



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON BIOTINA EN LOS  
ISLOTES PANCREÁTICOS DE RATÓN ANTE LA INDUCCIÓN  
DE DIABETES POR ESTREPTOZOTOCINA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I Ó L O G O**

**P R E S E N T A:**

**EVERARDO RUIZ MORA**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. MARÍA CRISTINA FERNÁNDEZ MEJÍA  
México D.F. 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **Hoja de datos del jurado**

### **1. Datos del alumno**

Ruiz  
Mora  
Everardo  
5979778999  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
307315841

### **2. Datos del tutor**

Dra.  
María Cristina Regina  
Fernández  
Mejía

### **3. Datos del sinodal 1**

Dr.  
René de Jesús  
Cárdenas  
Vázquez

### **4. Datos del sinodal 2**

M. en C.  
Miguel Ángel  
Palomino  
Garibay

### **5. Datos del sinodal 3**

Dra.  
María Cristina Regina  
Fernández  
Mejía

### **6. Datos del sinodal 4**

Dra.  
María Eugenia  
Gonsebatt  
Bonaparte

### **7. Datos del sinodal 5**

Dr.  
Juan Luis  
Chávez  
Pacheco

## **8. Datos del trabajo escrito**

Efecto de la suplementación con biotina en los islotes pancreáticos de ratón  
ante la inducción de diabetes por estreptozotocina

86 p.

2015

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

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

Secretaría de Educación Pública (SEP)  
a través de la beca de titulación otorgada al alumno.

## **AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS PERSONALES**

Este trabajo de tesis no habría sido posible sin el apoyo incondicional de mis padres, quienes han sido un símbolo de perseverancia, pasión y compromiso por todas las cosas de la vida, convirtiéndose en una figura a seguir para mí. Muchas gracias por todo lo que me han enseñado y por siempre estar motivándome a ser una mejor persona cada día. Este y los trabajos futuros que vengan siempre serán para ustedes.

A mi hermana y mis sobrinos, cuyo cariño y compañía siempre me han hecho salir adelante. Espero ser un modelo a seguir, en especial para mis sobrinos, sepan que con esfuerzo y compromiso todo se puede conseguir y deseo con muchas fuerzas que algún día ustedes también estén escribiendo los agradecimientos de sus propias tesis.

A Ilse Rivera que has sido una gran inspiración para mí, por ti conocí mucho de mí mismo, mis cualidades y mis defectos. Las enseñanzas que me has dado son invaluable. Gracias por absolutamente todos los momentos que hemos pasado juntos. Eres lo mejor que me dejó el estudiar la carrera de biología y por ende, cada palabra, imagen, experimento de este trabajo fue pensando en ti.

A mis mejores amigos Isabel Morones, Xavier Jimaréz, Yadira Ortiz y Miriam Garcia cuya amistad incondicional y compañía en todos los momentos han sido un regalo muy especial para mí. Gracias por todos los consejos, regaños, sonrisas, abrazos, etcétera que me han dado. Espero que nuestra amistad dure muchos años más, porque amigos como ustedes no se encuentran fácilmente. También a mi amiga "Lola", quien literalmente estuvo a mi lado en todo el escrito de este trabajo y quien me ha mostrado que los buenos amigos también tienen patas y hocico.

Respecto a la realización de la tesis, agradezco infinitamente a la Dra. Cristina Fernández por haberme permitido desarrollarme académicamente. Gracias por su paciencia y su guía en cada aspecto de este trabajo y por darme la oportunidad de mostrar mi compromiso con el trabajo.

A Rafael Ramirez, Wilma Tixi y Sergio Patiño cuya ayuda fue de gran importancia para que yo pudiera concluir esta tesis. A pesar de varias discusiones intensas por temas académicos, fue un honor haber trabajado con ustedes.

Y finalmente a todos mis demás compañeros/as del laboratorio 3 de la unidad de genética de la nutrición, en especial a todo el equipo páncreas, con quienes conviví por años y cuya ambiente de trabajo siempre fue muy bueno para mí.

# ÍNDICE

<b>A. RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>B. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
B. 1. EL PÁNCREAS.....	3
<i>B.1.1. Desarrollo del páncreas.....</i>	<i>4</i>
<i>B.1.2. Desarrollo de los islotes pancreáticos.....</i>	<i>5</i>
B.2. ARQUITECTURA DEL ISLOTE.....	7
B.3. FUNCIÓN DEL ISLOTE PANCREÁTICO.....	8
<i>B.3.1. Célula-<math>\beta</math>.....</i>	<i>8</i>
B.3.1.1. Insulina.....	8
B.3.1.1.1. Estructura.....	8
B.3.1.1.2. Síntesis y procesamiento.....	9
B.3.1.2. Secreción de insulina.....	10
B.3.1.2.1. Secreción de insulina estimulada por glucosa.....	10
B.3.1.2.2. Fases de la secreción de insulina.....	12
<i>B.3.2. Célula-<math>\alpha</math>.....</i>	<i>13</i>
B.3.2.1. Glucagon.....	13
B.3.2.1.1. Síntesis y procesamiento.....	13
B.3.2.2. Secreción de glucagon.....	15
B.4. MASA DE LAS CÉLULAS DEL ISLOTE PANCREÁTICO.....	16
B.5. VENTANA CRÍTICA.....	19
B.6. DIABETES MELLITUS.....	20
<i>B.6.1. Epidemiología de la diabetes.....</i>	<i>21</i>
<i>B.6.2. Costos económicos de la diabetes.....</i>	<i>22</i>
<i>B.6.3. Clasificación de diabetes mellitus.....</i>	<i>22</i>
B.6.3.1. Diabetes tipo 1.....	23
B.6.3.2. Diabetes tipo 2.....	23
B.6.3.3. Diabetes gestacional.....	24
B.6.3.4. Etapa pre diabética.....	24
<i>B.6.4. Cambios del islote pancreático durante la progresión a diabetes.....</i>	<i>25</i>
B.6.4.1. Diabetes mellitus tipo 1.....	25
B.6.4.2. Diabetes mellitus tipo 2.....	26
B.6.4.3. Estreptozotocina y su uso en la inducción experimental de diabetes mellitus.....	26
B.6.4.3.1. Mecanismos de acción de la estreptozotocina en el modelo de bajas dosis múltiples.....	27
B.6.4.3.2. Efectos de la estreptozotocina sobre el islote pancreático.....	28
B.7. BIOTINA.....	28
<i>B.7.1. Estructura química.....</i>	<i>28</i>
<i>B.7.2. Función y requerimientos de la biotina.....</i>	<i>29</i>
<i>B.7.3. Efectos de la biotina en dosis farmacológicas.....</i>	<i>30</i>
B.7.3.1. Biotina y el metabolismo de la glucosa.....	30
B.7.3.2. Biotina y el metabolismo de la glucosa en humanos.....	31

<b>C. ANTECEDENTES DIRECTOS DEL PROYECTO .....</b>	<b>32</b>
<b>D. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>33</b>
<b>E. HIPÓTESIS.....</b>	<b>34</b>
<b>F. OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>34</b>
<b>G. OBJETIVOS PARTICULARES .....</b>	<b>34</b>
<b>H. DISEÑO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>36</b>
<b>I. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
I.1. MODELO ANIMAL Y ADMINISTRACIÓN DE DIETAS .....	37
I.2. INDUCCIÓN DE DIABETES CON ESTREPTOZOTOCINA MEDIANTE EL MODELO DE DOSIS MÚLTIPLES .	37
I.3. OBTENCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA SANGUÍNEA .....	38
I.4. PRUEBA INTRAPERITONEAL DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA.....	38
I.5. INMUNOHISTOQUÍMICAS Y ANÁLISIS MORFOMÉTRICO.....	38
I.6. AISLAMIENTO DE ISLOTES PANCREÁTICOS Y SECRECIÓN DE INSULINA IN VITRO .....	39
I.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....	41
<b>J. RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
J.1. EFECTOS DE LA SUPLEMENTACIÓN CON BIOTINA SOBRE EL PESO DEL ANIMAL .....	42
J.2. CONSUMO DE ALIMENTO DURANTE TODO EL EXPERIMENTO.....	44
J.3. EFECTOS DE LA SUPLEMENTACIÓN CON BIOTINA SOBRE LA TOLERANCIA A LA GLUCOSA .....	46
J.4. EFECTOS DE LA SUPLEMENTACIÓN CON BIOTINA EN LAS CONCENTRACIONES SANGUINEAS DE GLUCOSA EN CONDICIONES DE AYUNO .....	48
J.5. EFECTOS DE LA SUPLEMENTACIÓN CON BIOTINA EN LAS CONCENTRACIONES SANGUINEAS DE GLUCOSA EN CONDICIONES AD LIBITUM .....	50
J.6. EFECTO DE LA SUPLEMENTACION CON BIOTINA SOBRE LA SECRECIÓN DE INSULINA .....	51
J.7. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON BIOTINA SOBRE EL PESO DEL PÁNCREAS .....	52
J.8. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON BIOTINA SOBRE EL ÁREA TOTAL DEL ISLOTE .....	53
J.9. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON BIOTINA SOBRE LA PROPORCIÓN DE CÉLULAS-B Y A POR ISLOTE .....	55
J.10. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON BIOTINA SOBRE EL NÚMERO DE CÉLULAS-B Y A POR ISLOTE .....	57
J.11. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON BIOTINA SOBRE EL TAMAÑO DE LAS CÉLULAS-B Y A.....	58
<b>K. DISCUSIÓN .....</b>	<b>59</b>
<b>L. CONCLUSIONES.....</b>	<b>65</b>
<b>M. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>66</b>
<b>N. REFERENCIAS .....</b>	<b>67</b>



## A. RESUMEN

La diabetes mellitus es un padecimiento que ha alcanzado proporciones alarmantes tanto a nivel mundial como a nivel nacional. Por tal motivo el desarrollo de la investigación científica es indispensable con el fin de conocer más a fondo dicho padecimiento y poder desarrollar mejores estrategias para su tratamiento e idealmente su cura. El periodo posterior al destete es un periodo de ventana crítica en el cual la exposición a ciertos factores ambientales puede programar la función de varios órganos en etapas posteriores de la vida. Se ha encontrado que la suplementación con la vitamina hidrosoluble biotina en concentraciones farmacológicas favorece el metabolismo de la glucosa y mejora el estado diabético. Sin embargo, se desconoce si la suplementación con biotina administrada durante el periodo de ventana crítica correspondiente al post destete tiene efectos ante el desarrollo de la diabetes mellitus en la edad adulta.

En este trabajo analizamos los efectos de la suplementación con biotina, administrada durante el periodo de ventana crítica posterior al destete, ante la inducción de diabetes mellitus por dosis múltiples de estreptozotocina en la etapa adulta. Ratones Balb/c AnN Hsd hembra recibieron una dieta suplementada con biotina (108 mg biotina / kg dieta) o una dieta control (0.9 mg biotina / kg dieta) durante las 3 semanas posteriores al destete. Una vez concluido dicho periodo, el grupo suplementado comenzó a recibir dieta control hasta el final del experimento. A las 5 semanas posteriores al destete, se indujo diabetes mellitus por el protocolo de dosis múltiples de estreptozotocina (STZ) a una parte del grupo control y del grupo suplementado, generándose cuatro grupos: control, suplementado, control-STZ y suplementado-STZ. Al final de este periodo, evaluamos la homeostasis de la glucosa, la secreción de insulina y se realizó un análisis morfométrico de los islotes pancreáticos por medio de inmunohistoquímica. El peso del animal y el consumo del alimento fue monitoreado durante todo el experimento.

Los resultados obtenidos mostraron que el grupo de animales diabéticos que recibieron la dieta suplementada con biotina durante tres semanas posterior al destete (suplementado-STZ) tenían una mejor homeostasis de la glucosa, una recuperación del peso corporal, una mejor secreción de insulina y una proporción de células- $\beta$  por islote mayor y una proporción menor de células- $\alpha$  en comparación al grupo diabético no suplementado (control-STZ). Por otra parte, el grupo suplementado pero no diabético (suplementado), presentó una secreción de insulina y una proporción de células- $\alpha$  por islote incrementada en comparación al grupo control. Sin embargo, ninguna diferencia en la homeostasis de la glucosa fue observada entre ambos grupos.

En conclusión, la suplementación con biotina durante el periodo de ventana crítica posterior al destete permitió un mejor enfrentamiento ante la inducción de diabetes mellitus en la edad adulta, lo cual se reflejó en general por una mejor homeostasis de la glucosa. Cabe mencionar que en condiciones fisiológicas, sin embargo, la biotina no afecta dicha homeostasis. Por ende, la suplementación con biotina administrada en edades tempranas en un modelo murino, tiene un efecto protector ante la diabetes mellitus de la edad adulta.

## **B. INTRODUCCIÓN**

### ***B. 1. El páncreas***

El páncreas es una glándula mixta compuesta por una parte exocrina y una parte endocrina. El páncreas exocrino está constituido por a) células acinares, cuya función principal es la producción y secreción de enzimas, como la tripsina, amilasa y lipasa, destinadas a la digestión de proteínas, carbohidratos y lípidos, y por b) células ductales, las cuales se encargan de delimitar el sistema por el cual las enzimas secretadas se transportarán hasta llegar al duodeno (Shih et al. 2013). Por otra parte, el páncreas endocrino se encuentra constituido por cúmulos celulares de tamaño variable denominados islotes de Langerhans o islotes pancreáticos, los cuales son los responsables de regular la homeostasis de la glucosa a través de la secreción de hormonas enviadas al torrente sanguíneo. La proporción exocrina es de aproximadamente poco más del 95% de la masa pancreática, mientras la parte endocrina va del 1 al 2% (Murtaugh & Melton 2003). En la figura 1, se puede observar la organización topológica de un páncreas maduro, la cual consta de grupos de células acinares fusionadas alrededor de los extremos de la red de células ductales, mientras que los islotes pancreáticos se encuentran dispersos a través del órgano.

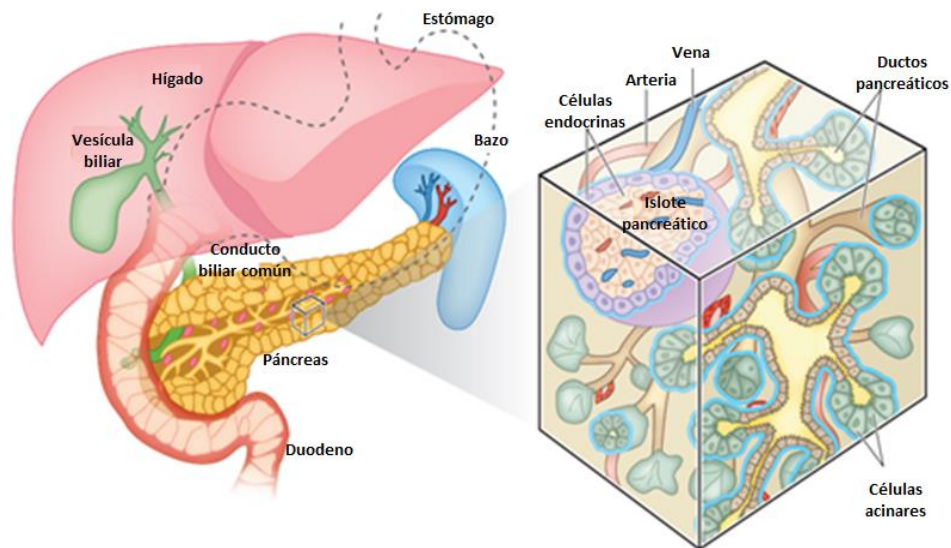


Fig. 1 Conformación del páncreas. Imagen modificada de Shih et al., 2013

### B.1.1. Desarrollo del páncreas

El uso de técnicas más sofisticadas, como lo es el trazado de linajes, ha permitido saber que todos los tipos celulares pancreáticos provienen de células progenitoras comunes. Estos progenitores se desarrollan como primordios celulares en la parte dorsal y ventral del endodermo del intestino anterior en el día embrionario 9.0 – 9.5 y 10.5 (días post coito), respectivamente, en el desarrollo del ratón (Merkwitz et al. 2013). Dicha región del endodermo es conocida también como anillo hepatopancreático, debido a que también es el lugar de origen del hígado.

Poco después del surgimiento de los primordios pancreáticos dorsales y ventrales estos comenzarán a aumentar de tamaño, compenetrándose a través del mesénquima, debido al incremento en la proliferación de las células que los constituyen. Además, comenzarán a organizarse en un epitelio (epitelio pancreático), el cual dará pie a la formación de estructuras tubulares ramificadas, todo esto durante el periodo denominado “transición primaria”. El periodo que abarca el día embrionario 12.5 (días post coito) hasta el nacimiento es conocido como “transición secundaria”, en el cual el epitelio pancreático continuara expandiéndose y ramificándose a la vez que se comenzará la diferenciación de células acinares, ductales y endocrinas (Shih et al. 2013).

Para dicha diferenciación, el epitelio pancreático se tendrá que someter a cambios estructurales que darán como resultado la formación de dos regiones; la apical y la troncal. Las regiones apicales se originarán en los extremos de cada ramificación del epitelio pancreático, mientras que las células que se encuentren en la parte interna de cada ramificación conformarán la región troncal. Estudios han revelado que la región apical dará origen a las células que formarán la parte acinar del páncreas y que estas habrán sido en su mayoría formadas alrededor del día embrionario 15.5 (días post coito). Mientras tanto, la región troncal se encargará de ser el origen de los linajes endocrino y ductal.

La diferenciación endócrina comienza a partir de un conjunto de células en la región troncal positivas al factor transcripcional *Neurogenina 3 (Ngn3)*, por lo que aquellas células que sean *Ngn3<sup>-</sup>* serán las progenitoras de las células ductales. El modelo más ampliamente aceptado indica que las células *Ngn3<sup>+</sup>* se separan del epitelio pancreático, a través de un proceso de delaminación para posteriormente segregarse en el tejido estromal cercano, dando pie a los futuros islotes pancreáticos.

Otro evento clave en el desarrollo del páncreas ocurre en el día embrionario 13.5, en el cual la región del intestino de donde surgió el brote ventral y el dorsal girará de tal manera que estos terminaran fusionándose. Una vez hecha esta fusión, el páncreas estará dividido en 3 porciones: cabeza, porción más próxima al duodeno y originada por el brote ventral; cuerpo, porción central relacionada más al estómago; y la cola, porción relacionada más con el bazo y la cual junto con la porción del cuerpo son el resultado del brote dorsal (Merkwitz et al. 2013).

### **B.1.2. Desarrollo de los islotes pancreáticos**

Los islotes pancreáticos se encuentran conformados por 5 tipos de células, siendo su producto de secreción el principal criterio para distinguirlas. La secreción de glucagon es llevada a cabo por las células- $\alpha$ , mientras que las

células- $\beta$  se encargan de hacer lo propio con la insulina. Las células- $\delta$ , PP y  $\epsilon$  secretan somatostatina, polipéptido pancreático y grelina, respectivamente.

Como se mencionó anteriormente, cada una de estas células proviene de progenitores positivos a *Ngn3* en el dominio troncal del epitelio pancreático durante el periodo de transición secundaria (Dhawan et al. 2007).

La expresión de *Ngn3* provoca que las células se sometan a un cambio morfológico, adquiriendo una forma de gota, lo cual hará posible la delaminación del epitelio pancreático (Gouzi et al. 2011). Una vez delaminadas, la diferenciación hacia cualquier tipo de célula endocrina se llevará a cabo, lo cual dependerá del tiempo de expresión de *Ngn3* (Johansson et al. 2007) y los cambios en el patrón de expresión génica a los que las células *Ngn3*<sup>+</sup> se someten. La expresión de los factores transcripcionales Pax4, Pdx1, Nkx 2.2, MafA y Nkx6.1 determinarán una diferenciación hacia células- $\beta$ ; la expresión del factor Arx hará lo propio para la diferenciación hacia célula- $\alpha$  (Collombat et al. 2003; Rojas et al. 2010). Finalmente, estas células diferenciadas se agregarán para formar el islote pancreático. Cabe mencionar que durante el periodo de transición primaria se ha reportado la presencia de células endocrinas, principalmente positivas a glucagon, así como a insulina (Collombat et al. 2010a) siendo su función un enigma ya que se han reportado no formar parte de los islotes con los que se cuenta al nacer (Herrera 2000)

Durante el nacimiento, la formación de células endocrinas a partir de precursores en el epitelio pancreático comienza a disminuir (Shih et al. 2013).

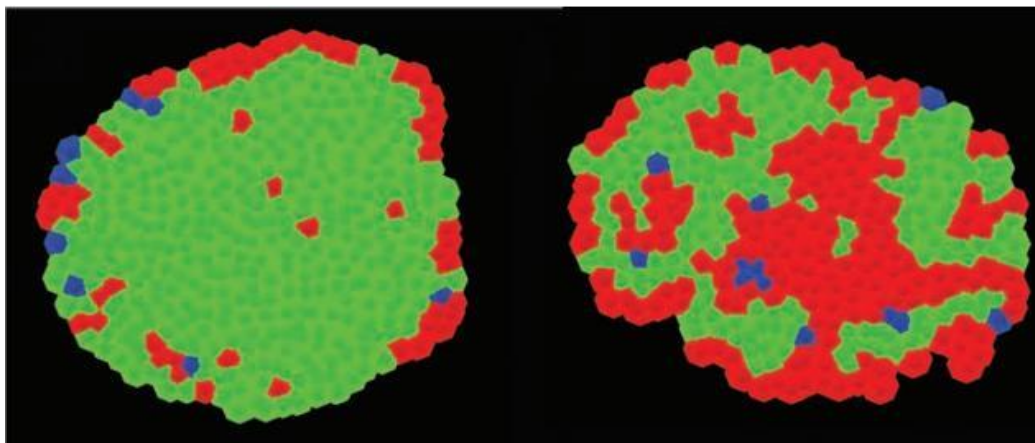
Algunos estudios indican que durante las primeras 4 semanas de edad se da el mayor crecimiento de los islotes, preferentemente de los pequeños, así como el establecimiento del número de estos que llegarán a la etapa adulta (Finegood et al. 1995; Scaglia et al. 1997; Montanya et al. 2000; Jo et al. 2011). Interesantemente en los días cercanos al destete en el caso del ratón (3 semanas de edad) se observa un aumento en la fracción de islotes originados por el proceso de división (fisión) de islotes más grandes (Jo et al. 2011). Sin embargo (Herbach et al. 2011) indican que el número y volumen de los islotes aumentan hasta los 90 días de edad en el ratón.

## **B.2. Arquitectura del islote**

La organización y proporción de cada tipo celular que conforma el islote pancreático varía según la especie (fig. 2). En el ratón las células- $\beta$  predominan en el centro del islote pancreático rodeadas por grupos de células- $\alpha$  y  $\delta$  (Cabrera et al. 2006; Brissova et al. 2005) sin que estas estén formando un manto continuo como anteriormente se sugería (Kharouta et al. 2009).

Las células- $\beta$  son las que tienen el mayor porcentaje abarcando de un 60–80% de la masa del islote, mientras que las células- $\alpha$  comprenden un 15 – 20 %. Las células- $\delta$  representan menos del 10 % de las células del islote y finalmente las células-PP y  $\epsilon$  se dividen el porcentaje restante en el caso del ratón (Murtaugh & Melton 2003; Steiner et al. 2010). Dependiendo de la región del páncreas, se encontrará diferentes proporciones de las células pancreáticas, pues en los islotes de la región de cuerpo y de la cola hay un mayor porcentaje de células- $\alpha$  comparados con aquellos de la cabeza. (Aguayo-Mazzucato et al. 2006).

En el caso del humano, sin embargo, las células- $\alpha$  y  $\delta$  se encuentran dispersas a través de la masa de células- $\beta$ . Aunado a esto, las proporciones también difieren, pues las células- $\beta$  abarcan de un 40–60 %, las células- $\alpha$  un 20–40 %, células- $\delta$  alrededor de un 10% y hay pocas células-PP (Cabrera et al. 2006; Brissova et al. 2005). Cabe mencionar que tales proporciones se ven modificadas entre más grandes sean los islotes, pues la proporción de células- $\beta$  disminuye (Kim et al. 2009).



**Fig.2** Arquitectura típica de un islote de ratón (izquierda) y de un humano (derecha). Células- $\beta$  en verde, células- $\alpha$  en rojo y células- $\delta$  en azul. Modificado de (Steiner et al. 2010)

### **B.3. Función del islote pancreático**

#### **B.3.1. Célula- $\beta$**

Las células- $\beta$  realizan un importante papel en el organismo regulando la homeostasis de la glucosa a través del efecto que tiene la insulina, la principal hormona sintetizada y secretada por estas células. El proceso de secreción de insulina es un proceso altamente sofisticado en el cual se ha desarrollado un mecanismo eficiente para detectar las concentraciones de glucosa en distintas condiciones fisiológicas, como el ayuno y el postprandio, acoplado a la secreción de cantidades correspondientes a las demandas nutricionales del momento.

Para poder tener una capacidad eficiente de detección de las concentraciones de glucosa las células- $\beta$ , y por ende el islote pancreático, presentan una irrigación sanguínea tan densa que les permite recibir 10 veces más la cantidad de sangre que recibe el páncreas exocrino (Fu et al. 2013). Además, los capilares que irrigan los islotes muestran un gran número de pequeños poros conocidos como fenestraciones que permiten el intercambio de moléculas como la glucosa de la sangre hacia las células- $\beta$  y la insulina de estas hacia el torrente sanguíneo.

#### **B.3.1.1. Insulina**

##### **B.3.1.1.1. Estructura**

El monómero de la insulina consiste en dos cadenas unidas por dos enlaces disulfuro; la cadena "A" de 21 amino ácidos y la cadena "B" de 30 amino ácidos (fig. 3). En concentraciones altas, los monómeros tienden a agruparse en grupos de seis para formar las estructuras conocidas como hexámeros, siendo esta la forma en que se almacena la insulina dentro de la célula- $\beta$ , sin embargo esta solo es activa en la forma de monómero (Fu et al. 2013).



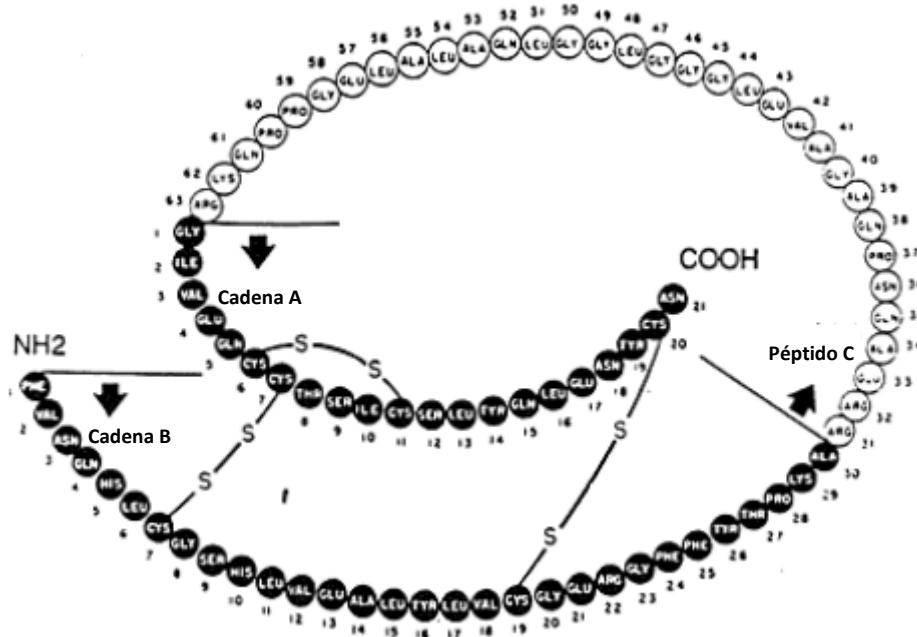


Fig. 3 Estructura de la insulina. Modificado de (Pittman et al. 2004)

### B.3.1.1.2. Síntesis y procesamiento

El gen encargado de la transcripción de la insulina codifica un precursor de 110 aminoácidos conocido como preproinsulina. Dicho precursor se distingue por tener un péptido señal en su parte N – terminal que le permitirá ser dirigido hacia el lumen del retículo endoplasmático rugoso, en el cual tal péptido señal será escindido de la preproinsulina para formar la proinsulina.

La proinsulina continuara su maduración en el retículo endoplasmático sometándose a plegamientos para después ser transportada al aparato de Golgi, donde será encapsulada en gránulos de secreción inmaduros en la región Trans de este organelo.

La maduración de tales gránulos se caracteriza por la acidificación de su lumen, la escisión de la proinsulina dando como resultado la formación de las dos cadenas de insulina y la cadena restante conocida como péptido C y finalmente por la pérdida de la proteína clatrina en su cubierta (Hou et al. 2009; Fu et al. 2013). Esta disminución en el pH dentro del gránulo, la presencia de  $Zn^{2+}$  y las altas concentraciones de insulina favorecen que esta se almacene en forma de hexámeros.

### **B.3.1.2. Secreción de insulina**

El metabolismo de la glucosa en el islote es la señal más importante para la transcripción y traducción del gen de la insulina (Poitout et al. 2006) y también es el principal estimulante para la secreción de ésta en el caso de roedores y humanos, superando aquella estimulada por ácidos grasos y amino ácidos.

#### **B.3.1.2.1. Secreción de insulina estimulada por glucosa**

La secreción de insulina es un proceso complejo en el que participan la entrada y metabolismo de la glucosa, eventos iónicos y procesos celulares.

Como se ha mencionado, las células- $\beta$  han desarrollado un mecanismo capaz de detectar los aumentos en la concentración de glucosa sanguínea y poder responder con un aumento en la secreción de insulina. Cuando la concentración sanguínea de glucosa sobrepasa los 7 mM, se da inicio a la secreción estimulada por este nutriente (Fu et al. 2013; Henquin 2009). El estímulo presenta aproximadamente un minuto de retraso, ya que este corresponde al tiempo necesitado para que se lleve a cabo la entrada y el metabolismo de la glucosa en las células- $\beta$  (Rorsman & Renström 2003).

La secreción de insulina comienza con el primer sensor de la glucosa encontrado en la célula- $\beta$ , el cual corresponde al transportador GLUT2. Este transportador es capaz de internalizarla en gran cantidad debido a su afinidad por el sustrato. Una vez dentro de la célula, la glucosa es fosforilada por la enzima glucocinasa. Esta enzima es considerada como el principal sensor de la glucosa que tienen las células- $\beta$ , y esto es debido a sus características cinéticas ya que puede operar en concentraciones elevadas de glucosa, como las alcanzadas en condiciones post-prandiales y por ende favoreciendo el metabolismo de esta, requisito para la secreción de insulina.

La glucosa -6-fosfato es metabolizada a través de la glucólisis dando como resultado la formación de piruvato, el cual será oxidado en la mitocondria para producir ATP a partir de ADP, por ende incrementando la relación ATP/ADP. El

aumento de la concentración de ATP conlleva al cierre de los canales de potasio sensibles a ATP, impidiendo la salida de los iones de  $K^+$  y provocando una despolarización de la membrana celular. Dicha despolarización a su vez provocará la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje, por lo cual aumentará la concentración intracelular de este ión, favoreciendo la fusión de los gránulos de insulina con la membrana celular y por ende culminándose la liberación de esta hormona (fig.4).

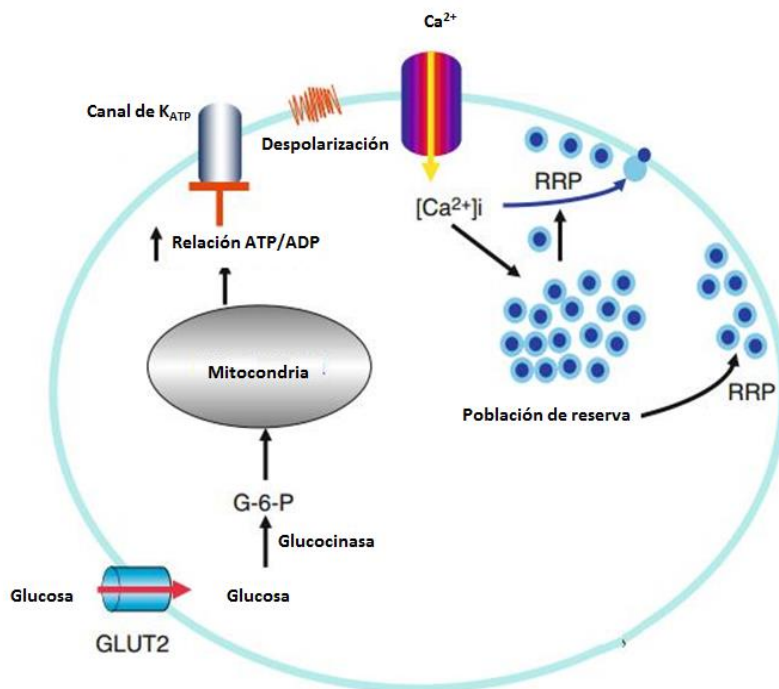


Fig. 4 Secreción de insulina. Modificado de (Hou et al. 2009)

En un estado basal de glucosa ( $\sim 3$  mM), los canales de  $K^+$  dependientes de ATP se mantienen abiertos, permitiendo el eflujo de este ión y manteniendo un potencial de membrana cercano a  $-70$  mV, por lo cual no hay una secreción de insulina estimulada, sino basal, debido a la actividad de los canales de  $Ca^{2+}$  altamente sensibles a voltaje (Fu et al. 2013; Hou et al. 2009). Dicha secreción basal consta en la liberación de 1 gránulo de insulina por minuto (Bratanova-Tochkova et al. 2002; Rorsman & Renström 2003).

### **B.3.1.2.2. Fases de la secreción de insulina**

La secreción de insulina en respuesta a concentraciones hiperglucémicas (mayores a 7 mM) es un proceso que presenta dos etapas o fases: una primera fase de duración corta (aprox. 10 minutos) caracterizada por una gran liberación de insulina (1.4 nmol/min en humanos) y una segunda fase de mayor tiempo pero en la cual la liberación de insulina es menor (~0.4 nmol/min)(fig. 5). El modelo más aceptado para explicar este patrón bifásico se basa en la existencia de diferentes tipos funcionales de gránulos de secreción. Del total del número de gránulos de insulina por célula- $\beta$ , cerca del 1 – 5 % (dependiendo de las condiciones experimentales) son denominados como “listos para la liberación” (RRP por sus siglas en inglés Readily Releasable Pool, fig.4). Se ha propuesto que esta población de gránulos es el fundamento de la primera fase de secreción de insulina, ya que su exocitosis depende principalmente de la despolarización de la membrana (Rorsman & Renström 2003) y no de un requerimiento energético. Se ha estimado que entre 15–18 gránulos de insulina son liberados por minuto durante esta fase (Bratnova-Tochkova et al. 2002; Rorsman & Renström 2003). Sin embargo, otros calculan que se liberan cerca de 40 – 100 gránulos por célula- $\beta$  durante toda la primera fase (Hou et al. 2009; Henquin 2009).

El 95-99% restante de los gránulos pertenecen a una “población de reserva”, los cuales se encargan de restablecer a los gránulos “listos para la liberación” una vez que estos se han agotado, sin embargo antes tienen que ser sometidos a procesos de iniciación dependientes de temperatura, tiempo,  $\text{Ca}^{2+}$  y ATP, lo cual en un contexto más general los hace dependientes de un mayor metabolismo de glucosa (Rorsman & Renström 2003). Este proceso de iniciación dependiente de energía hace que sean considerados como la razón de la segunda fase de secreción de la insulina, durante la cual se secretan entre 5–6 gránulos de insulina por minuto (Bratnova-Tochkova et al. 2002; Rorsman & Renström 2003).

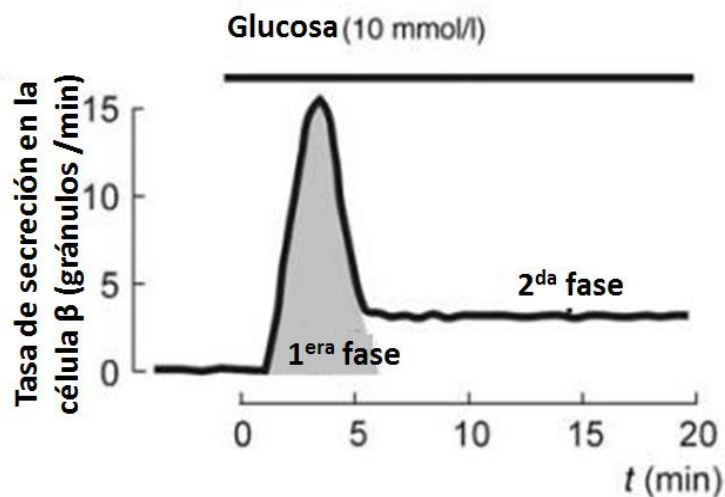


Fig. 5 Fases de la secreción de insulina estimulada por glucosa. Tomado de (Rorsman & Renström 2003)

### B.3.2. Célula- $\alpha$

La población de células- $\alpha$  constituye el segundo grupo con mayor proporción dentro de los islotes pancreáticos. A través del principal producto de secreción que tienen, es decir el glucagon, tienen un papel importante en la regulación de la homeostasis de la glucosa. En términos generales, el glucagon es catalogado como la principal hormona antagonista de los efectos de la insulina, ya que mientras esta última tiene como principal efecto la disminución de la hiperglucemia después del consumo de alimentos, el glucagon se encarga de contrarrestar las situaciones de hipoglucemia causadas por el ayuno.

#### B.3.2.1. Glucagon

##### B.3.2.1.1. Síntesis y procesamiento

El gen de glucagon no solo se expresa en las células- $\alpha$  del islote pancreático, sino también en cerebro y células del intestino delgado conocidas como células L. Una vez hecha la transcripción del gen de glucagón así como la traducción de su ARNm, se obtiene como resultado una molécula de 180 aminoácidos

conocida como pre-pro-glucagon, la cual se somete a la escisión de sus primeros 20 aminoácidos para dar origen al pro-glucagon. Este último se caracteriza por contener las secuencias encargadas para la síntesis de glucagón y de los péptidos conocidos como GLP-1 y GLP-2 (de sus siglas en inglés "Glucagon Like Peptide"), principales productos de secreción de las células L (Gromada et al. 2007)(fig.6).

En las células- $\alpha$  , el pro-glucagon es procesado por obra de la enzima PC 2 (prohormone-convertase 2) formando al glucagón, al polipéptido relacionado a glicentina (GRPP), al péptido IP-1 (separador de la secuencia del glucagón de la del GLP-1) y al fragmento MPGF (de sus siglas en inglés Major Pro Glucagon Fragment) el cual contiene a las secuencias correspondientes al GLP-1 y GLP-2 así como al péptido que las separa (IP-2)(fig.6).

Mientras tanto, en las células L, el proglucagon es procesado por obra de la enzima PC 1/3, dando origen al GLP-1, GLP-2, al péptido IP-2 y a la glicentina (constituida por las regiones del GRPP, glucagón y el péptido IP-1) (Gromada et al. 2007).

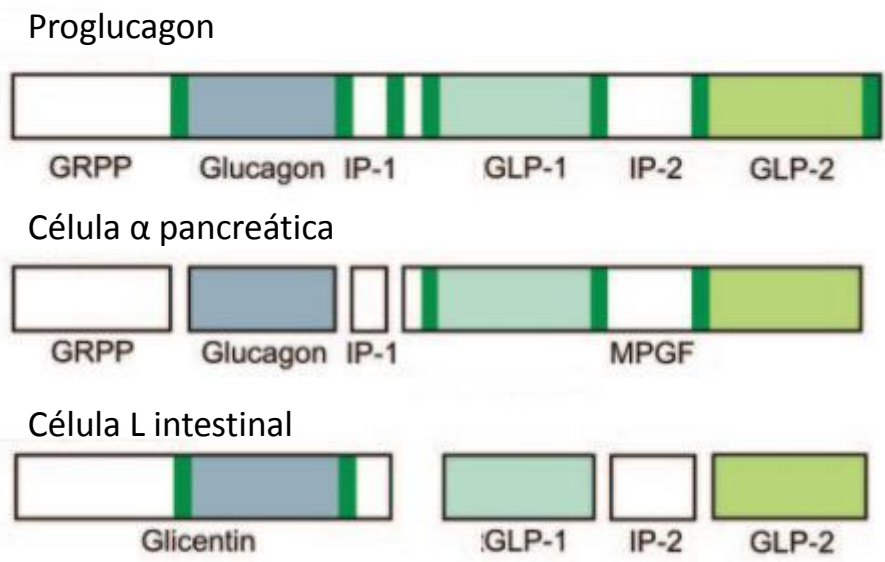


Fig.6 Procesamiento del proglucagon. Modificado de (Gromada et al. 2007)

### B.3.2.2. Secreción de glucagón

Utilizando al ratón como modelo de estudio se ha postulado que la secreción de glucagón se basa principalmente en la función de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^{+}$  dependientes de voltaje y no en la correspondiente a los canales de  $\text{K}^{+}$  dependientes de ATP (Gromada et al. 2007; Quesada et al. 2008a) como sucede con las células- $\beta$ . El primer paso en el proceso de la secreción de glucagón consta en la internalización de la glucosa a la célula- $\alpha$  por obra del transportador de glucosa GLUT-1. Cuando las concentraciones de glucosa son bajas (menores a 3 mM) los canales de  $\text{K}^{+}$  dependientes de ATP mantienen un potencial de membrana cercano a los -60 mV. En dicho voltaje, se permite la apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T que se caracterizan por ser muy sensibles a pequeños cambios de voltaje. Estos últimos canales, una vez abiertos, se encargarán de despolarizar la membrana a niveles que permitan la apertura de los canales de  $\text{Na}^{+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$  tipo N dependientes de voltaje. Con la subsecuente entrada de los iones, principalmente de  $\text{Ca}^{2+}$  se favorece la fusión de los gránulos que almacenan las moléculas de glucagón con la membrana celular, culminando de esta forma la secreción de glucagón (fig.7).

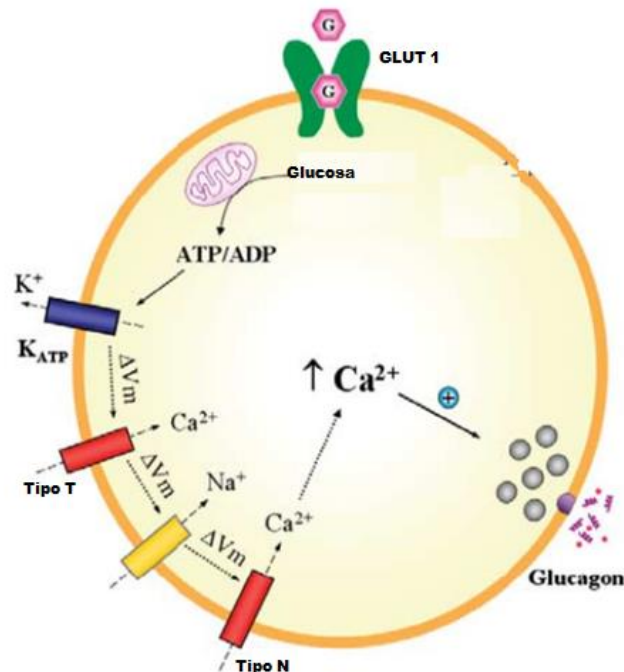


Fig.7 Secreción de glucagón. Modificado de (Gromada et al. 2007)

El aumento en la concentración de glucosa y por ende la generación de ATP intracelular provoca el cierre de los canales de  $K^+$  dependientes de ATP, despolarizando la membrana. Esto a su vez inactivará a los canales de  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje, inhibiendo la secreción de glucagon.

Los mecanismos de regulación de la secreción de glucagon son tema de debate hoy día, pues por una parte hay quienes apoyan la teoría de una secreción regulada por las concentraciones de glucosa de manera directa sobre las células- $\alpha$ , es decir que estas son capaces de detectar dichas concentraciones y responder acorde a ellas (Salehi et al. 2006). Por otra parte, la regulación puede ser dada por acción del sistema nervioso a través de neuronas capaces de detectar los cambios en la concentración de glucosa sanguínea y estimular o inhibir la secreción de glucagon según sea el caso (Gromada et al. 2007; Quesada et al. 2008). Sin embargo, la teoría que más fuerza tiene es aquella que indica una regulación por el efecto paracrino/endocrino de los productos de secreción de otros tipos celulares del islote pancreático, principalmente la insulina de las células- $\beta$  (Kawamori et al. 2009), así como de la somatostatina de las células- $\delta$ , la grelina de las células  $\epsilon$ , el ácido gama-aminobutírico (GABA) y el zinc nuevamente de las células- $\beta$  así como el propio glucagon pueden tener efectos (Gromada et al. 2007; Kawamori et al. 2011; Quesada et al. 2008a).

#### ***B.4. Masa de las células del islote pancreático***

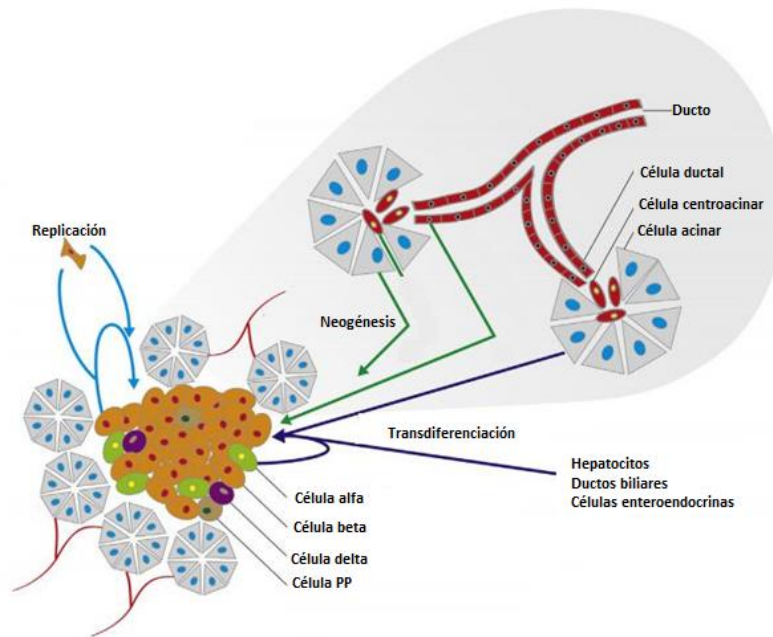
El establecimiento y mantenimiento de la masa celular de cualquier tejido requiere de procesos que favorezcan el incremento o la disminución de ésta. El incremento puede darse por dos formas: por un aumento en el número de células, es decir por una hiperplasia o por un aumento en el tamaño celular, también conocido como hipertrofia. Mientras tanto, la disminución de la masa celular puede provenir por una baja en el número de células (hipoplasia) así como en el tamaño (hipotrofia). En el caso de la masa de las células que conforman el islote pancreático procesos como la proliferación, la neogénesis,



la apoptosis y la transdiferenciación están relacionados en su establecimiento y mantenimiento (fig.8).

El proceso de la proliferación se da por la división celular por mitosis, es decir que una célula- $\beta$  o  $\alpha$  generan dos células idénticas. En tanto que la neogénesis se define como la diferenciación de nuevas células generadas a partir de células precursoras o troncales (Bonner-Weir et al. 2010; Paris et al. 2004), cuya ubicación se reporta mayoritariamente ser de tipo ductal, aunque también puede ser acinar o estar dentro del mismo islote (Nichols et al. 2014; Paris et al. 2004). Dado que ambos procesos culminan en la generación de nuevas células, ambas son procesos de hiperplasia.

Por otro lado, se define a la transdiferenciación como el proceso que consta de la formación de nuevas células a partir de células ya diferenciadas. El principio de dicho proceso es la existencia de factores de transcripción que actúan como “reguladores maestros”, ya que tienen un efecto dominante sobre la identidad celular. Cualquier perturbación sobre los programas regidos por esos factores de transcripción es suficiente para desestabilizar los fenotipos celulares diferenciados (Nichols et al. 2014); por ejemplo, la generación de células- $\beta$  a partir de células- $\alpha$  (o viceversa), acinares o incluso células extra pancreáticas como células hepáticas y entero-endocrinas (Nichols et al. 2014; Bouwens & Rooman 2005a). La transdiferenciación puede clasificarse como un proceso de hiper o hipoplasia dependiendo de si la célula de interés se genera a partir de otra o por el contrario genera a otra, respectivamente. Finalmente, la apoptosis, también definida como la muerte celular programada, es un proceso clasificado como hipoplásico, ya que el resultado de este es la disminución del número de células.



**Fig.8 Procesos involucrados en la generación y mantenimiento de la masa células del islote pancreático. Modificado de Nichols et al 2014**

A pesar de la existencia de 5 tipos celulares conformando al islote, mucha de la investigación realizada en relación a los procesos reguladores de la masa celular ha sido hecha principalmente sobre las células- $\beta$ , debido a la importancia que tienen estas en el desarrollo de la diabetes mellitus, y aún son pocos los estudios realizados sobre la masa de las células delta, épsilon y PP. Para el caso de la masa de células- $\alpha$ , esta ha comenzado a ser tema de mayor estudio (Gromada et al. 2007; Quesada et al. 2008a), aunque dicha investigación aún está lejos del volumen de estudios realizados con células- $\beta$ .

Cabe mencionar que aunque la proliferación, la neogénesis, la transdiferenciación y la apoptosis son procesos clave en el establecimiento y mantenimiento de la masa de las células que conforman al islote pancreático, su participación dista mucho de ser equitativa ya que el aporte que cada uno tenga varía en diferentes etapas de la vida así como en condiciones fisiológicas o fisiopatológicas (Gunasekaran et al. 2012) como se señala en la fig.9 para el caso de las células- $\beta$ .

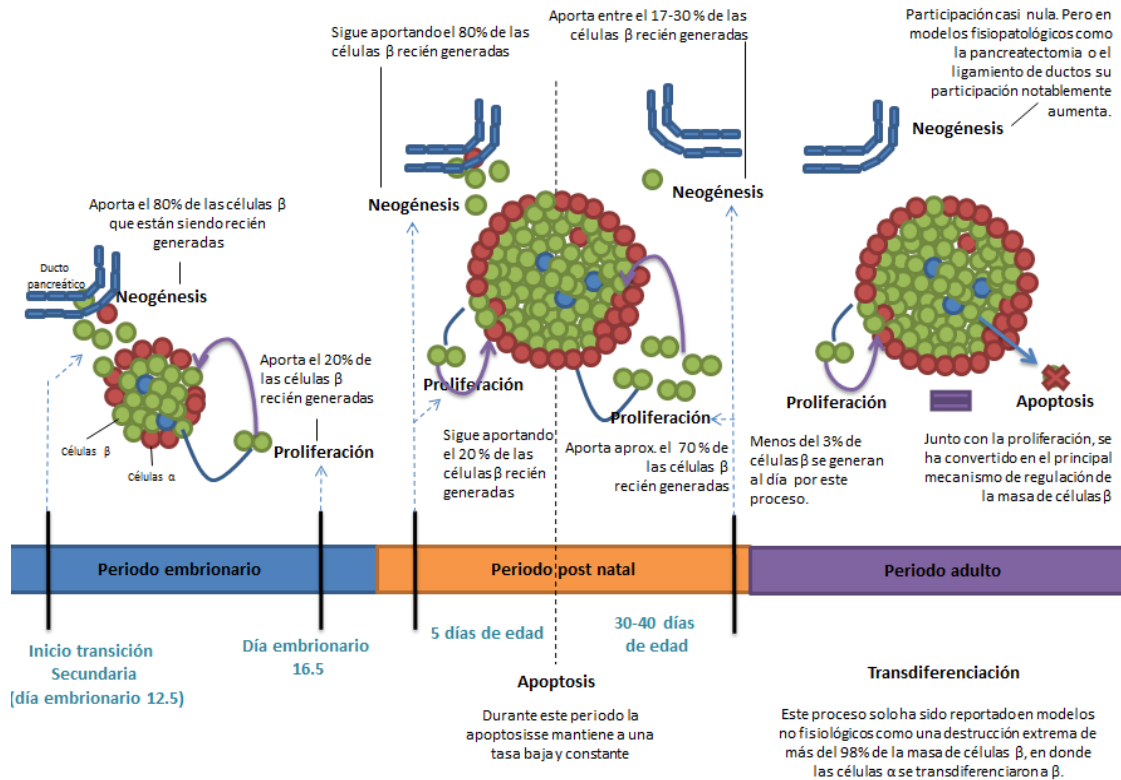


Fig. 9 Dinámica de los procesos que regulan la masa de células- $\beta$  a través del crecimiento. Imagen basa en los trabajos de (Finegood et al. 1995; Montanya et al. 2000; Scaglia et al. 1997; Georgia & Bhushan 2004; Dor et al. 2004; Nir et al. 2007; Inada et al. 2008; Xu et al. 2008; Collombat et al. 2010b; Thorel et al. 2010; Hyperplasia et al. n.d.; Bonner-Weir et al. 2004; Teta et al. 2005).

### B.5. Ventana crítica

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

El periodo embrionario y la lactancia constituyen una ventana crítica en el desarrollo de los islotes pancreáticos. Por ejemplo, alteraciones en el crecimiento intrauterino a través de la disminución de flujo sanguíneo al feto provoca una reducción drástica de más del 70% de la masa de células- $\beta$  de estos animales cuando alcanzan las 26 semanas de edad, a pesar de que durante las primeras 7 semanas de edad no se haya observado ninguna diferencia (Simmons et al. 2001). Una desnutrición en el periodo embrionario, a través de una restricción al alimento materno genera una reducción en la masa

de células- $\beta$  en las crías, lo que provoca, en etapas adultas, intolerancia a la glucosa y desarrollo de diabetes tipo 2 (Garofano et al. 1997).

Igualmente, una desnutrición durante la lactancia conlleva a defectos en el peso corporal, intolerancia a la glucosa (Miñana-Solis & Escobar 2007) e incluso al desarrollo de diabetes tipo 2 en etapas posteriores de la vida (Garofano et al. 1999).

El periodo correspondiente al destete también es considerado como un periodo de ventana crítica en el desarrollo de los islotes pancreáticos, ya que factores externos, como lo es una mala nutrición durante este tiempo provoca intolerancia a la glucosa así como alteraciones en las concentraciones sanguíneas de insulina y glucagon en etapas adultas (Miñana-Solis & Escobar 2008). Incluso, estos efectos no pueden ser revertidos por una nutrición óptima subsecuente a la mala nutrición que se dio posterior al destete. Esto resulta interesante porque se ha encontrado que, cuando la mala nutrición se produce durante el periodo embrionario o la lactancia, los efectos pueden ser revertidos en etapas posteriores si se efectúa un cambio a una buena nutrición. Lo que sugiere que modificaciones en la maduración de los islotes pancreáticos durante el periodo después del destete tienen un mayor impacto en etapas adultas que aquellos provocados durante el desarrollo embrionario y la lactancia (Miñana-Solis & Escobar 2008).

### ***B.6. Diabetes mellitus***

La Asociación de Diabetes Americana (ADA por sus siglas en inglés de American Diabetes Association, 2009) define a la diabetes mellitus como “un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia como resultado de defectos en la secreción y/o acción de la insulina”. Además esta asociación propone tres formas para diagnosticar este padecimiento:

1. Tener una concentración de glucosa sanguínea en ayuno de mínimo 8 horas mayor o igual a 126 mg/dl (7.0 mmol/l).

2. Poseer una concentración de glucosa sanguínea casual (es decir en cualquier momento del día sin considerar el tiempo desde el último alimento) mayor o igual a 200 mg/dl (11.1 mmol/l) además de presentar los síntomas clásicos de la hiperglucemia los cuales incluyen poliuria (aumento en el volumen de orina), polidipsia (aumento en la sensación de sed) y pérdida de peso repentina.
3. Tener una concentración de glucosa sanguínea mayor o igual a 200 mg/dl (11.1 mmol/l) después de dos horas durante una prueba oral de tolerancia a la glucosa, en la cual se utiliza una carga de glucosa equivalente a 75 gr disuelta en agua.

Los síntomas clínicos que generalmente se pueden presentar como consecuencia de la hiperglucemia son la polifagia (aumento en la frecuencia de alimentarse), visión borrosa, deterioro en el crecimiento así como una mayor susceptibilidad a infecciones.

El padecer de diabetes mellitus a largo plazo conlleva un aumento en la probabilidad de presentar complicaciones las cuales abarcan la pérdida de la visión a causa de la retinopatía; falla renal y deterioración de los riñones provocado por la nefropatía; úlceras y amputaciones de extremidades, principalmente los pies, debido a la neuropatía periférica; problemas gastrointestinales y genitourinarios; disfunción sexual y problemas cardiovasculares. (American Diabetes Association. 2009; International Diabetes Federation 2013).

### **B.6.1. Epidemiología de la diabetes**

En el 2013 la IDF (IDF por sus siglas en inglés International Diabetes Federation) estimó que a nivel mundial existen 382 millones de personas diagnosticadas con diabetes, equivalente al 8.3% de la población adulta y que para el 2035 esta cifra aumentará a 593 millones. La distribución por género muestra que existen más hombres con este padecimiento que mujeres, habiendo 198 millones de hombres diabéticos contra 184 millones de mujeres.

Aunado a esto, en 2013 se calculó la existencia de 316 millones de personas en etapa pre diabética y se considera que estos aumentarán a 471 millones para el 2035 (International Diabetes Federation 2013).

En México, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) del 2012 (Hernández-Ávila et al. 2013) reportó que la población adulta que padece diabetes es de alrededor de 6.4 millones (9.17% de la población nacional) y esta cantidad puede aumentar a alrededor de entre 12 y 16 millones durante el periodo 2030-2035 (Shaw et al. 2010; International Diabetes Federation 2013). Además, la ENSANUT del 2012 también muestra que la población diabética en México está mayormente compuesta por mujeres, pues existen 3.56 millones de mujeres diabéticas frente a 2.84 millones de hombres con este padecimiento (Hernández-Ávila et al. 2013).

### **B.6.2. Costos económicos de la diabetes**

La diabetes no solo es un padecimiento que afecta únicamente a la salud física y emocional de las personas sino que también tiene un coste económico para éstas y para las instituciones de salud. En 2013 la IDF estimó que el gasto económico global para tratar la diabetes y sus complicaciones fue de al menos 548,000 millones de dólares, lo cual se proyecta aumentar a 627,000 millones anuales para el 2035 y que el gasto promedio anual por persona fue de 1437 dólares (International Diabetes Federation 2013). Para el caso de México, se estimó que en el 2011 el gasto económico total fue de 7,700 millones de dólares con un gasto promedio anual por persona de 707 dólares (Arredondo & Reyes 2013).

### **B.6.3. Clasificación de diabetes mellitus**

Existen distintos tipos de diabetes mellitus, siendo su etiología la principal característica para su clasificación. Los tres tipos de diabetes más comunes son: la tipo I, II y la gestacional. Cabe mencionar que existen otros tipos de diabetes, causadas ya sea por: defectos genéticos en las células- $\beta$  (conocidas

como diabetes tipo MODY), defectos genéticos en la acción de la insulina, enfermedades del páncreas exocrino, endocrinopatías, químicos y medicamentos así como por infecciones (American Diabetes Association. 2009). Sin embargo, de todos los tipos de diabetes, la tipo 1 y 2 son las más frecuentes (fig.10).

#### **B.6.3.1. Diabetes tipo 1**

Este tipo de diabetes abarca en el mundo de un 5 a un 10% del total de casos de diabetes diagnosticados. La etiología de este tipo consiste en la destrucción de células- $\beta$  como resultado de una acción autoinmune, por lo que es común encontrar en personas con diabetes mellitus tipo 1 anticuerpos contra insulina, ácido glutámico descarboxilasa ( $GAD_{65}$ ) y tirosina fosfatasa 2 y  $2\beta$  (IA-2 e IA- $2\beta$ ), las cuales son proteínas características de células- $\beta$ . La destrucción de estas células ocasiona la disminución o la falta de insulina, por lo que previamente era denominada diabetes insulino-dependiente. Aunque en un inicio se creía que únicamente se presentaba en niños y jóvenes, también puede ocurrir en adultos. Las razones del ataque autoinmune aún están poco definidas, sin embargo se considera que predisposiciones genéticas y factores ambientales son la base de la enfermedad (International Diabetes Federation 2013; American Diabetes Association. 2009)

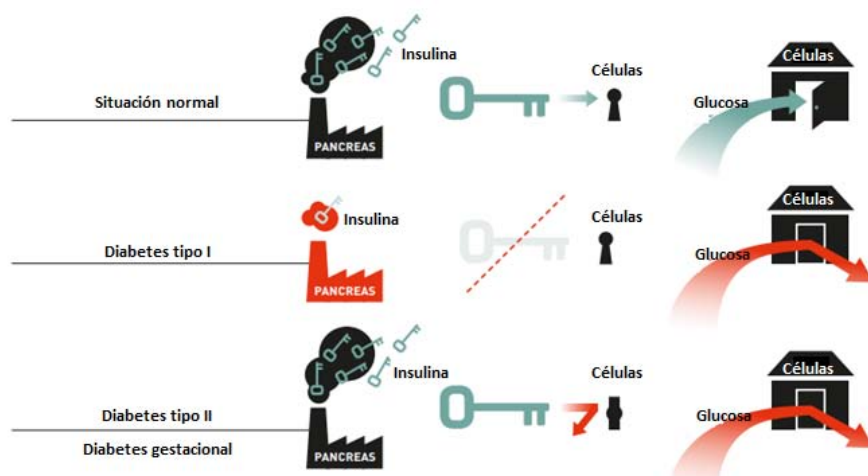
#### **B.6.3.2. Diabetes tipo 2**

Este tipo de diabetes constituye aproximadamente de un 90 a un 95% del total de casos mundiales de diabetes diagnosticados. El padecimiento generalmente aparece en edades posteriores a los 40 años, por lo que también se conoce como Diabetes de la Edad Adulta. Este tipo de diabetes se caracteriza por una disminución en la acción de la insulina, situación conocida como resistencia a la insulina, que no puede ser compensada por la secreción requerida de la hormona para compensar la resistencia. Factores de riesgo para desarrollar este tipo de diabetes son la obesidad, el aumento en el porcentaje de grasa acumulada en la región abdominal, inactividad física, antecedentes familiares

con diabetes y el envejecimiento (American Diabetes Association. 2009; International Diabetes Federation 2013)

### B.6.3.3. Diabetes gestacional

La etiología de este tipo de diabetes está dada por los cambios hormonales que se producen en el embarazo cuya función es la de favorecer el crecimiento del feto, esta acción conlleva, al igual que en el caso de la diabetes tipo 2, a una resistencia a la insulina. Cuando esta no puede ser compensada por la secreción requerida de esta hormona se produce la condición de diabetes gestacional.



**Fig. 10 Principales tipos de diabetes.** Tomado de International Diabetes Federation, 2013. En situaciones normales las células- $\beta$  pancreáticas producen y secretan insulina, la cual actúa favoreciendo la entrada de glucosa a las células. En la diabetes tipo 1 la insulina no se produce debido a la destrucción autoinmune de las células- $\beta$ . En la diabetes tipo 2 la entrada de glucosa está alterada por la resistencia a la insulina.

### B.6.3.4. Etapa pre diabética

La transición de un estado sano hacia un estado diabético es un proceso gradual, denominado pre-diabetes o intolerancia a la glucosa. La ADA establece que los criterios para definir la etapa pre diabética son 1) tener concentraciones de glucosa sanguínea en ayuno (mínimo de 8 horas) mayores a 100 mg/dl (5.6 mmol/l) pero menores a 126 mg/dl (7 mmol/l) y/o 2) tener



concentraciones de glucosa sanguínea 2 horas después de una prueba oral de tolerancia a esta mayores de 140 mg/dl (7.8 mmol/l) pero menores a 200 mg/dl (11.1 mmol/l) (American Diabetes Association. 2009).

#### **B.6.4. Cambios del islote pancreático durante la progresión a diabetes**

##### **B.6.4.1. Diabetes mellitus tipo 1**

El diagnóstico de la diabetes mellitus tipo 1 ocurre una vez que ha desaparecido cerca del 70-80% de la masa de las células- $\beta$ . Sin embargo, la pérdida progresiva de células- $\beta$  ocurre a través de los años mucho antes de desarrollarse la diabetes (Mathis et al. 2001). Este daño puede ocasionar una reducción en la primera fase de secreción de insulina que se presenta en pacientes que ya tienen anticuerpos contra el islote pero que aún no desarrollan hiperglucemia (Mathis et al. 2001).

La progresión de la diabetes tipo 1 después del inicio de la respuesta autoinmune se divide en dos fases: insulitis y diabetes franca (Finegood et al. 1995). La apoptosis de las células- $\beta$  se presenta en ambas fases (Kassem et al. 2000) e incluso se ha propuesto que participa en la iniciación de la respuesta autoinmune por medio de la generación de autoantígenos (Eizirik et al. 2009). Estos autoantígenos son reconocidos por células presentadoras de antígenos, que llegan a los nódulos linfáticos del páncreas y son reconocidas por las células T, iniciándose el proceso inflamatorio o insulitis (Cardozo et al. 2001; Cnop et al. 2005).

Las células- $\beta$  son capaces de producir y liberar citocinas en respuesta a factores inflamatorios como IL-1 $\beta$  and IFN $\gamma$  (Eizirik et al. 2009). Estas citocinas, además de promover la muerte de las mismas células- $\beta$ , también pueden contribuir al reclutamiento y activación de otras células inmunes (Mathis et al. 2001; Cnop et al. 2005) sosteniendo el proceso inflamatorio localizado en el medio de la célula- $\beta$  (Strandell et al. 1990). Una vez establecida la insulitis, se establece una falla en la función de las células- $\beta$  y una posterior destrucción selectiva de células- $\beta$  (Akirav et al. 2008).

#### **B.6.4.2. Diabetes mellitus tipo 2**

La diabetes tipo 2 surge cuando las células- $\beta$  no logran secretar suficiente insulina para responder a la demanda ocasionada por la resistencia a la insulina, debido a una disfunción secretora adquirida de la célula- $\beta$  y/o a una disminución en su masa (Weir et al. 2001).

La falla progresiva de la célula- $\beta$  que se presenta en la diabetes tipo 2 puede deberse tanto a factores genéticos como a factores adquiridos. Los factores genéticos comprenden defectos en la expresión de los genes del metabolismo de la glucosa en la célula- $\beta$  y los factores transcripcionales, mientras que los factores adquiridos incluyen el estrés oxidativo, la glucotoxicidad, la lipotoxicidad, el incremento en los depósitos de polipéptido amiloide del islote, la disfunción mitocondrial y la inflamación por citocinas en la célula- $\beta$  (Leahy et al. 2010). La masa de las células- $\beta$  también juega un papel fundamental para determinar si un individuo evolucionará hacia diabetes tipo 2 o sólo cursará con resistencia a la insulina (Rhodes 2005). Al igual que para la diabetes tipo 1, se calcula que alrededor del 50% de la masa total de células- $\beta$  está disminuida al momento del diagnóstico de la diabetes tipo 2 (Leahy et al. 2010).

Cuando el organismo se encuentra en un estado de alta demanda metabólica, como en la obesidad, el embarazo y la resistencia a la insulina, los islotes pancreáticos responden incrementando la secreción de insulina para mantener la normoglicemia, un proceso denominado compensación de la célula- $\beta$ . Este estado se caracteriza por una expansión de la masa de la célula- $\beta$  y un incremento en su función (Prentki & Nolan 2006), aunado a una modificación de la arquitectura del islote (Kim et al. 2009).

#### **B.6.4.3. Estreptozotocina y su uso en la inducción experimental de diabetes mellitus**

La estreptozotocina es un compuesto químico con propiedades tóxicas para las células- $\beta$  del islote pancreático, por lo cual ha sido uno de los mejores candidatos para el desarrollo de modelos experimentales con el fin de estudiar

la diabetes mellitus, procedimientos que se remonta desde la década de los 60s. Su estructura molecular corresponde a una molécula de 2-desoxy-D-glucosa cuyo carbón 2 ha sido sustituido con un grupo N-metil-N-nitrosourea (fig. 11).

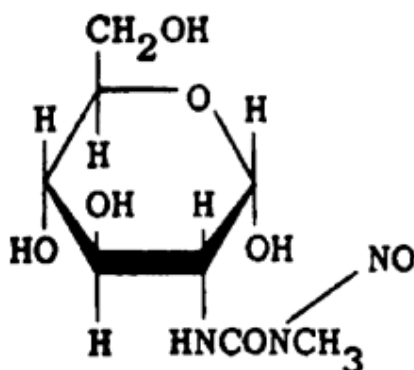


Fig.11 Estructura molecular de la estreptozotocina. Tomada de (Bolzán & Bianchi 2002)

La inducción de diabetes con estreptozotocina puede realizarse ya sea por el método de una dosis alta y única o por dosis bajas y múltiples. El modelo de una dosis única tiene la ventaja de que su efecto es observable en cuestión de horas, sin embargo su inestabilidad en términos de la condición diabética provocada así como un alto porcentaje de mortalidad han hecho al modelo de dosis múltiple el más usado (Sakata et al. 2012).

#### **B.6.4.3.1. Mecanismos de acción de la estreptozotocina en el modelo de bajas dosis múltiples**

Debido a la glucosa que se encuentra en la estructura química de la estreptozotocina, ésta es capaz de internalizarse a la célula-β a través del transportador de glucosa GLUT 2. Se ha sugerido que la toxicidad de este agente químico dentro de la célula se debe principalmente a la metilación de las guaninas que conforman el ADN, provocando la fragmentación de este (Bolzán & Bianchi 2002; Lenzen 2008; King 2012). En respuesta a dicho daño, la célula sobre estimula a la polimerasa poli (ADP-ribosa) con la intención de reparar el daño al ADN, sin embargo esto conlleva al agotamiento del NAD<sup>+</sup> celular y subsecuentemente de las reservas de ATP, sentenciando a la muerte

celular (Lenzen 2008; Bolzán & Bianchi 2002) por apoptosis (O'Brien et al. 1996). La generación de especies reactivas de oxígeno también ha sido sugerida como una explicación de la toxicidad de la estreptozotocina (Bolzán & Bianchi 2002; Lenzen 2008; King 2012).

#### **B.6.4.3.2. Efectos de la estreptozotocina sobre el islote pancreático**

Los principales efectos que tiene la estreptozotocina sobre el islote pancreático abarcan el daño en la síntesis y secreción de insulina en respuesta a glucosa así como un metabolismo afectado de esta última (V Bonnevie-Nielsen et al. 1981; Lenzen 2008). También hay alteraciones en la expresión génica como el aumento en la transcripción de genes regulados por el factor de transcripción p53 para la detención del ciclo celular así como una disminución de genes relacionados en la función de la célula- $\beta$  como el transportador de glucosa GLUT2 (Tonne et al. 2013).

Sin embargo, las alteraciones provocadas por la estreptozotocina no solo se engloban en el contexto funcional del islote pancreático, sino también en el aspecto morfológico ya que se ha reportado una disminución en el número y área de los islotes principalmente por la disminución de las células- $\beta$  (V Bonnevie-Nielsen et al. 1981; O'Brien et al. 1996; Li, F. a Karlsson, et al. 2000). Por otra parte, también se ha reportado un aumento en la población de células- $\alpha$ , así como una mayor presencia de estas en el núcleo del islote pancreático (Li, F. a Karlsson, et al. 2000).

### **B.7. Biotina**

#### **B.7.1. Estructura química**

La biotina, también llamada B7 o vitamina H, es una vitamina hidrosoluble del complejo B cuya estructura química consiste en un compuesto bi-cíclico con un anillo que contiene un grupo ureido (-N-CO-N-) y otro que contiene un azufre del cual se ramifica una cadena lateral de ácido valérico (fig.12). De los ocho

estereoisómeros que existen en la naturaleza, solo la D-biotina es enzimáticamente activa.

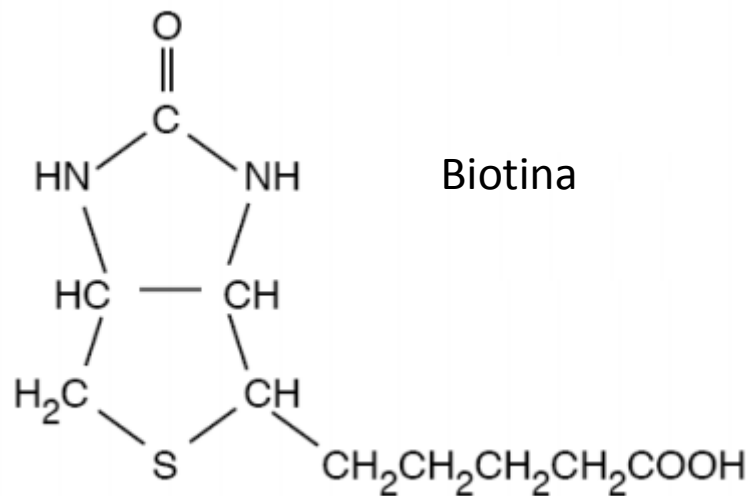


Fig.12 Estructura química de la biotina

### B.7.2. Función y requerimientos de la biotina

La función de la biotina es actuar como grupo prostético de las carboxilasas: acetil-CoA carboxilasa 1 y 2, piruvato carboxilasa, propionil-CoA carboxilasa y  $\beta$ -metilcrotonil-CoA carboxilasa las cuales juegan un papel crítico en la síntesis y oxidación de ácidos grasos, gluconeogénesis así como en el metabolismo de aminoácidos.

A pesar de la importante función de la biotina, los mamíferos no son capaces de sintetizarla por lo cual la tienen que adquirir principalmente a través de la dieta. Alimentos como la yema de huevo, algunos vegetales, la leche de vaca así como el hígado y riñones son una rica fuente de biotina. Además, la microbiota del intestino grueso es capaz de producir esta vitamina, por lo cual conforman una segunda fuente, aunque la contribución relativa de esta aún no ha sido definida (Said 2012). El consumo diario para la biotina se ha estimado ser de 5  $\mu$ g y de 30–35  $\mu$ g en infantes y adultos, respectivamente (Fernandez-Mejia & Lazo-de-la-Vega-Monroy 2011; Zemleni et al. 2009).

### **B.7.3. Efectos de la biotina en dosis farmacológicas**

De manera independiente a las funciones clásicas de la biotina como grupo prostético de carboxilasas, se ha reportado que en dosis farmacológicas la biotina modifica otros procesos biológicos como lo son el metabolismo de carbohidratos y lípidos, la diferenciación celular, la hipertensión, el desarrollo, reproducción así como en funciones del sistema inmune (Fernandez-Mejia & Lazo-de-la-Vega-Monroy 2011) principalmente a través de la regulación de genes relacionados con tales procesos (Rodriguez-Melendez & Zemleni 2003). Los mecanismos moleculares para esta regulación génica de la biotina se conocen poco (Said 2012; Fernandez-Mejia & Lazo-de-la-Vega-Monroy 2011).

#### **B.7.3.1. Biotina y el metabolismo de la glucosa**

Como ya se mencionó, en concentraciones farmacológicas, la biotina ha mostrado tener un efecto en el metabolismo de la glucosa. Los primeros reportes que se tienen acerca de tales efectos se remontan desde hace varias décadas con los trabajos de Dakshinamurti y colegas, en los cuales observaron un aumento de la actividad de la glucocinasa en el hígado de ratas en ayuno en respuesta a la administración intraperitoneal de 1mg/kg de peso (Dakshinamurti & Cheah-Tan 1968). Con el desarrollo de la biología molecular se encontró que el aumento en la actividad de la glucocinasa producida por la biotina se encuentra ligada a un aumento en su transcripción (Sugita et al. 2008; Chauhan & Dakshinamurti 1991). La glucocinasa es una enzima clave en la regulación de la glucemia, por lo que resulta interesante que otra proteína clave, como lo es el receptor de insulina, también sea regulado por la biotina, como fue observado en la línea celular de hepatoblastoma HuH-7 (Luis & Stockert 2000).

Por otra parte, genes cuyos productos proteicos regulan la vía de la gluconeogénesis como la fosfoenol piruvato carboxicinas (Dakshinamurti & Li 1994; Sugita et al. 2008) y la glucosa-6-fosfatasa (Sugita et al. 2008) se ven

disminuidos en respuesta a dosis farmacológicas de biotina en modelos diabéticos.

En los islotes pancreáticos, la biotina aumenta la expresión de genes como la glucocinasa y la insulina (Romero-Navarro et al. 1999; Vilches-Flores et al. 2010; Yoshikawa et al. 2002; Lazo de la Vega-Monroy et al. 2013). Aunado a esto, se ha observado que concentraciones farmacológicas de biotina producen un aumento en la secreción de insulina basal (Romero-Navarro et al. 1999; Lazo de la Vega-Monroy et al. 2013) y estimulada por glucosa (Sone et al. 2000; Sone et al. 2004; Yoshikawa et al. 2002; Vilches-Flores et al. 2010; Romero-Navarro et al. 1999; Lazo de la Vega-Monroy et al. 2013).

#### **B.7.3.2. Biotina y el metabolismo de la glucosa en humanos**

En humanos con diabetes tipo 1 que recibieron una dosis de 16 mg/día de biotina durante una semana se observó una reducción en la hiperglucemia (Coggeshall 1985). Cuando a pacientes japoneses con diabetes tipo 2 se les trató durante un mes con biotina en una dosis de 9 mg/día se observó una disminución del 45% en la concentración de glucosa sanguínea en ayuno (Maebashi & Makino 1993). En pacientes con un tratamiento de hemodiálisis, dosis farmacológicas de biotina mejoraron su tolerancia a la glucosa (Koutsikos et al. 1996). En modelos animales se ha reportado que la biotina mejora la intolerancia a la glucosa en ratas con diabetes inducida por estreptozotocina (Zhang et al. 1997) y en ratas OLEFT, modelo animal de diabetes mellitus tipo 2 (Zhang et al. 1996).

## C. ANTECEDENTES DIRECTOS DEL PROYECTO

En estudios previos (Lazo de la Vega-Monroy et al. 2013) se analizó el efecto de la suplementación con biotina en la dieta sobre el funcionamiento y expresión de genes del islote pancreático. En este trabajo, se administró una dieta suplementada conteniendo una concentración de biotina igual a 97.7 mg por cada kg de dieta (aproximadamente 56 veces más biotina respecto a la dieta control usada) y se le administró a ratones de la cepa Balb/c a partir de su destete durante un periodo de 8 semanas, encontrándose, que comparados con el grupo control, los ratones que recibieron la dieta suplementada incrementaron la expresión del ARNm de factores transcripcionales que regulan la expresión y secreción de insulina, como Foxa2, Pdx1 y Hnf4- $\alpha$ , al igual que el ARNm de proteínas que participan en la secreción de insulina como la Glucocinasa y el de la misma Insulina, entre otros. En concordancia con estos efectos, los ratones suplementados mostraron una mayor tolerancia a la glucosa y un incremento en la secreción de insulina durante la prueba de tolerancia a la glucosa. Siendo este el primer estudio en reportar un aumento en la secreción de insulina de manera in vivo.

El estudio de estos autores también fue el primero en reportar cambios sobre la morfología de los islotes pancreáticos por efecto de la suplementación con biotina en la dieta, ya que se observó un aumento en la masa de las células- $\beta$  de los islotes pancreáticos del grupo suplementado. Aunado a este incremento, también se reportó que un mayor porcentaje de estos islotes suplementados presentaban células- $\alpha$  dispersas entre las células- $\beta$ .



## D. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La diabetes mellitus ha alcanzado proporciones alarmantes a nivel mundial y México no ha sido la excepción. A pesar de los esfuerzos por tratar de controlarla, las proyecciones indican que seguirá en aumento por las siguientes décadas, lo cual significa que habrá un mayor impacto social y económico tanto a las personas que la padezcan así como a las instituciones de salud. Esto ha hecho indispensable un mayor esfuerzo en la investigación científica sobre cada aspecto de la diabetes con el fin de desarrollar estrategias para el tratamiento o incluso cura de este padecimiento.

Se ha documentado ampliamente que durante ventanas críticas como lo son la lactancia y el destete, se adquieren las cualidades encaminadas a alcanzar la capacidad funcional del islote que permita poseer un control glucémico efectivo. Sin embargo, la exposición a ciertos factores ambientales durante dichos periodos puede tener efectos que repercutan positiva o negativamente en etapas posteriores de la vida.

En estudios previos se encontró que la administración de una dieta suplementada con biotina durante 8 semanas a partir del destete mostró tener efectos positivos en la regulación de genes claves en la secreción de insulina, una mayor secreción de esta hormona, y un aumento de la masa de las células- $\beta$ , características que sugieren que la biotina es capaz de producir islotes robustos morfológica y funcionalmente.

Dado que se ha documentado que la maduración correcta del páncreas favorece su función y lo hace menos susceptible ante daños o retos metabólicos, nosotros nos planteamos que si la suplementación con biotina se da en un periodo de ventana crítica, como lo es el post-destete, la biotina será capaz de proteger al islote pancreático ante daño pancreático en la etapa adulta, repercutiendo así en la prevención del desarrollo de diabetes. Nosotros nos planteamos que dicho desarrollo robustecido de los islotes por parte de la biotina se da en edades tempranas, es decir durante el periodo crítico posterior

al destete y que éste podría hacer frente al daño pancreático en etapas adultas, repercutiendo así en la prevención del desarrollo de diabetes.

Por tales razones, en este trabajo se propuso analizar los efectos de una dieta suplementada con biotina, administrada durante la ventana crítica correspondiente al periodo posterior al destete, sobre los islotes pancreáticos y la homeostasis de la glucosa ante la inducción de daño de las células-  $\beta$  en la etapa adulta.

## **E. HIPÓTESIS**

Las modificaciones producidas por la dieta suplementada con biotina en el periodo posterior al destete permitirán un mejor enfrentamiento ante procesos que dañan el islote en la edad adulta, reflejándose en una mejor homeostasis de la glucosa.

## **F. OBJETIVO GENERAL**

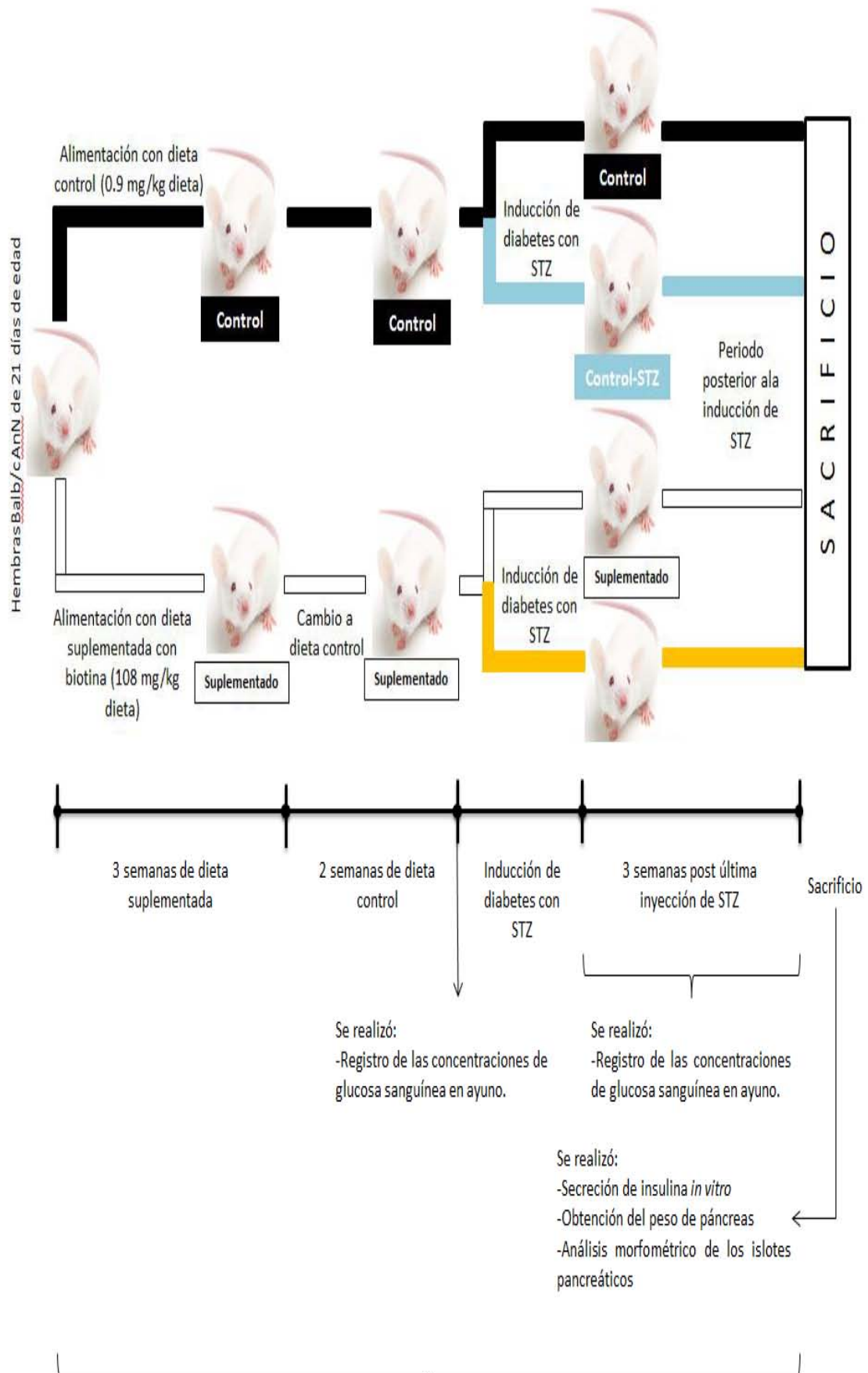
Investigar cuáles son los efectos de la administración de una dieta suplementada con biotina durante el periodo posterior al destete ante el daño de las células-  $\beta$  producido por la estreptozotocina en la etapa adulta.

## **G. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Determinar el efecto de la suplementación con biotina en el periodo posterior al destete sobre la funcionalidad del islote pancreático ante la inducción de diabetes, evaluando:
  - Secreción de insulina *in vitro*
  - Concentraciones de glucosa sanguínea en condiciones de ayuno y alimentación *ad libitum*.
  - Tolerancia a la glucosa

2. Determinar el efecto de la suplementación con biotina en el periodo posterior al destete sobre la morfología del islote pancreático ante la inducción de diabetes, evaluando:
  - Área total del islote pancreático
  - Proporción del área de células- $\beta$  y  $\alpha$  respecto al islote pancreático
  - Número y tamaño de células- $\beta$  y  $\alpha$  por islote pancreático

## H. DISEÑO EXPERIMENTAL



## **I. MATERIAL Y MÉTODOS**

### ***1.1. Modelo animal y administración de dietas***

Se usaron ratones hembra de la cepa Balb/cAnN Hsd bajo los lineamientos del Comité de Ética y Experimentación del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Los ratones se cruzaron y se registró la fecha de nacimiento. Las ratonas hembra obtenidas de las cruces se destetaron a los 21 días de edad y se dividieron en dos grupos: una parte de animales tuvo acceso libre a una dieta suplementada con 108 mg de biotina por cada kilogramo de dieta, constituyendo el grupo suplementado, mientras que el grupo control, durante todo el estudio, recibió una dieta con 0.9 mg de biotina por cada kilogramo de dieta.

Al cumplirse las tres semanas de suplementación, el grupo suplementado con la vitamina se sometió a un cambio de dieta, comenzando a ser alimentado con dieta control hasta el final del experimento. Para el momento del sacrificio, los animales fueron anestesiados con Sevoflurane (Sevoflourane, Abbott Laboratories, Mexico), y según fuera el caso, se extrajo el páncreas para la obtención de cortes histológicos o para el aislamiento de islotes pancreáticos. Finalmente, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical.

### ***1.2. Inducción de diabetes con estreptozotocina mediante el modelo de dosis múltiples***

A las ocho semanas de edad (equivalente a cinco posterior al destete) se indujo diabetes a una parte de animales tanto del grupo control como del suplementado mediante el protocolo de dosis múltiples, previamente reportado (Wu & Huan 2008). Brevemente, los animales fueron ayunados por un periodo de 4 horas previo a la inyección intraperitoneal de estreptozotocina (STZ por su nombre en inglés Streptozotocin; Sigma-Aldrich, EUA) en una concentración de 40 mg / kg de peso. Durante el ayuno se preparó todo el material requerido. Justo antes de la inyección de STZ, esta fue disuelta en un buffer de citrato de sodio (50 mM, pH 4.5). A los animales no destinados a ser diabéticos solo se les inyectó el buffer. A los animales inyectados con STZ se les administró agua

con glucosa al 10% únicamente en el periodo de inducción de diabetes, el cual consto de cinco inyecciones, una por día. Al final del periodo de inyecciones, se formaron cuatro grupos: el grupo control y suplementado (los cuales recibieron inyecciones de buffer de citrato de sodio) y el grupo control-STZ y suplementado-STZ.

### ***1.3. Obtención de la concentración de glucosa sanguínea***

El registro de la concentración de glucosa sanguínea se efectuó en condiciones fisiológicas diferentes: en ayuno y alimentación ad libitum. Los tiempos de ayuno fueron de 4, 6 o 16 horas según fuera el caso. Respecto a las condiciones de ad libitum, las mediciones fueron hechas en cualquier momento del día con acceso libre al alimento. Todos los registros fueron determinados a partir de muestras sanguíneas de la punta de la cola usando un glucómetro portátil (Freestyle optium, Abbott Diabetes Care, México).

### ***1.4. Prueba intraperitoneal de tolerancia a la glucosa***

Las pruebas de tolerancia a la glucosa se realizaron entre 8 y 10 A. M. Previamente, los animales fueron ayunados por un periodo de alrededor de 16 horas. La glucosa fue inyectada intraperitonealmente en una concentración de 2 gr / kg de peso y los registros de las concentraciones de glucosa sanguínea fueron hechos antes de la inyección y 15, 30, 60 y 120 minutos después a partir de muestras sanguíneas de la punta de la cola usando un glucómetro portátil (Freestyle optium, Abbott Diabetes Care, México).

### ***1.5. Inmunohistofluorescencias y análisis morfométrico***

Para el análisis morfométrico el páncreas fue removido, pesado y fijado con paraformaldehido (Sigma-Aldrich, EUA) al 4% por 24 horas a 4°C. Posteriormente se colocaron en buffer fosfato salino (PBS por sus siglas en inglés de Phosphate Buffered Saline). Los tejidos se deshidrataron en una serie de concentraciones crecientes de etanol comenzando de etanol 50%

hasta llegar a etanol absoluto y xilol para después ser incluidos en parafina y obtener cortes con un grosor de 5  $\mu$ m, los cuales se colocaron en portaobjetos previamente tratados con L-polilisina (Sigma-Aldrich, EUA) y almacenados a temperatura ambiente hasta su uso.

Los cortes histológicos fueron desparafinados en xilol y rehidratados en alcoholes descendentes comenzando con alcohol absoluto hasta llegar a alcohol 50% y PBS. Posterior a la rehidratación, se procedió a la recuperación de antígenos mediante la exposición de los tejidos a un buffer de ácido cítrico-EDTA (ácido cítrico 10 mM USB, EUA; EDTA 2 mM Invitrogen, EUA pH 6.2) a 90°C. Los tejidos fueron permeabilizados con Tritón X-100 0.2 % (Sigma-Aldrich, EUA) e incubados toda la noche a 4°C con anticuerpos anti-insulina montado en cobayo (1:150, GeneTex, EUA) y anti-glucagón montado en ratón (1:4500, Sigma-Aldrich, EUA). Se procedió a la incubación con los anticuerpos secundarios IgG conjugado con FITC anti-cobayo (1:200, Jackson Immuno Research, EUA) e IgG conjugado con Cy3 anti-ratón (1:600, Jackson Immuno Research, EUA) así como con el marcador de núcleos DAPI. Las laminillas se observaron con un microscopio Olympus IX71 (Olympus, Japón) acoplado a una lámpara de mercurio y la adquisición de las fotografías de los islotes pancreáticos fue con una cámara Evolution VF Cooled color (Media cybernetics, Canada).

El análisis morfométrico fue hecho utilizando el software Image J 1.48 (National Institutes of Health, EUA) para la cuantificación del área total de los islotes pancreáticos, la proporción y el número de células- $\beta$  y  $\alpha$  por islote.

### ***1.6. Aislamiento de islotes pancreáticos y secreción de insulina in vitro***

El método para el aislamiento de los islotes pancreáticos usado en este trabajo fue el reportado por (Zmuda et al. 2011), salvo por algunas modificaciones. Brevemente, se inyectó una solución de colagenasa tipo IV (Sigma-Aldrich, EUA) con medio Hanks (Life technologies, EUA), en una concentración de 1mg de colagenasa / ml, a través del conducto común biliar. Previamente, se cerró

la apertura pancreática al duodeno mediante el uso de una pinza Kelly recta con el fin de evitar que la solución de colagenasa llegara a los intestinos.

El siguiente paso fue extraer el páncreas con el cuidado necesario para evitar fugas de la solución de colagenasa y se continuó con una incubación a 37.4°C durante 10 minutos. Después de dicho tiempo, se agregó una solución de medio Hanks con albúmina (Sigma-Aldrich, EUA) para detener la reacción de la colagenasa y se realizaron los lavados correspondientes con medio Hanks. Los islotes pancreáticos fueron separados de los remanentes del tejido acinar utilizando un gradiente de Histopaque (Sigma-Aldrich, EUA) y medio Hanks, en el cual los islotes se concentran en la interfase después de una centrifugación a 3200 rpm por 24 minutos sin aceleración ni freno, hecho a una temperatura de 4°C, permitiendo su captura con una pipeta Pasteur. Nuevamente, se realizaron los lavados correspondientes con medio Hanks para quitar los residuos de Histopaque.

Al final, el medio Hanks con islotes fue puesta en una caja Petri para permitir la recolección de estos últimos con ayuda de un microscopio estereoscópico. Una vez recolectados los islotes pancreáticos fueron incubados por un periodo de alrededor de 18 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en medio DMEM (glucosa 11.1 mM, suero bovino fetal 10%, Life technologies, EUA) adicionado con un antibiótico-antimicótico 1% (Life technologies, EUA) y biotina 40 nM para el caso de los islotes aislados de ratones controles o biotina 590 nM para los islotes aislados de ratones suplementados.

Después del periodo de incubación, se substituyó el medio DMEM por medio Hank's con glucosa 3 mM (HEPES 11mM y NaHCO<sub>3</sub> ; antibiótico-antimicótico 1%; albumina sérica bovina 4% en sales de Spinner) durante 30 minutos a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Los islotes se incubaron después en las mismas condiciones de temperatura y CO<sub>2</sub> por una hora en solución de Hank's con glucosa 5.6 mM (concentración normoglucémica) o con glucosa 15.6 mM (concentración hiperglucémica). Finalmente, el medio se recuperó y se almaceno a -80°C hasta ser usado para la cuantificación de la concentración de insulina mediante el kit de ELISA para insulina comercial (ALPCO Diagnostics) siguiendo las instrucciones del proveedor.



### ***1.7. Análisis estadísticos***

Se trabajó con el programa PASW Statistics v. 18 (SPSS, Hong Kong). Los datos se representan con media  $\pm$  error estándar de la media. Se utilizaron las pruebas estadísticas *t* de Student y ANOVA de dos vías para el análisis entre dos o más grupos, respectivamente. <sup>+</sup> representa diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) respecto al grupo control en el tratamiento de dieta y <sup>#</sup> respecto al grupo control en el tratamiento de estreptozotocina.

## J. RESULTADOS

### *J.1. Efectos de la suplementación con biotina sobre el peso del animal*

Durante todo el experimento se monitoreó el peso de los animales dando como primer resultado que la suplementación con biotina no modifica el peso ni al final del periodo de suplementación ni como consecuencia de ésta en la etapa adulta, aún cuando esta dieta ha sido retirada (tabla 1 y fig. 13 líneas negra y blanca).

Por otra parte, como consecuencia del tratamiento con estreptozotocina, se afectó el peso de los animales, ya que como se puede observar en la fig.13 (líneas azul u oro) después de la primera inyección de este químico (día experimental 38) el grupo control-STZ y suplementado-STZ comenzaron a bajar de peso. El decremento observado es similar en los dos grupos. Al final del experimento (día experimental 65) el grupo suplementado-STZ presentó más peso que el grupo control-STZ (tabla 1 y fig.13).

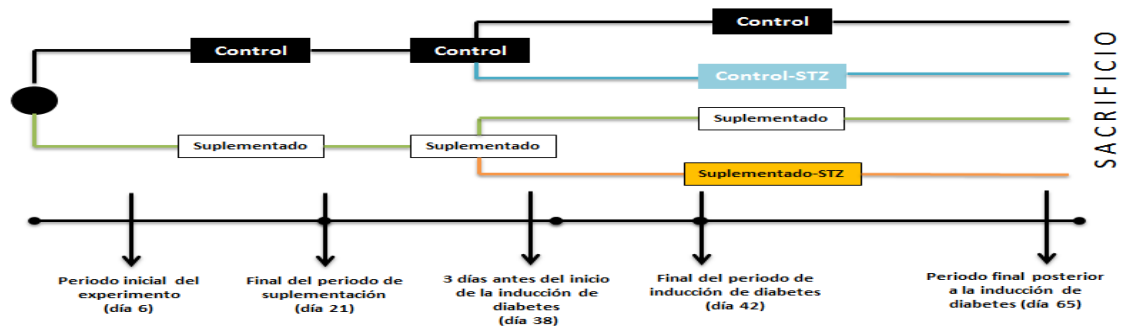


Tabla 1. Efecto de la suplementación con biotina sobre el peso del animal. Con el fin de resumir todos los datos obtenidos, únicamente se muestran aquellos correspondientes a momentos específicos del experimento. Los datos representan media  $\pm$  error estándar. <sup>†</sup> y <sup>#</sup> representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) respecto al grupo control correspondientes al tratamiento de dieta o al tratamiento de estreptozotocina, respectivamente. Grupo control ( $n = 13$ ), suplementado ( $n = 14$ ), control – STZ ( $n=19$ ) y suplementado – STZ ( $n=19$ ).

Grupo experimental					
Promedio peso de los animales (gr)					
Día 0, destete	$10.2 \pm 0.18$				
Final periodo suplementación (día 21)	Control	$16.86 \pm 0.20$			
	Suplementado	$16.87 \pm 0.18$			
Inicio del periodo de inducción de diabetes (día 38)	Control	Suplementado	Control – STZ	Suplem – STZ	
	$17.98 \pm 0.32$	$17.8 \pm 0.24$	$17.46 \pm 0.26$	$17.68 \pm 0.28$	
	Final del periodo de inducción de diabetes (día 42)	$18.28 \pm 0.28$	$18.16 \pm 0.21$	$15.2 \pm 0.36^{\#}$	$15.22 \pm 0.41^{\#}$
	Final periodo posterior a la inducción de diabetes (día 65)	$18.02 \pm 0.25$	$17.91 \pm 0.22$	$16.21 \pm 0.36^{\#}$	$17.01 \pm 0.35$

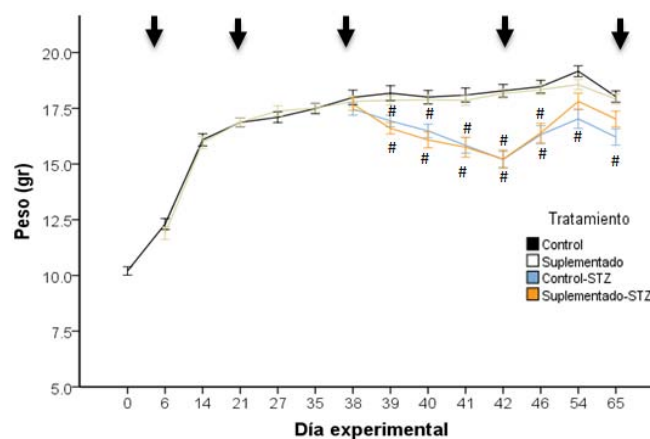


Fig. 13 Curva de crecimiento de los animales durante todo el experimento

## ***J.2. Consumo de alimento durante todo el experimento***

El consumo de alimento por ratón no mostró ser diferente durante todo el experimento entre los grupos estudiados (tabla 2). Sin embargo el análisis del consumo de dieta por gramos de peso corporal reveló que al sexto día de la ingesta de las dietas, el consumo promedio de dieta (consumo/ gramo de peso corporal) fue similar entre los grupos control y suplementado. Sin embargo, en el último día de este periodo (día 21) el grupo suplementado presentó un consumo menor en comparación al grupo control (tabla 3).

Durante el periodo que corresponde al tratamiento con estreptozotocina, los grupos tratados con este agente disminuyeron su consumo de alimento respecto a aquellos únicamente tratados con el vehículo de citrato de sodio. Finalmente, hacia el final del experimento (día 62) el grupo suplementado-STZ tuvo el consumo de alimento más bajo (tabla 3).

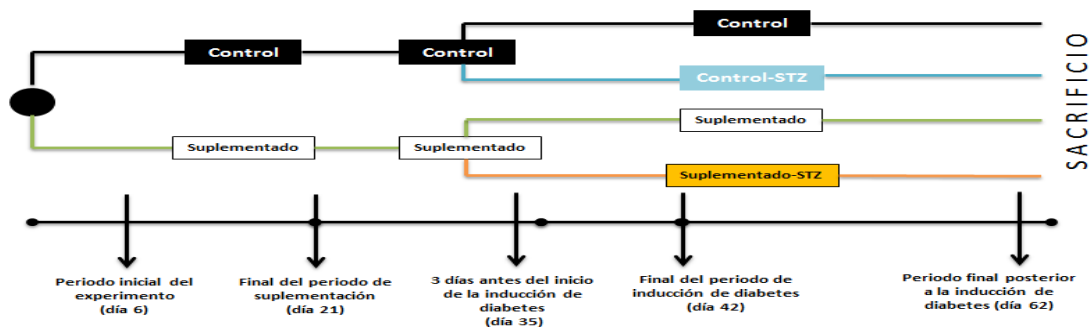


Tabla 2 Consumo de alimento (gr de dieta consumida/ ratón) durante tiempos específicos a través del experimento. Los datos representan media  $\pm$  error estándar.

Grupo experimental				
	Control (gr)	Suplementado (gr)		
Periodo inicial del experimento (día 6)	2.63 $\pm$ 0.20	2.58 $\pm$ 0.14		
Final periodo suplementación (día 21)	3.08 $\pm$ 0.27	2.73 $\pm$ 0.19		
3 días antes del Inicio del periodo de inducción de diabetes (día 35)	2.57 $\pm$ 0.11	2.76 $\pm$ 0.07		
	Control	Suplementado	Control – STZ	Suplem – STZ
Final del periodo de inducción de diabetes (día 42)	2.66 $\pm$ 0.08	2.58 $\pm$ 0.03	1.55 $\pm$ 0.34	1.32 $\pm$ 0.36
Periodo final posterior a la inducción de diabetes (día 62)	5.33 $\pm$ 0.87	5.06 $\pm$ 0.24	4.64 $\pm$ 0.25	3.74 $\pm$ 0.44

Tabla 3 Consumo de alimento (gr de dieta consumida/ gr de peso corporal) durante tiempos específicos a través del experimento. Los datos representan media  $\pm$  error estándar. <sup>+</sup> y <sup>#</sup> representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) respecto al grupo control correspondientes al tratamiento de dieta o al tratamiento de estreptozotocina, respectivamente.

Grupo experimental				
	Control (gr/gr)	Suplementado (gr/gr)		
Periodo inicial del experimento (día 6)	0.21 $\pm$ 0.009	0.217 $\pm$ 0.007		
Final periodo suplementación (día 21)	0.181 $\pm$ 0.007	0.163 $\pm$ 0.005 <sup>+</sup>		
3 días antes del Inicio del periodo de inducción de diabetes (día 35)	0.148 $\pm$ 0.003	0.158 $\pm$ 0.002 <sup>+</sup>		
	Control	Suplementado	Control – STZ	Suplem – STZ
Final del periodo de inducción de diabetes (día 42)	0.146 $\pm$ 0.003	0.142 $\pm$ 0.001	0.102 $\pm$ 0.009 <sup>#</sup>	0.084 $\pm$ 0.009 <sup>#</sup>
Periodo final posterior a la inducción de diabetes (día 62)	0.253 $\pm$ 0.015	0.262 $\pm$ 0.005	0.270 $\pm$ 0.005	0.207 $\pm$ 0.009 <sup>#,+</sup>

### J.3. Efectos de la suplementación con biotina sobre la tolerancia a la glucosa

La suplementación temprana de biotina seguida por la administración de la dieta control, no modifica la tolerancia a la glucosa en la etapa adulta, ya que no se observaron diferencias entre los grupos control y suplementado en los animales que no recibieron el tratamiento con STZ como puede ser observado en la tabla 4 y la fig.14 (panel A líneas negra y blanca; panel B barras negra y blanca). Tal y como se esperaba, debido al efecto de la estreptozotocina, tanto el grupo control-STZ como suplementado-STZ presentan intolerancia a la glucosa en comparación a sus respectivos grupos controles. Sin embargo, el análisis del área bajo la curva muestra que el grupo suplementado-STZ tiene una mejor tolerancia a la glucosa en comparación al grupo control-STZ (fig. 14 panel A líneas azul y oro; panel B barras azul y oro).

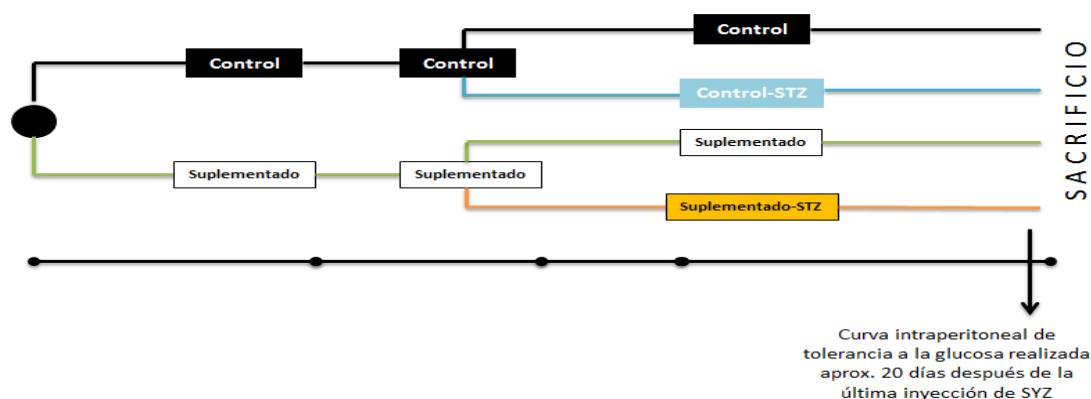


Tabla 4 Efecto de la suplementación con biotina sobre la tolerancia a la glucosa en una prueba intraperitoneal. Los datos representan media  $\pm$  error estándar. <sup>+</sup> representa diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) respecto al grupo control en el tratamiento de dieta y <sup>#</sup> respecto al grupo control en el tratamiento de estreptozotocina. Grupo control (n = 5), suplementado (n = 5), control – STZ (n=13) y suplementado – STZ (n=13).

Grupo experimental	Glucosa(mg/dl) 0 min	Glucosa(mg/dl) 15 min	Glucosa(mg/dl) 30 min	Glucosa(mg/dl) 60 min	Glucosa(mg/dl) 120 min
Control	60.6 $\pm$ 6.8	300.4 $\pm$ 20	200.8 $\pm$ 20.5	123 $\pm$ 6.2	69.4 $\pm$ 5.2
Suplementado	64.8 $\pm$ 7.2	306.4 $\pm$ 5.8	207.8 $\pm$ 4.9	130.6 $\pm$ 4	89.2 $\pm$ 4.9 <sup>+</sup>
Control – STZ	106.38 $\pm$ 11.1 <sup>#</sup>	323.46 $\pm$ 17	355.38 $\pm$ 14.3 <sup>#</sup>	309 $\pm$ 14.5 <sup>#</sup>	217.15 $\pm$ 19.4 <sup>#</sup>
Suplem – STZ	83.92 $\pm$ 9.1	268.38 $\pm$ 20.5	302.92 $\pm$ 22.4 <sup>#</sup>	261 $\pm$ 24.2 <sup>#</sup>	155.92 $\pm$ 23.8 <sup>#</sup>

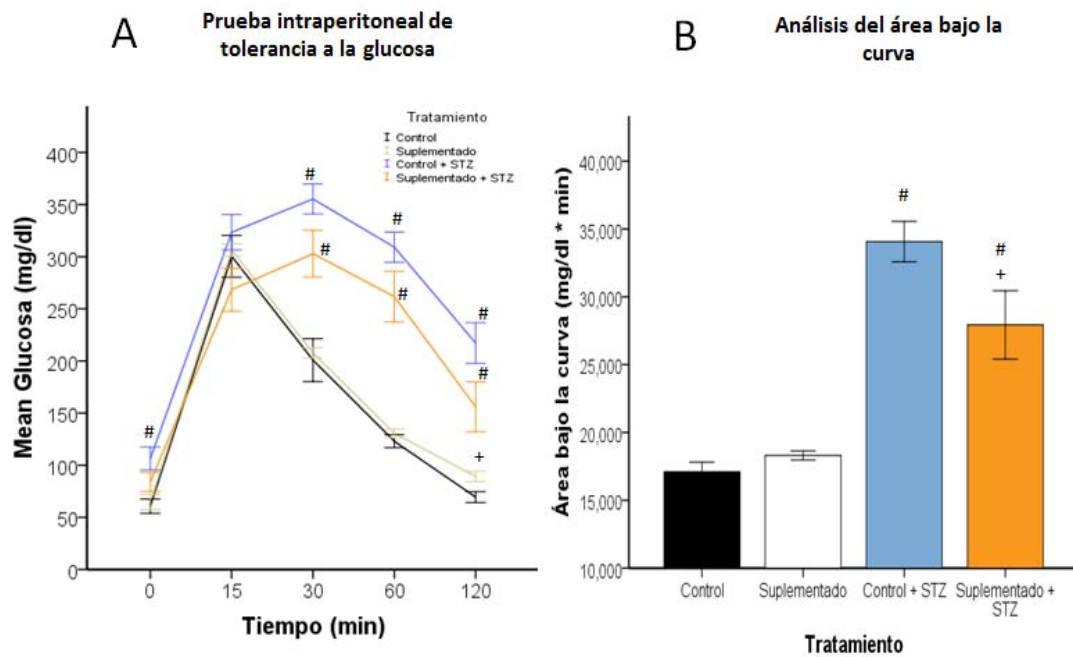


Fig. 14 A) Curva intraperitoneal de tolerancia a la glucosa realizada aprox. 20 días después de la última inyección de STZ y B) análisis del área bajo la curva. Los datos representan media  $\pm$  error estándar. + representa diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) respecto al grupo control en el tratamiento de dieta y # respecto al grupo control en el tratamiento de estreptozotocina. Grupo control (n = 5), suplementado (n = 5), control – STZ (n=13) y suplementado – STZ (n=13).

#### ***J.4. Efectos de la suplementación con biotina en las concentraciones sanguíneas de glucosa en condiciones de ayuno***

En la etapa adulta, justo antes de la primera inyección de STZ, no se observó diferencia en la concentración sanguínea de glucosa entre los grupos control y suplementado (fig.15 panel A). De acuerdo con las acciones de la estreptozotocina, 10 días después de la última inyección de STZ los grupos tratados con ésta presentaron una concentración de glucosa mayor en comparación a sus respectivos grupos controles (fig.15 panel B barras azul y oro).

Sin embargo, se observó una diferencia significativa entre estos dos grupos, siendo aquellos animales que recibieron la dieta suplementada los que presentaron una concentración menor de glucosa sanguínea en comparación al grupo que durante toda la experimentación recibió la dieta control (fig.15 panel B barras azul y oro). El análisis de la concentración sanguínea de glucosa se realizó también a los 19 días después de la última inyección en condiciones de ayuno de 16 horas, observándose que se mantiene una menor glucemia en el grupo suplementado-STZ en comparación al grupo control-STZ (fig. 15 panel C barras azul y oro). Resulta interesante remarcar que la concentración sanguínea del grupo suplementado-STZ no fue estadísticamente diferente en comparación al grupo suplementado sin tratamiento con la STZ (fig.15 panel C barras blanco y oro).



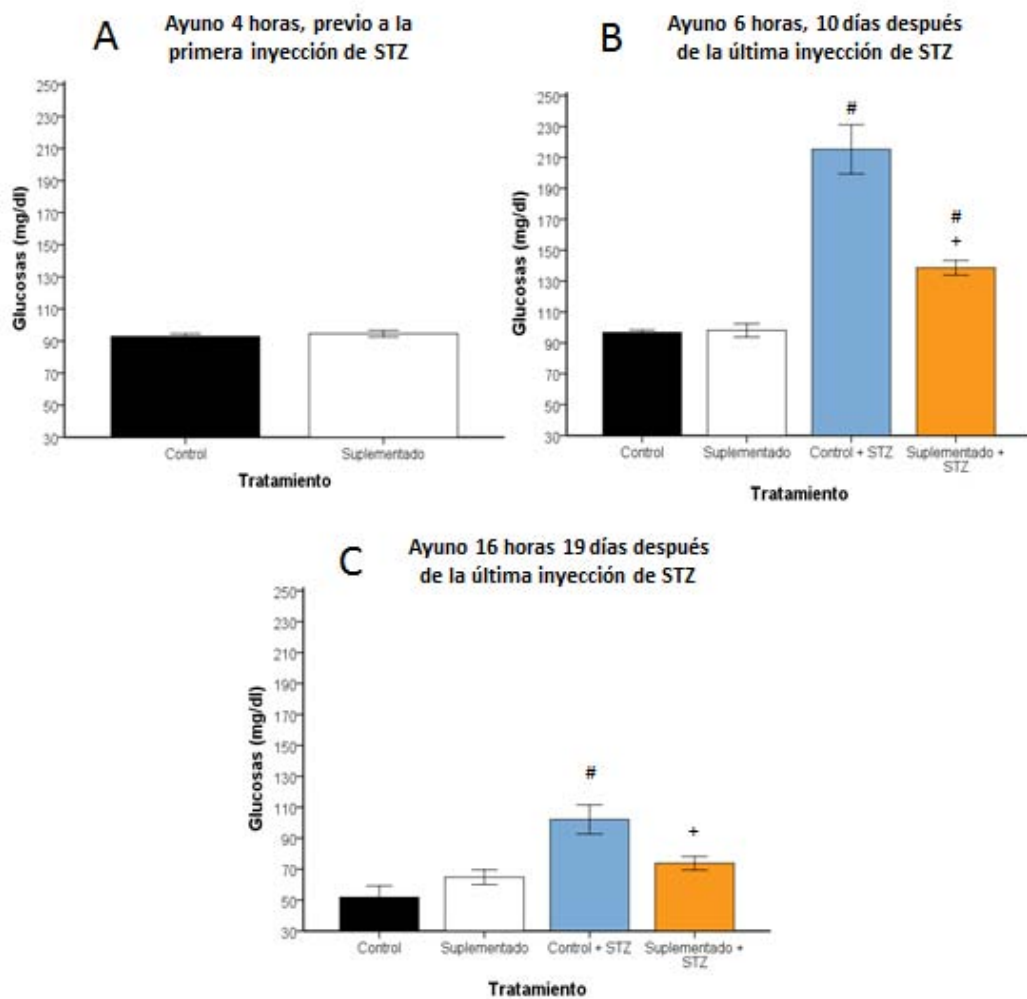
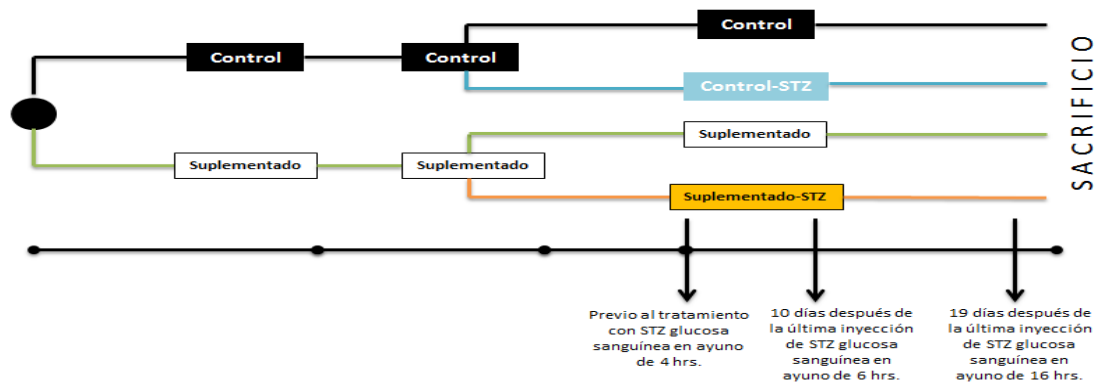


Fig. 15 Concentración de glucosa en condiciones de ayuno. Los datos representan media  $\pm$  error estándar. <sup>+</sup> representa diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) respecto al grupo control en el tratamiento de dieta y <sup>#</sup> respecto al grupo control en el tratamiento de estreptozotocina. A) Grupo control ( $n = 32$ ), suplementado ( $n = 33$ ). B) Grupo control ( $n = 13$ ), suplementado ( $n = 14$ ), control - STZ ( $n=19$ ) y suplementado - STZ ( $n=19$ ). C) Grupo control ( $n = 5$ ), suplementado ( $n=5$ ), control - STZ ( $n=16$ ) y suplementado - STZ ( $n=17$ ).

### J.5. Efectos de la suplementación con biotina en las concentraciones sanguíneas de glucosa en condiciones ad libitum

Después del periodo de inducción de diabetes no se encontraron diferencias en las concentraciones de glucosa sanguínea en condiciones ad libitum entre el grupo control y suplementado (fig. 16 barras negra y blanca). De manera esperada, si hubo diferencias entre los grupos tratados con STZ y sus respectivos grupos controles. Sin embargo, en el caso de los grupos tratados con este agente diabetogénico no se observó diferencia estadísticamente significativa entre ellos (figura 16, barras azul y oro).

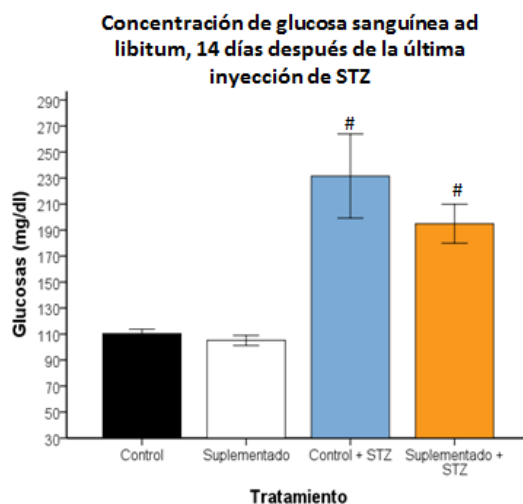
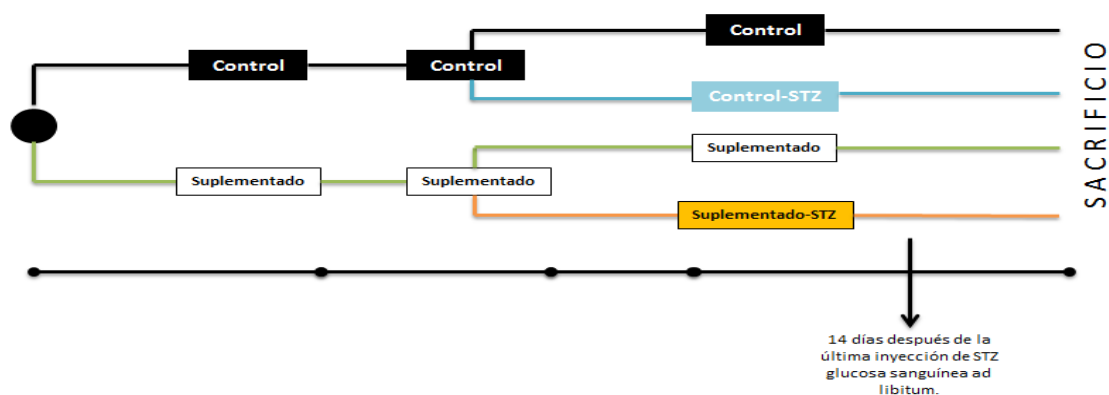


Fig. 16 Concentración de glucosa sanguínea en condiciones ad libitum 14 días posteriores a la última inyección de STZ. Los datos representan media  $\pm$  error estándar. <sup>+</sup> representa diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) respecto al grupo control en el tratamiento de dieta y <sup>#</sup> respecto al grupo control en el tratamiento de estreptozotocina. Gpo. control (n= 10), gpo. suplementado (n = 9), gpo. control-STZ (n= 15), gpo. suplementado-STZ (n= 15).

### ***J.6. Efecto de la suplementación con biotina sobre la secreción de insulina***

La prueba de secreción de insulina in vitro realizada con los islotes pancreáticos aislados después de 3 semanas posteriores a la última inyección de STZ mostró que los correspondientes al grupo suplementado secretaron más insulina en concentraciones normogluceémicas (5.6 mM) así como en hipergluceémicas (15.6 mM) en comparación a los islotes del grupo control (fig.17 barras negra y blanca). Los islotes de los grupos control-STZ y suplementado-STZ (fig. 17 barras azul y oro) claramente presentan una capacidad de secreción de insulina dañada en respuesta a glucosa cuando se compara con la de sus grupos controles (fig. 17 concentración de glucosa 15.6 mM). Sin embargo entre estos dos grupos tratados con STZ, los islotes del grupo suplementado-STZ muestran una tendencia a tener mayor capacidad de secreción en condiciones normogluceémicas (fig. 17 barras azul y oro concentración de glucosa 5.6 mM) respecto a los islotes del grupo control-STZ. En tanto que, en concentraciones hipergluceémicas la diferencia es estadísticamente significativa (fig. 17 barras azul y oro concentración de glucosa 15.6 mM).

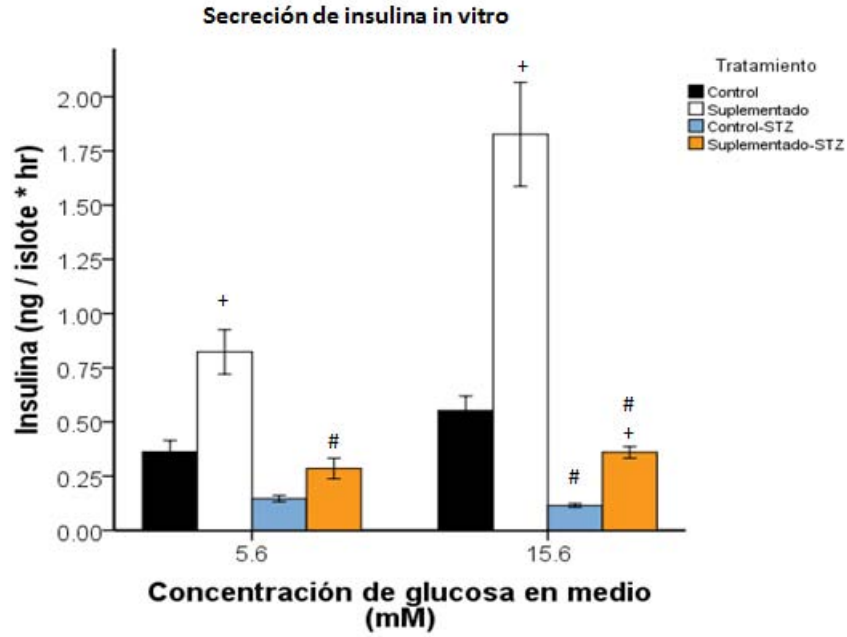


Fig. 17 Secreción de insulina in vitro de islotes aislados 3 semanas después de la última inyección de STZ. Los datos representan media  $\pm$  error estándar. <sup>+</sup> representa diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) respecto al grupo control en el tratamiento de dieta y <sup>#</sup> respecto al grupo control en el tratamiento de estreptozotocina.

### J.7. Efecto de la suplementación con biotina sobre el peso del páncreas

No se observaron cambios en el peso del páncreas entre los grupos suplementado y control (fig.18 barras negra y blanca). Como consecuencia de la diabetes inducida por la estreptozotocina, los páncreas de los grupos control-STZ y suplementado-STZ disminuyen su peso respecto a sus grupos controles (fig.18). Sin embargo, no se observaron diferencias entre estos grupos con diabetes (fig.18 barras azul y oro).

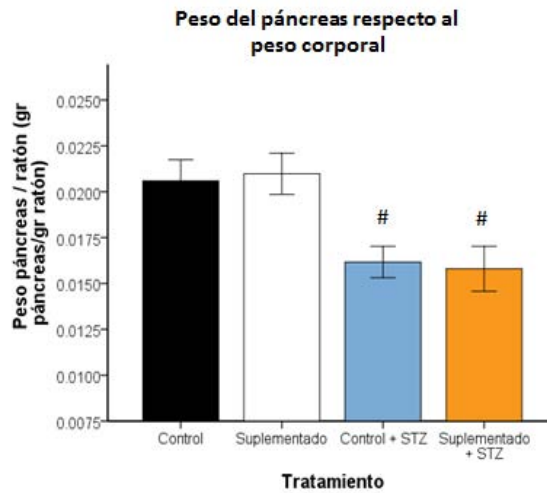


Fig. 18 Relación del peso de páncreas por el peso corporal al finalizar el periodo de 3 semanas de suplementación (izq) y al finalizar las 3 semanas posteriores a la última inyección de STZ (der). Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de 4 páncreas para cada grupo. #representa diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) respecto al grupo control en el tratamiento de estreptozotocina.

### ***J.8. Efecto de la suplementación con biotina sobre el área total del islote***

Al finalizar las tres semanas posteriores a la última inyección de STZ, no se observó ninguna diferencia significativa en el área promedio de los islotes entre los cuatro grupos estudiados (fig. 19 panel A). De igual manera, la distribución de áreas fue muy similar (fig.19 panel B).

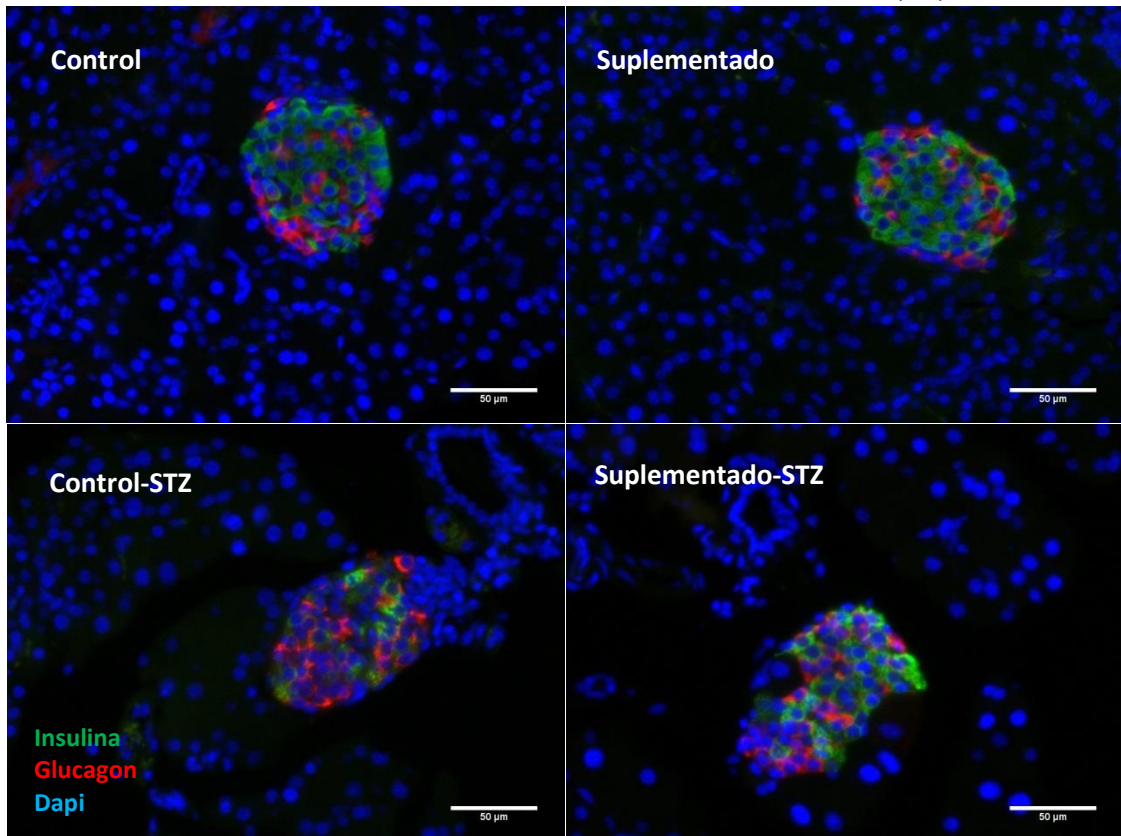
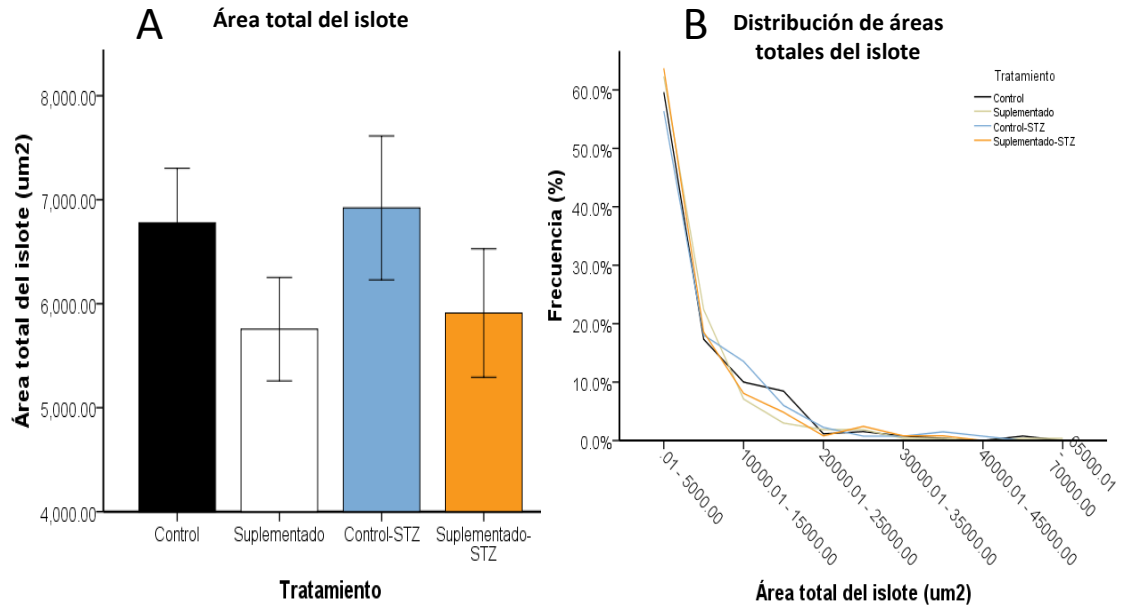


Fig. 19 A) Área total de los islotes al finalizar las 3 semanas posteriores a la última inyección de STZ. B) Representación de la distribución de tamaños de los islotes pancreáticos. Se muestra la media  $\pm$  error estándar de 260 islotes para el grupo control, 268 para el grupo suplementado, 133 para el grupo control-STZ y 124 para el grupo suplementado-STZ. En la parte inferior se muestran imágenes representativas del área promedio de los islotes para cada grupo.

### **J.9. Efecto de la suplementación con biotina sobre la proporción de células-β y α por islote**

A pesar de haber dejado de recibir una dieta suplementada con biotina por aproximadamente seis semanas, los islotes del grupo suplementado presentan una proporción de células-β y α estadísticamente diferente de aquella que se observa en el grupo control. En el grupo que recibió la vitamina se observó un porcentaje de células-β menor que en el grupo control (tabla 5 y fig. 20 panel A barras negra y blanca). Complementando esta modificación en la proporción de células-β, se observó que en el grupo suplementado hay mayor presencia de células-α (tabla 5 y fig. 20 panel B barras negra y blanca).

Por otra parte, las proporciones de estos dos tipos de células también se observan modificados en los grupos tratados con estreptozotocina (tabla 5 y fig. 20 panel A y B barras azul y oro) presentándose en el grupo suplementado-STZ una mayor proporción de células-β y por ende una menor de células-α, mientras que el grupo control-STZ presentó una relación de casi 50:50 para ambas células. Finalmente, cabe mencionar que las proporciones celulares entre los grupos tratados con STZ y aquellos que fueron tratados con buffer de citrato de sodio difieren significativamente.

**Tabla 5 Proporción de células-β y α por islote después de la inducción de diabetes con STZ. Se muestran la media ± error estándar de 260 islotes para el grupo control, 268 para el grupo suplementado, 133 para el grupo control-STZ y 124 para el grupo suplementado-STZ. <sup>+</sup> representa diferencia significativa (p < 0.05) respecto al grupo control en el tratamiento de dieta y <sup>#</sup> respecto al grupo control en el tratamiento de estreptozotocina**

Grupo experimental	Fracción del área total del islote (%)	
	Células-β	Células-α
<b>Control</b>	83.41 ± 0.86	16.58 ± 0.86
<b>Suplementado</b>	79.5 ± 0.98 <sup>+</sup>	20.49 ± 0.98 <sup>+</sup>
<b>Control – STZ</b>	52.85 ± 1.42 <sup>#</sup>	47.14 ± 1.42 <sup>#</sup>
<b>Suplem – STZ</b>	63.41 ± 1.55 <sup>+,#</sup>	36.58 ± 1.55 <sup>+,#</sup>

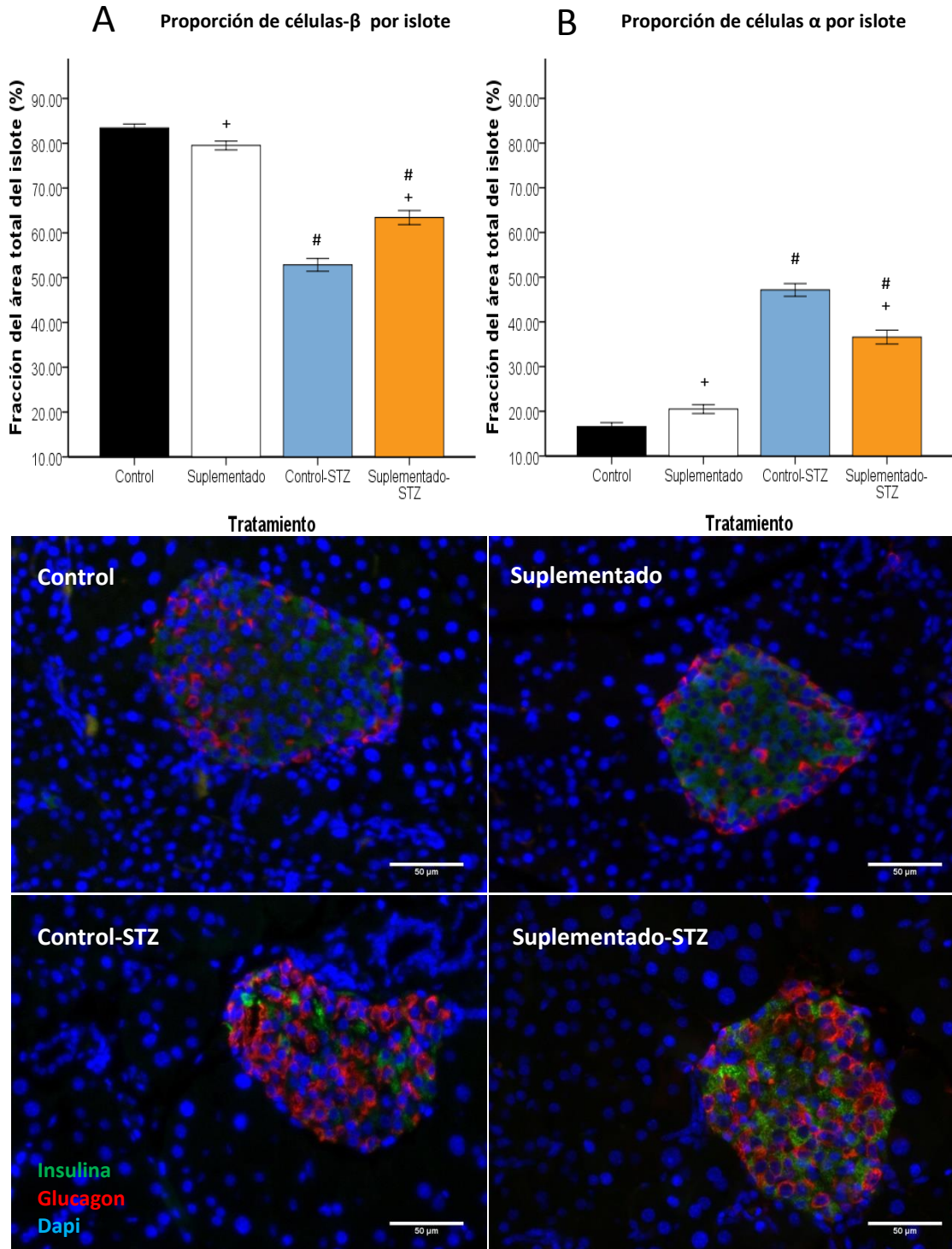


Fig. 20 A) Proporción de células- $\beta$  y B) de células- $\alpha$  por islote después de la inducción de diabetes con STZ. Se muestran la media  $\pm$  error estándar de 260 islotes para el grupo control, 268 para el grupo suplementado, 133 para el grupo control-STZ y 124 para el grupo suplementado-STZ. + representa diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) respecto al grupo control en el tratamiento de dieta y # respecto al grupo control en el tratamiento de estreptozotocina. En la parte inferior se muestran imágenes representativas de la proporción de dichas células por islotes para cada grupo.



### J.10. Efecto de la suplementación con biotina sobre el número de células- $\beta$ y $\alpha$ por islote

El conteo de células- $\beta$  por islote mostró que los dos grupos tratados con estreptozotocina independientemente de la dieta recibida en el periodo posterior al destete, presentaban islotes con un menor número de células- $\beta$  (fig. 21 panel A barras azul y oro) comparados con aquellos grupos que solo recibieron inyecciones con el vehículo, en los cuales tampoco se observó diferencia alguna por efecto de la dieta (fig. 21 panel A barras negra y blanca). Mientras tanto, el análisis del número de las células- $\alpha$  mostró que en islotes menores a las 10 000  $\mu\text{m}^2$  el tratamiento con estreptozotocina provoca un aumento en el número de esta población celular independientemente de la dieta administrada en etapas tempranas (fig. 21 panel B barras azul y oro). Este resultado solo fue estadísticamente significativo en el grupo control-STZ en islotes de entre 10 000 y 20 000  $\mu\text{m}^2$ . En islotes de mayor tamaño, no se observó diferencia estadística.

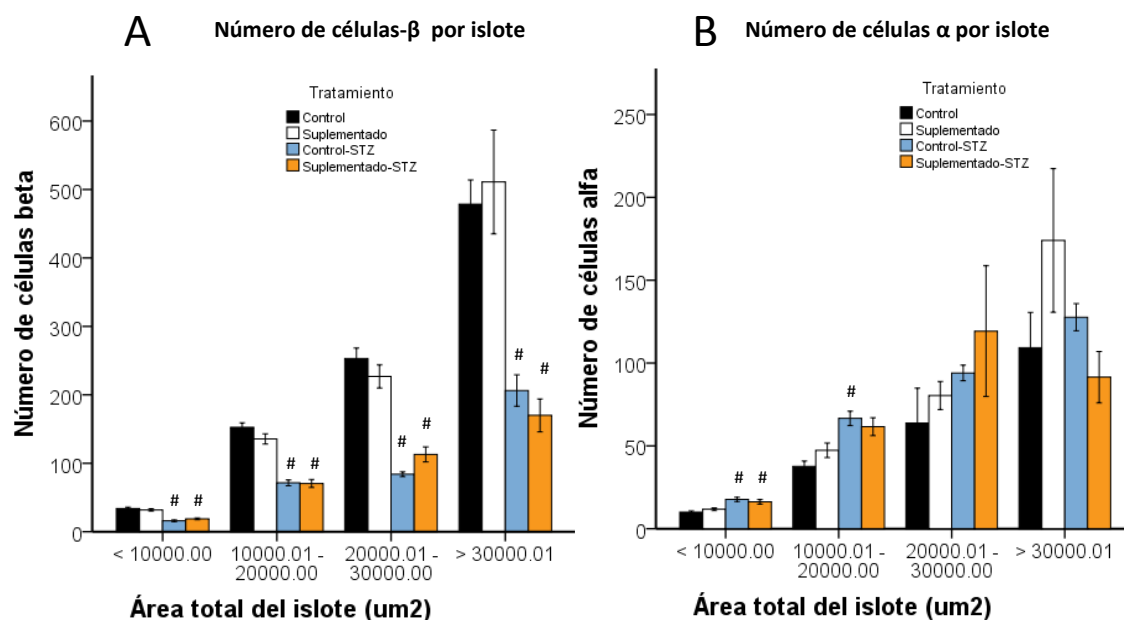


Fig. 21 A) Número de células- $\beta$  y B) de células- $\alpha$  por islote después de la inducción de diabetes por STZ. Se muestran la media  $\pm$  error estándar de 260 islotes para el grupo control, 268 para el grupo suplementado, 133 para el grupo control-STZ y 124 para el grupo suplementado-STZ. + representa diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) respecto al grupo control en el tratamiento de dieta y # respecto al grupo control en el tratamiento de estreptozotocina.

### J.11. Efecto de la suplementación con biotina sobre el tamaño de las células- $\beta$ y $\alpha$

Después de casi 6 semanas de haber cambiado la dieta suplementada, los islotes del grupo suplementado presentaron un área promedio de células- $\beta$  menor comparados con los islotes de los animales alimentados con dieta control (fig. 22 panel A barras negra y blanca). Por otro lado, las células- $\beta$  de los grupos tratados con estreptozotocina presentaron áreas mayores en comparación con sus respectivos grupos controles (fig. 22 panel A). El efecto de la dieta en estos grupos diabéticos no fue perceptible, ya que no hubo diferencia alguna entre el grupo suplementado y el control (fig. 22 panel A barras azul y oro). Con respecto al área de las células- $\alpha$ , el tamaño no fue diferente entre los grupos tratados con vehículo (fig. 22 panel B barras negra y blanca) sin embargo, en los grupos tratados con estreptozotocina se observó que el grupo suplementado-STZ tenía células- $\alpha$  con un tamaño promedio menor a aquellas del grupo control-STZ (fig. 22 panel B barras azul y oro). Finalmente, ambos grupos fueron estadísticamente mayores a sus correspondientes grupos controles tratados con citrato de sodio (fig. 22 panel B).

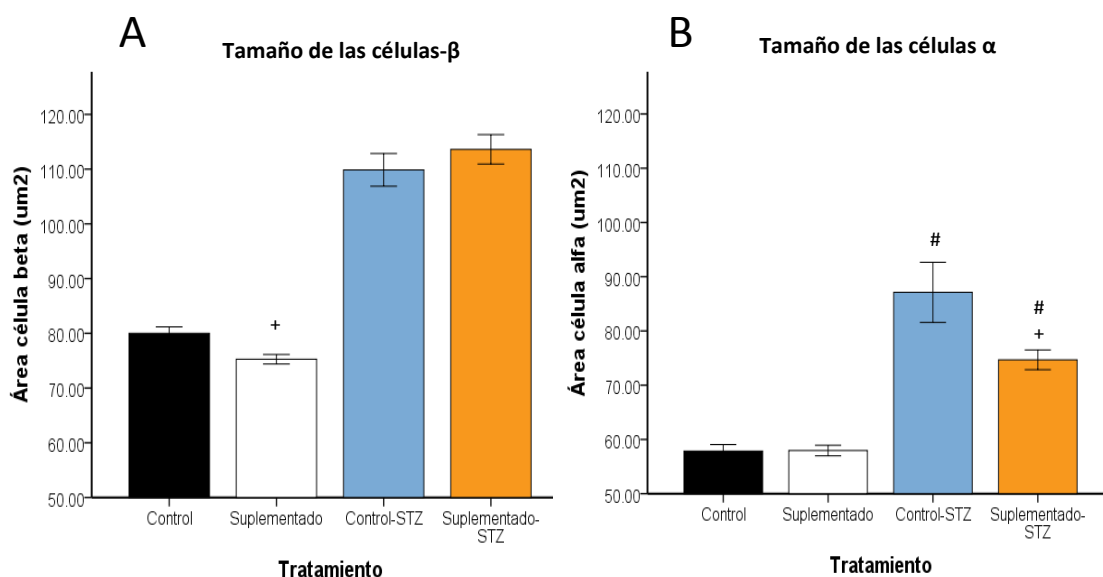


Fig. 22 A) Tamaño de las células- $\beta$  y B) tamaño de las células- $\alpha$  después de la inducción de diabetes por STZ. Se muestran la media  $\pm$  error estándar de 260 islotes para el grupo control, 268 para el grupo suplementado, 133 para el grupo control-STZ y 124 para el grupo suplementado-STZ. <sup>+</sup> representa diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) respecto al grupo control en el tratamiento de dieta y <sup>#</sup> respecto al grupo control en el tratamiento de estreptozotocina.

## K. DISCUSIÓN

La diabetes mellitus ha alcanzado proporciones alarmantes a nivel mundial y en México no ha sido la excepción, por lo cual es indispensable una mayor investigación científica sobre cada aspecto de esta enfermedad así como en el desarrollo de mejores estrategias para su prevención, tratamiento e idealmente para su cura. Diversos estudios han encontrado que el periodo posterior al destete es un periodo crítico, en donde se producen cambios para alcanzar la capacidad funcional del islote pancreático que le permitirán poseer un control glucémico en etapas posteriores de la vida. La biotina es una vitamina que actúa como grupo prostético de las carboxilasas, independientemente de esta función se ha encontrado que en concentraciones farmacológicas la biotina es capaz de modificar la expresión génica y posee efectos sobre procesos biológicos como el metabolismo de la glucosa y el desarrollo. En este trabajo se propuso analizar los efectos de una dieta suplementada con biotina, administrada durante el periodo posterior al destete, sobre los islotes pancreáticos y la homeostasis de la glucosa ante la inducción de daño de las células-  $\beta$  en la etapa adulta.

Los resultados mostraron que la administración de biotina durante 3 semanas posteriores al destete produjo una mejor tolerancia a la glucosa (fig.14) y niveles glucémicos más bajos en condiciones de ayuno (fig. 15 panel B y C) después de la destrucción de las células- $\beta$  por la estreptozotocina, lo que sugiere que la suplementación con biotina durante el periodo posterior al destete permite un mejor enfrentamiento ante la diabetes mellitus en la edad adulta. Estos resultados apoyan estudios previos en los que se encuentra que en diversos modelos animales (Reddi et al. 1988; Zhang et al. 1996; Zhang et al. 1997) así como en humanos (Koutsikos et al. 1996; Maebashi & Makino 1993; Coggeshall 1985) la biotina mejora la condición diabética. Pero a diferencia de estos reportes, este trabajo reporta por primera vez que la suplementación con biotina administrada en la ventana crítica del post destete es capaz de atenuar el desarrollo de diabetes.

En la diabetes mellitus se pueden observar situaciones de hiperfagia y, a pesar de ello, también se observa una pérdida de peso. En nuestro proyecto, el daño infligido a las células- $\beta$  con estreptozotocina en los ratones control-STZ produjo ambos efectos, en tanto que los ratones del grupo suplementado-STZ recuperaron la pérdida de peso inicial y tuvieron un consumo promedio de alimento menor en comparación a los animales del grupo control-STZ (fig. 13 líneas azul y oro y tabla 3 día experimental 62).

Se ha establecido que la secreción adecuada de insulina al estímulo de glucosa es esencial para la prevención del desarrollo de diabetes (Weir et al. 2001). En este trabajo, se observó que los islotes aislados del grupo suplementado-STZ presentaban una mayor secreción de insulina en concentraciones hiperglucémicas en comparación al grupo control-STZ (fig.17). Incluso, en concentraciones normoglucémicas, se observa una mayor secreción en el grupo suplementado-STZ (fig.17), aunque esto no fue estadísticamente significativo.

En otros trabajos se ha reportado que los niveles de insulina en sangre no se modifican en respuesta a la administración de biotina, a pesar de una mejora de la condición fisiológica ante la diabetes mellitus (Reddi et al. 1988; Zhang et al. 1996; Zhang et al. 1997). Sin embargo, estos autores no estudiaron la actividad secretora de la insulina en los islotes pancreáticos aislados como lo hicimos en este trabajo. En apoyo a los resultados de este trabajo, se ha reportado que los islotes cultivados con biotina y en concentraciones glucotóxicas presentan un aumento en la secreción de insulina (Yoshikawa et al. 2002).

El análisis morfométrico realizado mostró que la proporción de células- $\beta$  por islote es mayor en el grupo suplementado-STZ en comparación con la del grupo control-STZ (tabla 5 y fig. 20 panel A). El modelo de hiperglucemia inducida por dosis múltiples de estreptozotocina realizado en etapas adultas no se caracteriza por ser un modelo de regeneración de las células- $\beta$  (Kataoka et al. 2013; Risbud & Bhonde 2002; Bouwens & Rooman 2005b; Thyssen et al. 2006) por lo que la presencia de un mayor porcentaje de este tipo de células

por islote en el grupo suplementado-STZ posiblemente se debió a un efecto de la biotina en la resistencia y supervivencia de las células- $\beta$  hacia la estreptozotocina. Es interesante señalar que en estudios realizados en el hígado de ratones que recibieron durante 8 semanas una dieta suplementada con biotina se reportó un aumento en la transcripción de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Larrieta et al. 2010), una enzima que tiene un importante papel en la protección contra las especies reactivas de oxígeno (Salati & Amir-Ahmady 2001), uno de los mecanismos de daño propuesto para la estreptozotocina. Se requerirán más estudios para determinar si éste u otro mecanismo provocó un mayor porcentaje de células- $\beta$  en el grupo suplementado-STZ comparado con el control-STZ.

Desde la década de 1970 se propuso la hipótesis bi-hormonal, en la cual se explica que la diabetes mellitus no solo es el resultado de una deficiencia y/o resistencia a la insulina sino también un exceso relativo o absoluto de glucagon, el cual puede provocar una mayor tasa de liberación de glucosa por el hígado, favoreciendo la hiperglucemia (Unger & Orci 1975). En apoyo a esta hipótesis, estudios han reportado un aumento en la masa de células- $\alpha$  en modelos animales de diabetes experimental (Li, F. Karlsson, et al. 2000; Zhang et al. 2012; Plesner et al. 2014). En el análisis morfométrico, realizado en este trabajo, sobre la población de células- $\alpha$  se observó que el grupo suplementado-STZ tenía la proporción por islote (fig. 20 panel B) y el tamaño celular (fig.22 panel B) disminuidos en comparación a aquellos del grupo control-STZ, lo cual sugiere que la suplementación con biotina en edades tempranas no solo tiene un efecto sobre las células- $\beta$  sino también sobre las células- $\alpha$ , disminuyendo el aumento de estas últimas en el daño de las células- $\beta$ .

Una mayor secreción de insulina (principalmente en concentraciones hiperglucémicas), una mayor proporción de células- $\beta$  y una menor de células- $\alpha$  por islote así como un tamaño celular de estas últimas disminuido sugieren ser parte del mecanismo por el cual la suplementación con biotina durante el periodo posterior al destete permitió un mejor enfrentamiento ante la inducción de daño en la edad adulta. En otros estudios, se ha reportado una mejora en la

condición fisiológica ante la diabetes por parte de la biotina por efectos sobre el hígado (Dakshinamurti & Li 1994; Sugita et al. 2008) por lo cual será interesante analizar la participación de este órgano en el efecto de la biotina observado en este trabajo así como también lo sería la evaluación en la secreción de glucagon, puesto que esta ha sido reportada estar incrementada en condiciones de diabetes mellitus (Gromada et al. 2007; Quesada et al. 2008b).

Los datos obtenidos en los grupos experimentales que no fueron sometidos al protocolo de inyecciones de estreptozotocina, sino solo del vehículo, nos ayudan a dilucidar los efectos de la suplementación con biotina durante el periodo posterior al destete que pudieron haber influido en la mejora de la condición fisiológica ante la diabetes mellitus. La información más relevante se obtuvo en la secreción de insulina, ya que se observó que los islotes del grupo suplementado presentaban una mayor secreción de dicha hormona en concentraciones normo e hiperglucémicas (fig.17), efecto que también se observó a las 8 semanas de suplementación con biotina en el reporte de Lazo de la Vega-Monroy et al. (2013). Sin embargo, en nuestro estudio la administración de la dieta suplementada fue únicamente durante las 3 semanas posteriores al destete, lo que destaca la importancia de la suplementación con biotina durante un periodo de ventana crítica sobre la función de la célula- $\beta$  en la edad adulta.

Al igual que lo observado en los estudios de Lazo de la Vega-Monroy et al. (2013) y Larrieta et al. (2010) no hubo diferencia en el peso (fig. 13) y el consumo de alimento (tabla 2 y 3) entre el grupo control y el suplementado. Con respecto a la homeostasis de la glucosa, la administración de la biotina en la dieta durante las 3 semanas posteriores al destete no modificó la tolerancia a la glucosa (fig. 14) ni las concentraciones de glucosa en condiciones de ayuno (fig. 15) y *ad libitum* (fig. 16) en la etapa adulta.

Por otra parte, el análisis morfométrico mostró que la proporción por islote de células- $\beta$  es menor y la de células- $\alpha$  es mayor en el grupo suplementado respecto al grupo control (tabla 5 y fig. 20). Además, el grupo suplementado

también se caracterizó por tener un tamaño de célula- $\beta$  más pequeño (fig. 22 panel A).

El aumento en la secreción de insulina y una mayor proporción de células- $\alpha$  en el grupo suplementado, observados en este trabajo, podrían ser efectos relacionados entre sí. Estudios previos han mostrado la importancia del glucagón en la secreción de insulina inducida por glucosa (Siegel & Creutzfeldt 1987; Pipeleers et al. 1982; Göke 2008; Gelling et al. 2009; Wang et al. 2011) por lo que un aumento en la proporción de células- $\alpha$  podría traducirse como un aumento en la secreción de glucagón, estimulando el aumento en la liberación de insulina por parte de las células- $\beta$ . Futuros estudios tendrán que abordar si la suplementación con biotina afecta o no la secreción de glucagón.

Aunado a esto, se ha reportado que en modelos de daño pancreático las células- $\alpha$  pueden funcionar como progenitores y protectores de las células- $\beta$  (Habener & Stanojevic 2013). La hipótesis  $\beta > \alpha > \beta$  señala que las células- $\beta$  dañadas envían señales paracrinas a las células- $\alpha$ , las cuales a su vez responden estimulando la regeneración de las células- $\beta$  o incluso transdiferenciándose hacia este tipo celular, dependiendo de la intensidad del daño (Habener & Stanojevic 2012). Se propone que en estas condiciones fisiopatológicas, las células- $\alpha$  son capaces de sintetizar y secretar GLP-1, el cual tiene como efectos aumentar la secreción de insulina así como la masa y supervivencia de las células- $\beta$  (Baggio & Drucker 2007; Doyle & Egan 2007; Buteau 2011). Entonces, será un tema a considerar en estudios futuros si la suplementación con biotina en el periodo posterior al destete estimula la síntesis y secreción de GLP-1 en las células- $\alpha$  y por ende aumenta la secreción de insulina. Este posible efecto de la suplementación con biotina sobre la síntesis y secreción de GLP-1 por parte de las células- $\alpha$  puede ser clave para explicar por qué el grupo sometido a la inducción de diabetes (suplementado-STZ) presenta una mejor homeostasis de la glucosa en comparación al grupo no suplementado (control-STZ).

Finalmente, resulta interesante que en el área promedio de los islotes no se hayan observado diferencias entre los grupos tratados con citrato de sodio y con estreptozotocina (fig. 19 panel A), ya que estudios previos han reportado

una disminución de esta en los grupos diabéticos (Vagn Bonnevie-Nielsen et al. 1981; Li, F. Karlsson, et al. 2000; O'Brien et al. 1996). En este trabajo el criterio usado para considerar un islote pancreático consistió en agrupaciones mayores a 4 células endocrinas, criterio previamente reportado (Jo et al. 2011). Mientras que en los estudios de Bonnevie-Nielsen et al. (1981), Li et al. (2000) y O'Brien et al. (1996) el criterio usado para considerar los islotes no fue mencionado, por lo cual a falta de esta información no es posible discernir la razón de la discrepancia. Por otra parte, el tamaño de las células- $\alpha$  y  $\beta$  se vio incrementado en los grupos tratados con estreptozotocina (fig. 22), sin embargo la mayoría de los estudios realizados con este agente diabetogénico ha reportado una hipoplasia de células- $\beta$  y una hiperplasia de células- $\alpha$ , careciendo los reportes sobre los tamaños celulares de estas células.

En resumen, de acuerdo con nuestra hipótesis, en este trabajo encontramos que la alimentación con una dieta suplementada con biotina durante las primeras tres semanas después del destete fue capaz de inducir cambios que permiten un mejor enfrentamiento ante la inducción de daño de las células-  $\beta$ , lo cual se reflejó en una mejor homeostasis de la glucosa. Este efecto se encuentra principalmente asociado con un aumento en la secreción de insulina así como una proporción modificada de células- $\beta$  y  $\alpha$  por islote.



## L. CONCLUSIONES

La suplementación con biotina durante el periodo posterior al destete permitió un mejor enfrentamiento ante la inducción de daño de las células-  $\beta$  en la edad adulta, lo cual se reflejó en una mejor homeostasis de la glucosa. Dicho efecto puede estar asociado con una mejor conservación de la secreción de insulina y de la proporción de células- $\beta$  por islote así como también por una baja proporción de células- $\alpha$ .

La suplementación con biotina durante las 3 semanas posteriores al destete aumentó la secreción insulina en concentraciones normo e hiperglucémicas y la proporción de células- $\alpha$  por islote, en tanto que disminuyó la de células- $\beta$ . Sin embargo, estos efectos no afectaron la homeostasis de la glucosa en condiciones no patológicas.

En resumen, la suplementación con biotina durante las tres semanas posteriores al destete tiene efectos sobre la homeostasis de la glucosa ante el daño de las células-  $\beta$  en la edad adulta. Estos efectos apoyan el uso de la biotina para el desarrollo de estrategias enfocadas a la prevención de la diabetes mellitus.

## M. PERSPECTIVAS

Se necesitarán realizar más estudios enfocados en conocer los mecanismos por los cuales la suplementación con biotina administrada durante las 3 semanas posteriores al destete permitió un mejor enfrentamiento ante el daño de las células- $\beta$  en la edad adulta, es decir, si fue a través de un efecto en la resistencia y supervivencia de las células- $\beta$  ante la estreptozotocina a través del aumento de enzimas claves detoxificantes como la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa o quizá por la activación de la secreción de GLP-1 por parte de las células- $\alpha$ .

Además, será conveniente analizar el efecto sobre otros órganos que pudieran tener una participación en tal efecto de la suplementación con biotina. El hígado sería un gran candidato, ya que estudios previos acerca del efecto de la biotina ante la diabetes mellitus han relacionado cambios en la función del hígado con la mejora de la condición fisiológica observada.

Finalmente, se tendrá que analizar si los efectos de la suplementación con biotina durante las 3 semanas posteriores al destete aún pueden ser perceptibles en edades mayores que las analizadas en este trabajo. Incluso si dichos efectos pueden ser vistos en tiempos de suplementación menores a las 3 semanas.

## N. REFERENCIAS

- Aguayo-Mazzucato, C. et al., 2006. Restructuring of pancreatic islets and insulin secretion in a postnatal critical window. *PloS one*, 1(1), p.e35. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1762382&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 30, 2014].
- Akirav, E., Kushner, J.A. & Herold, K.C., 2008.  $\beta$ -Cell Mass and Type 1 Diabetes: Going, Going, Gone? . *Diabetes* , 57 (11 ), pp.2883–2888. Available at: <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/57/11/2883.abstract>.
- American Diabetes Association., 2009. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*, 32 Suppl 1, pp.S62–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2613584&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 19, 2014].
- Arredondo, A. & Reyes, G., 2013. Health disparities from economic burden of diabetes in middle-income countries: evidence from México. *PloS one*, 8(7), p.e68443. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3709919&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 25, 2014].
- Baggio, L.L. & Drucker, D.J., 2007. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*, 132(6), pp.2131–57. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17498508> [Accessed July 15, 2014].
- Bolzán, A. & Bianchi, M., 2002. Genotoxicity of streptozotocin. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 512, pp.121–134. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383574202000443> [Accessed November 24, 2014].
- Bonner-Weir, S. et al., 2010. B-cell growth and regeneration: replication is only part of the story. *Diabetes*, 59(10), pp.2340–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3279552&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 20, 2013].
- Bonner- Weir, S., Toschi, E. & Inada, A., 2004. The pancreatic ductal epithelium serves as a potential pool of progenitor cells. *Pediatric ...*, (9), pp.16–22. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-543X.2004.00075.x/full> [Accessed November 26, 2014].
- Bonnevie-Nielsen, V., Steffes, M. & Lernmark, Å., 1981. A major loss in islet mass and B-cell function precedes hyperglycemia in mice given multiple low doses of streptozotocin. *Diabetes*, 30(May). Available at: <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/30/5/424.short> [Accessed November 25, 2014].

- Bonnevie-Nielsen, V., Steffes, M.W. & Lernmark, Å., 1981. A Major Loss in Islet Mass and B-cell Function Precedes Hyperglycemia in Mice Given Multiple Low Doses of Streptozotocin. *Diabetes* , 30 (5 ), pp.424–429. Available at: <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/30/5/424.abstract>.
- Bouwens, L. & Rooman, I., 2005a. Regulation of pancreatic  $\beta$ -cell mass. *Physiological reviews*, (68), pp.1255–1270. Available at: <http://physrev.physiology.org/content/85/4/1255.short> [Accessed August 24, 2014].
- Bouwens, L. & Rooman, I., 2005b. Regulation of pancreatic  $\beta$ -cell mass. *Physiological reviews*, (68), pp.1255–1270. Available at: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Regulation+of+Pancreatic+B-Cell+Mass#0> [Accessed May 10, 2014].
- Bratanova-Tochkova, T.K. et al., 2002. Triggering and augmentation mechanisms, granule pools, and biphasic insulin secretion. *Diabetes*, 51 Suppl 1, pp.S83–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11815463>.
- Brissova, M. et al., 2005. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, 53(9), pp.1087–97. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15923354> [Accessed August 19, 2014].
- Buteau, J., 2011. GLP-1 signaling and the regulation of pancreatic  $\beta$ -cells mass/function. *Avances en Diabetología*, 27(1), pp.3–8. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1134323011700023> [Accessed December 3, 2014].
- Cabrera, O. et al., 2006. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(7), pp.2334–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1413730&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Cardozo, A.K. et al., 2001. A Comprehensive Analysis of Cytokine-induced and Nuclear Factor- $\kappa$ B-dependent Genes in Primary Rat Pancreatic  $\beta$ -Cells. *Journal of Biological Chemistry* , 276 (52 ), pp.48879–48886. Available at: <http://www.jbc.org/content/276/52/48879.abstract>.
- Chauhan, J. & Dakshinamurti, K., 1991. Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats. *The Journal of biological chemistry*, 266(16), pp.10035–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2037560>.
- Cnop, M. et al., 2005. Mechanisms of Pancreatic  $\beta$ -Cell Death in Type 1 and Type 2 Diabetes: Many Differences, Few Similarities . *Diabetes* , 54 (suppl

- 2 ), pp.S97–S107. Available at:  
[http://diabetes.diabetesjournals.org/content/54/suppl\\_2/S97.abstract](http://diabetes.diabetesjournals.org/content/54/suppl_2/S97.abstract).
- Coggeshall, J., 1985. Biotin Status and Plasma Glucose in Diabeticsa. *Annals of the New York Academy of Sciences*, (Iddm). Available at:  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749-6632.1985.tb18454.x/abstract> [Accessed October 28, 2014].
- Collombat, P. et al., 2003. Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development. *Genes & Development*, 17 (20 ), pp.2591–2603. Available at: <http://genesdev.cshlp.org/content/17/20/2591.abstract>.
- Collombat, P. et al., 2010a. Pancreatic  $\beta$ -cells: from generation to regeneration. *Seminars in cell & developmental biology*, 21(8), pp.838–44. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2967617&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 23, 2014].
- Collombat, P. et al., 2010b. Pancreatic  $\beta$ -cells: from generation to regeneration. *Seminars in cell & developmental biology*, 21(8), pp.838–44. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2967617&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 26, 2014].
- Dakshinamurti, K. & Cheah-Tan, C., 1968. Biotin-mediated synthesis of hepatic glucokinase in the rat. *Archives of biochemistry and biophysics*, 21, pp.17–21. Available at:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003986168901951>  
[Accessed October 28, 2014].
- Dakshinamurti, K. & Li, W., 1994. Transcriptional regulation of liver phosphoenolpyruvate carboxykinase by biotin in diabetic rats. *Molecular and cellular biochemistry*, pp.127–132. Available at:  
<http://link.springer.com/article/10.1007/BF00926921> [Accessed October 28, 2014].
- Dhawan, S., Georgia, S. & Bhushan, A., 2007. Formation and regeneration of the endocrine pancreas. *Current opinion in cell biology*, 19(6), pp.634–45. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2695413&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 18, 2014].
- Dor, Y. et al., 2004. Adult pancreatic  $\beta$ -cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature*, 429(6987), pp.41–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15129273>.
- Doyle, M.E. & Egan, J.M., 2007. Mechanisms of action of glucagon-like peptide 1 in the pancreas. *Pharmacology & therapeutics*, 113(3), pp.546–93. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1934514&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 12, 2014].

- Eizirik, D.L., Colli, M.L. & Ortis, F., 2009. The role of inflammation in insulinitis and  $\beta$ -cell loss in type 1 diabetes. *Nat Rev Endocrinol*, 5(4), pp.219–226. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2009.21>.
- Fernandez-Mejia, C. & Lazo-de-la-Vega-Monroy, M.-L., 2011. Biological Effects of Pharmacological Concentrations of Biotin. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 16(1), pp.40–48. Available at: <http://chp.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/15332101110392947> [Accessed September 28, 2014].
- Finegood, D.T., Scaglia, L. & Bonner-Weir, S., 1995. Dynamics of  $\beta$ -cell Mass in the Growing Rat Pancreas: Estimation With a Simple Mathematical Model. *Diabetes*, 44 (3), pp.249–256. Available at: <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/44/3/249.abstract>.
- Fu, Z., Gilbert, E.R. & Liu, D., 2013. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic B-cell dysfunction in diabetes. *Current diabetes reviews*, 9(1), pp.25–53. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3934755&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Garofano, A., Czernichow, P. & Breant, B., 1999. Effect of ageing on  $\beta$ -cell mass and function in rats malnourished during the perinatal period. *Diabetologia*. Available at: <http://link.springer.com/article/10.1007/s001250051219> [Accessed October 28, 2014].
- Garofano, A., Czernichow, P. & Breant, B., 1997. In utero undernutrition impairs rat  $\beta$ -cell development. *Diabetologia*, pp.1231–1234. Available at: <http://link.springer.com/article/10.1007/s001250050812> [Accessed October 28, 2014].
- Gelling, R.W. et al., 2009. Pancreatic  $\beta$ -cell overexpression of the glucagon receptor gene results in enhanced  $\beta$ -cell function and mass. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 297(3), pp.E695–E707. Available at: <http://ajpendo.physiology.org/content/297/3/E695.abstract>.
- Georgia, S. & Bhushan, A., 2004.  $\beta$  cell replication is the primary mechanism for maintaining postnatal  $\beta$  cell mass. *Journal of Clinical Investigation*, 114(7), pp.963–968. Available at: <http://www.jci.org/cgi/content/abstract/114/7/963> [Accessed May 29, 2014].
- Göke, B., 2008. Islet cell function: alpha and  $\beta$  cells--partners towards normoglycaemia. *International journal of clinical practice. Supplement*, 62(159), pp.2–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18269435> [Accessed December 2, 2014].
- Gouzi, M. et al., 2011. Neurogenin3 initiates stepwise delamination of differentiating endocrine cells during pancreas development.

- Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 240(3), pp.589–604. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21287656> [Accessed October 27, 2014].
- Gromada, J., Franklin, I. & Wollheim, C.B., 2007. Alpha-cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains. *Endocrine reviews*, 28(1), pp.84–116. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17261637> [Accessed September 5, 2014].
- Gunasekaran, U. et al., 2012. Differential regulation of embryonic and adult  $\beta$  cell replication. *Cell cycle*, 11(13), pp.2431–2442. Available at: <http://www.landesbioscience.com/journals/cc/2012CC4021.pdf> [Accessed August 22, 2014].
- Habener, J.F. & Stanojevic, V., 2013. Alpha cells come of age. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 24(3), pp.153–63.
- Habener, J.F. & Stanojevic, V., 2012.  $\alpha$ -cell role in  $\beta$ -cell generation and regeneration. *Islets*, 4(3), pp.188–198. Available at: <http://dx.doi.org/10.4161/isl.20500>.
- Henquin, J.C., 2009. Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation. *Diabetologia*, 52(5), pp.739–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19288076> [Accessed August 30, 2014].
- Herbach, N. et al., 2011. Postnatal development of numbers and mean sizes of pancreatic islets and  $\beta$ -cells in healthy mice and GIPR(dn) transgenic diabetic mice. *PloS one*, 6(7), p.e22814. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3144241&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 10, 2014].
- Hernández-Ávila, M., Gutiérrez, J.P. & Reynoso-Noverón, N., 2013. Diabetes mellitus en México . El estado de la epidemia. *Salud pública de México*, 55(1), pp.129–136.
- Herrera, P.L., 2000. Adult insulin- and glucagon-producing cells differentiate from two independent cell lineages. *Development* , 127 (11 ), pp.2317–2322. Available at: <http://dev.biologists.org/content/127/11/2317.abstract>.
- Hou, J.C., Min, L. & Pessin, J.E., 2009. *Insulin granule biogenesis, trafficking and exocytosis*. 1st ed., Elsevier Inc. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19251047> [Accessed August 29, 2014].
- Hyperplasia, R. et al., Linear Correlation Between  $\beta$  -Cell Mass and Body Weight Throughout the Lifespan in Lewis Rats. , (16), pp.1341–1346.

- Inada, A. et al., 2008. Carbonic anhydrase II-positive pancreatic cells are progenitors for both endocrine and exocrine pancreas after birth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(50), pp.19915–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2604974&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- International Diabetes Federation, 2013. *IDF Diabetes Atlas 6th edn*, Brussels, Belgium: International Diabetes Federation. Available at: <http://www.idf.org/diabetesatlas>.
- Jo, J. et al., 2011. Formation of pancreatic islets involves coordinated expansion of small islets and fission of large interconnected islet-like structures. *Biophysical journal*, 101(3), pp.565–74. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3145284&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 18, 2014].
- Johansson, K. a et al., 2007. Temporal control of neurogenin3 activity in pancreas progenitors reveals competence windows for the generation of different endocrine cell types. *Developmental cell*, 12(3), pp.457–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17336910> [Accessed October 27, 2014].
- Kassem, S.A. et al., 2000. B-cell proliferation and apoptosis in the developing normal human pancreas and in hyperinsulinism of infancy. *Diabetes*, 49 (8), pp.1325–1333. Available at: <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/49/8/1325.abstract>.
- Kataoka, M. et al., 2013. Recovery from diabetes in neonatal mice after a low-dose streptozotocin treatment. *Biochemical and biophysical research communications*, 430(3), pp.1103–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23257160> [Accessed November 30, 2014].
- Kawamori, D. et al., 2011. Growth factor signalling in the regulation of  $\alpha$ -cell fate. *Diabetes, obesity & metabolism*, 13 Suppl 1, pp.21–30.
- Kawamori, D. et al., 2009. Insulin signaling in alpha cells modulates glucagon secretion in vivo. *Cell metabolism*, 9(4), pp.350–61. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2694613&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 3, 2014].
- Kharouta, M. et al., 2009. No mantle formation in rodent islets -- the prototype of islet revisited. *Diabetes research and clinical practice*, 85(3), pp.252–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2746740&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 19, 2014].
- Kim, A. et al., 2009. Islet architecture: A comparative study. *Islets*, 1(2), pp.129–36. Available at:



<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2894473&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- King, A.J.F., 2012. The use of animal models in diabetes research. *British journal of pharmacology*, 166(3), pp.877–94. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3417415&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 22, 2014].
- Koutsikos, D. et al., 1996. Oral Glucose Tolerance Test After High-Dose i.v. Biotin Administration in Normoglycemic Hemodialysis Patients. *Renal Failure*, 18(1), pp.131–137. Available at: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/08860229609052783>.
- Larrieta, E. et al., 2010. Pharmacological concentrations of biotin reduce serum triglycerides and the expression of lipogenic genes. *European journal of pharmacology*, 644(1-3), pp.263–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20655901> [Accessed June 20, 2013].
- Lazo de la Vega-Monroy, M.L. et al., 2013. Effects of biotin supplementation in the diet on insulin secretion, islet gene expression, glucose homeostasis and  $\beta$ -cell proportion. *The Journal of nutritional biochemistry*, 24(1), pp.169–77. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22841397> [Accessed June 6, 2013].
- Leahy, J.L. et al., 2010. Targeting  $\beta$ -Cell Function Early in the Course of Therapy for Type 2 Diabetes Mellitus. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 95(9), pp.4206–4216. Available at: <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2010-0668>.
- Lenzen, S., 2008. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 51(2), pp.216–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18087688> [Accessed July 17, 2014].
- Li, Z., Karlsson, F. a & Sandler, S., 2000. Islet loss and alpha cell expansion in type 1 diabetes induced by multiple low-dose streptozotocin administration in mice. *The Journal of endocrinology*, 165(1), pp.93–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10750039>.
- Li, Z., Karlsson, F. & Sandler, S., 2000. Islet loss and alpha cell expansion in type 1 diabetes induced by multiple low-dose streptozotocin administration in mice. *Journal of endocrinology*, pp.93–99. Available at: <http://joe.endocrinology-journals.org/content/165/1/93.short> [Accessed December 1, 2014].
- Lucas, A., 1998. Programming by Early Nutrition: An Experimental Approach. *The Journal of Nutrition*, 128 (2), p.401S–406S. Available at: <http://jn.nutrition.org/content/128/2/401S.abstract>.
- Luis, A. & Stockert, R., 2000. Regulation of the insulin and asialoglycoprotein receptors via cGMP-dependent protein kinase. *American Journal of Physiology-Cell ...*, 10461, pp.2037–2042. Available at:

<http://ajpcell.physiology.org/content/279/6/C2037.short> [Accessed October 28, 2014].

Maebashi, M. & Makino, Y., 1993. Therapeutic evaluation of the effect of biotin on hyperglycemia in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Journal of clinical ...*, pp.211–218. Available at: <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=4795896> [Accessed October 29, 2014].

Mathis, D., Vence, L. & Benoist, C., 2001.  $[\beta]$ -Cell death during progression to diabetes. *Nature*, 414(6865), pp.792–798. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/414792a>.

Merkwitz, C. et al., 2013. The ductal origin of structural and functional heterogeneity between pancreatic islets. *Progress in histochemistry and cytochemistry*, 48(3), pp.103–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24100070> [Accessed May 10, 2014].

Miñana-Solis, M.D.C. & Escobar, C., 2007. Increased susceptibility to metabolic alterations in young adult females exposed to early malnutrition. *International journal of biological sciences*, 3(1), pp.12–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1622891&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Miñana-Solis, M.D.C. & Escobar, C., 2008. Post-weaning protein malnutrition in the rat produces short and long term metabolic impairment, in contrast to earlier and later periods. *International journal of biological sciences*, 4(6), pp.422–32. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2586678&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Montanya, E. et al., 2000. Linear correlation between  $\beta$ -cell mass and body weight throughout the lifespan in Lewis rats: role of  $\beta$ -cell hyperplasia and hypertrophy. *Diabetes*, 49 (8), pp.1341–1346. Available at: <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/49/8/1341.abstract>.

Murtaugh, L.C. & Melton, D. a, 2003. Genes, signals, and lineages in pancreas development. *Annual review of cell and developmental biology*, 19, pp.71–89. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14570564> [Accessed August 5, 2014].

Nichols, R.J., New, C. & Annes, J.P., 2014. Adult tissue sources for new  $\beta$  cells. *Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine*, 163(4), pp.418–431. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24345765> [Accessed April 16, 2014].

Nir, T., Melton, D.A. & Dor, Y., 2007. Recovery from diabetes in mice by  $\beta$  cell regeneration. , 117(9), pp.2553–2561.

O'Brien, B. a et al., 1996. B-cell apoptosis is responsible for the development of IDDM in the multiple low-dose streptozotocin model. *The Journal of*

*pathology*, 178(2), pp.176–81. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8683386>.

Paris, M. et al., 2004. Review: pancreatic  $\beta$ -cell neogenesis revisited. *Experimental diabetes research*, 5(2), pp.111–21. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2496878&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 24, 2013].

Pipeleers, D. et al., 1982. Glucose-induced insulin release depends on functional cooperation between islet cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(23), pp.7322–7325. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC347331/>.

Pittman, I., Philipson, L. & Steiner, D., 2004. Insulin biosynthesis, secretion, structure, and structure - activity relationships. Available at:  
<http://diabetesmanager.pbworks.com/w/page/17680216/Insulin>.

Plesner, A., Ten Holder, J.T. & Verchere, C.B., 2014. Islet remodeling in female mice with spontaneous autoimmune and streptozotocin-induced diabetes. *PloS one*, 9(8), p.e102843. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4125302&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 26, 2014].

Poitout, V. et al., 2006. Regulation of the Insulin Gene by Glucose and Fatty Acids. *The Journal of Nutrition*, 136 (4), pp.873–876. Available at:  
<http://jn.nutrition.org/content/136/4/873.abstract>.

Prentki, M. & Nolan, C.J., 2006. Islet  $\beta$  cell failure in type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(7), pp.1802–1812. Available at:  
<http://www.jci.org/articles/view/29103>.

Quesada, I. et al., 2008a. Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *The Journal of endocrinology*, 199(1), pp.5–19. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18669612> [Accessed March 20, 2014].

Quesada, I. et al., 2008b. Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *The Journal of endocrinology*, 199(1), pp.5–19. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18669612> [Accessed November 29, 2014].

Reddi, A. et al., 1988. Biotin supplementation improves glucose and insulin tolerances in genetically diabetic KK mice. *Life sciences*, 42(13), pp.1323–30.

Rhodes, C.J., 2005. Type 2 Diabetes—a Matter of  $\beta$ -Cell Life and Death? *Science*, 307 (5708), pp.380–384. Available at:  
<http://www.sciencemag.org/content/307/5708/380.abstract>.

- Risbud, M. V & Bhonde, R.R., 2002. Models of pancreatic regeneration in diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 58(3), pp.155–165. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168822702001031>.
- Rodriguez-Melendez, R. & Zemleni, J., 2003. Regulation of gene expression by biotin☆ (review). *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 14(12), pp.680–690. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095528630300130X> [Accessed December 3, 2012].
- Rojas, A. et al., 2010. Islet Cell Development. In M. S. Islam, ed. *The Islets of Langerhans SE - 4*. Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer Netherlands, pp. 59–75. Available at: [http://dx.doi.org/10.1007/978-90-481-3271-3\\_4](http://dx.doi.org/10.1007/978-90-481-3271-3_4).
- Romero-Navarro, G. et al., 1999. Biotin regulation of pancreatic glucokinase and insulin in primary cultured rat islets and in biotin-deficient rats. *Endocrinology*, 140(10), pp.4595–600. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10499515>.
- Rorsman, P. & Renström, E., 2003. Insulin granule dynamics in pancreatic  $\beta$  cells. *Diabetologia*, 46(8), pp.1029–45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12879249> [Accessed August 29, 2014].
- Said, H.M., 2012. Biotin: biochemical, physiological and clinical aspects. In O. Stanger, ed. *Water Soluble Vitamins*. Springer Netherlands, pp. 1–19. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22116691> [Accessed January 16, 2013].
- Sakata, N. et al., 2012. Animal models of diabetes mellitus for islet transplantation. *Experimental diabetes research*, 2012, p.256707. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3546491&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 26, 2013].
- Salati, L.M. & Amir-Ahmady, B., 2001. DIETARY REGULATION OF EXPRESSION OF GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE. *Annual Review of Nutrition*, 21(1), pp.121–140. Available at: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.nutr.21.1.121>.
- Salehi, A., Vieira, E. & Gylfe, E., 2006. Paradoxical stimulation of glucagon secretion by high glucose concentrations. *Diabetes*, 55(8), pp.2318–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16873696> [Accessed April 16, 2014].
- Scaglia, L. et al., 1997. Apoptosis participates in the remodeling of the endocrine pancreas in the neonatal rat. *Endocrinology*, 138(4), pp.1736–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9075738>.

- Shaw, J.E., Sicree, R. a & Zimmet, P.Z., 2010. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes research and clinical practice*, 87(1), pp.4–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19896746> [Accessed July 11, 2014].
- Shih, H.P., Wang, A. & Sander, M., 2013. Pancreas organogenesis: from lineage determination to morphogenesis. *Annual review of cell and developmental biology*, 29, pp.81–105. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23909279> [Accessed December 12, 2013].
- Siegel, E.G. & Creutzfeldt, W., 1987. Effect of low concentrations of glucagon on insulin release and cyclic AMP content in isolated rat islets. *Metabolism - Clinical and Experimental*, 36(10), pp.953–957. Available at: [http://www.metabolismjournal.com/article/0026-0495\(87\)90131-4/abstract](http://www.metabolismjournal.com/article/0026-0495(87)90131-4/abstract).
- Simmons, R., Templeton, L. & Gertz, S., 2001. Intrauterine growth retardation leads to the development of type 2 diabetes in the rat. *Diabetes*, 50(OCTOBER). Available at: <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/50/10/2279.short> [Accessed October 28, 2014].
- Sone, H. et al., 2004. Biotin enhances ATP synthesis in pancreatic islets of the rat, resulting in reinforcement of glucose-induced insulin secretion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 314(3), pp.824–829. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X03027840> [Accessed October 28, 2014].
- Sone, H. et al., 2000. Characteristics of the Biotin Enhancement of Glucose-induced Insulin Release in Pancreatic Islets of the Rat. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64(3), pp.550–554.
- Steiner, D. et al., 2010. Pancreatic islet plasticity: interspecies comparison of islet architecture and composition. *Islets*, 2:3(June), pp.135–145. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2908252/> [Accessed August 19, 2014].
- Strandell, E., Eizirik, D.L. & Sandler, S., 1990. Reversal of  $\beta$ -cell suppression in vitro in pancreatic islets isolated from nonobese diabetic mice during the phase preceding insulin-dependent diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Investigation*, 85(6), pp.1944–1950. Available at: <http://www.jci.org/articles/view/114657>.
- Sugita, Y. et al., 2008. Effect of Biotin Treatment on Hepatic Gene Expression in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72(5), pp.1290–1298. Available at: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/bbb/70781?from=CrossRef> [Accessed June 19, 2013].

- Teta, M., Long, S. & Wartschow, L., 2005. Very slow turnover of  $\beta$ -cells in aged adult mice. *Diabetes*, 54(September), pp.2557–2567. Available at: <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/54/9/2557.short> [Accessed November 26, 2014].
- Thorel, F. et al., 2010. Conversion of adult pancreatic alpha-cells to  $\beta$ -cells after extreme  $\beta$ -cell loss. *Nature*, 464(7292), pp.1149–54. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2877635&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 2, 2014].
- Thyssen, S., Arany, E. & Hill, D.J., 2006. Ontogeny of regeneration of  $\beta$ -cells in the neonatal rat after treatment with streptozotocin. *Endocrinology*, 147(5), pp.2346–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16484329> [Accessed December 20, 2013].
- Tonne, J.M. et al., 2013. Global gene expression profiling of pancreatic islets in mice during streptozotocin-induced  $\beta$ -cell damage and pancreatic Glp-1 gene therapy. *Disease models & mechanisms*, 6(5), pp.1236–45. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3759343&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 16, 2014].
- Unger, R. & Orci, L., 1975. THE ESSENTIAL ROLE OF GLUCAGON IN THE PATHOGENESIS OF DIABETES MELLITUS. *The Lancet*, 305(7897), pp.14–16. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673675923752>.
- Vilches-Flores, A. et al., 2010. Biotin increases glucokinase expression via soluble guanylate cyclase/protein kinase G, adenosine triphosphate production and autocrine action of insulin in pancreatic rat islets. *The Journal of nutritional biochemistry*, 21(7), pp.606–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19560332> [Accessed October 1, 2014].
- Wang, H. et al., 2011. A-Cell Loss From Islet Impairs Its Insulin Secretion in Vitro and in Vivo. *Islets*, 3(2), pp.58–65. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/isl.3.2.15036> [Accessed December 2, 2014].
- Weir, G.C. et al., 2001. B-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. *Diabetes*, 50 (suppl 1), p.S154. Available at: [http://diabetes.diabetesjournals.org/content/50/suppl\\_1/S154.abstract](http://diabetes.diabetesjournals.org/content/50/suppl_1/S154.abstract).
- Wu, K.K. & Huan, Y., 2008. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Current protocols in pharmacology / editorial board, S.J. Enna (editor-in-chief) ... [et al.]*, Chapter 5(March), p.Unit 5.47. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22294227> [Accessed October 31, 2012].
- Xu, X. et al., 2008. B cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas. *Cell*, 132(2), pp.197–207. Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18243096> [Accessed March 19, 2014].

Yoshikawa, H. et al., 2002. Effects of biotin on glucotoxicity or lipotoxicity in rat pancreatic islets. *Metabolism*, 51(2), pp.163–168. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026049502989304> [Accessed October 2, 2014].

Zempleni, J., Wijeratne, S.S.K. & Hassan, Y.I., 2009. Biotin. *BioFactors (Oxford, England)*, 35(1), pp.36–46. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19319844> [Accessed January 16, 2013].

Zhang, H. et al., 1996. A High Biotin Diet Improves the Impaired Glucose Tolerance of Long-Term Spontaneously Hyperglycemic Rats with Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 42(6), pp.517–526.

Zhang, H. et al., 1997. Biotin administration improves the impaired glucose tolerance of streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *Journal of nutritional* ..., pp.271–280. Available at: <http://europepmc.org/abstract/MED/9268917> [Accessed June 20, 2013].

Zhang, Y. et al., 2012. Regeneration of pancreatic non- $\beta$  endocrine cells in adult mice following a single diabetes-inducing dose of streptozotocin. *PloS one*, 7(5), p.e36675. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3346729&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 5, 2014].

Zmuda, E.J., Powell, C.A. & Hai, T., 2011. A Method for Murine Islet Isolation and Subcapsular Kidney Transplantation. , (50), p.e2096. Available at: <http://www.jove.com/video/2096>.