Y. Characterization of SNARE protein expression in Beta cell lines and pancreatic islets. *Endocrinology.* 137, 1340-1348. (1996)
189. Whitesell RR, Powers AC, Regen DM, Abumrad NA: Transport and metabolism of glucose in an insulin-secreting cell line, beta TC-1. *Biochemistry.* 30:11560-11566. (1991)
190. Wiedmann S, Rodriguez-Melendez R, Ortega-Cuellar D, Zemleni J. Clusters of biotin-responsive genes in human peripheral blood mononuclear cells. *J Nutr Biochem.* 15 (7): 433-9. (2004)
191. Wilson JR, Ludowyke RI, Biden TJ. A redistribution of actin and myosin IIA accompanies Ca²⁺ dependent insulin secretion. *FEBS Lett.* 492:101-106. (2001)
192. Wise, A. et al. Molecular identification of high and low affinity receptors for nicotinic acid. *J Biol Chem* 278, 9869-74 (2003).
193. Wu-Wong, J.R., Tian, J. & Goltzman, D. Vitamin D analogs as therapeutic agents: a clinical study update. *Curr Opin Investig Drugs* 5, 320-6 (2004).
194. Yamagata K, Nammo T, Moriwaki M, Ihara A, Iizuka K, Yang Q, Satoh T, Li M, Uenaka R, Okita K et al. Overexpression of dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor-1 alpha in pancreatic beta cells causes abnormal islet architecture with decreased expression of E-cadherin, reduced beta-cell proliferation, and diabetes. *Diabetes.* 51: 114-123. (2002)
195. Yang SN, Berddren PO. CaV2.3 channel and PKC λ : new players in insulin secretion. *J Clin Invest.* 115:16-20. (2005)
196. 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.* 98 (6):699-706. (1998)
197. Yoshikawa, H. et al. Effects of biotin on glucotoxicity or lipotoxicity in rat pancreatic islets. *Metabolism* 51, 163-8 (2002).
198. Zemleni, J., Uptake, localization, and noncarboxylase roles of biotin. *Annu Rev Nutr.* 25: p. 175-96. (2005)

199. 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)*. 42(6):517-526. (1996)
200. 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).