



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE BIOTINA
SOBRE LA EXPANSIÓN DE LA CÉLULA β
PANCREÁTICA EN EL RATÓN**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

SERGIO RAFAEL CARRILLO PATIÑO



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. MARÍA CRISTINA FERNÁNDEZ MEJÍA**

Ciudad Universitaria, CD. MX., 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno
Apellido paterno: Carrillo
Apellido materno: Patiño
Nombres: Sergio Rafael
Teléfono: 55-26-03-28-28
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
Número de cuenta: 307025403

2. Datos del tutor
Grado: Dra.
Nombre: María Cristina
Apellido paterno: Fernández
Apellido materno: Mejía

3. Datos del sinodal 1
Grado: Dr.
Nombres: René de Jesús
Apellido paterno: Cárdenas
Apellido materno: Vázquez

4. Datos del sinodal 2
Grado: Dra.
Nombres: Lydia Sumiko
Apellido paterno: Morimoto
Apellido materno: Martínez

2. Datos del sinodal 3
Grado: Dra.
Nombre: María Cristina
Apellido paterno: Fernández
Apellido materno: Mejía

5. Datos del sinodal 4
Grado: Dr.
Nombres: Juan Luis
Apellido paterno: Chávez
Apellido materno: Pacheco

6. Datos del sinodal 5
Grado: M. en C.
Nombres: Sara Teresa
Apellido paterno: Méndez
Apellido materno: Cruz

7. Datos del trabajo escrito.

Título: Efecto de la suplementación de biotina sobre la expansión de la célula β pancreática en el ratón

Número de páginas: 60

Año: 2016

Este trabajo de tesis fue realizado en la Unidad de Genética de la Nutrición del
Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de
México/ Instituto Nacional de Pediatría

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

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS PERSONALES

Agradezco y dedico este trabajo a mi familia, especialmente a mis padres quienes siempre me han apoyado y han depositado su confianza; sus enseñanzas y virtudes siempre serán tomadas en cuenta en cada día de mi vida. A mis abuelos les doy las gracias por compartirme su sabiduría y por el cariño y protección brindados. Para mi hermana y el resto de mi familia les doy las gracias por sus consejos, ánimos y buenos ratos vividos.

Con la misma fuerza y entusiasmo quiero agradecer a aquellos compañeros que ahora considero amigos y con quien tuve el gusto de trabajar: Everardo Ruíz, Brianda Mondragón, Rafael Ramírez, Ixel Luna y Antonia Guzmán, mención especial a Wilma Tixi, quien me ha brindado su apoyo y guía a lo largo de la realización de este proyecto. A todos ellos les deseo que encuentren satisfacción y felicidad en las decisiones que tomen. Es mi intención seguir en contacto con cada uno en el futuro, no solo profesionalmente sino personalmente.

A la Dra. Cristina Fernández le agradezco enormemente la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo, con quienes la experiencia obtenida, considero es invaluable para mi futuro desempeño académico. De igual forma quiero reconocer su perseverancia y comprensión hacia mi persona.

Por último agradecer a Maura Angélica Flores, quien dio luz a este proyecto y con quien me fue grato trabajar, donde este espero se encuentre bien.

ÍNDICE

A. RESUMEN.....	7
B. Introducción.....	9
B. 1.1 Biotina.....	9
B. 1.1.2 Efectos supra fisiológicos de la biotina.....	11
B. 1.1.3 Mecanismos de regulación en la expresión génica por biotina.....	13
B. 1.1.4 Efectos de la suplementación de biotina en páncreas.....	13
B. 2. Páncreas.....	14
B. 2.1 Arquitectura del islote.....	15
B. 2.2 Arquitectura del tejido exocrino.....	16
B. 2.2.1 Células acinares.....	16
B. 2.2.2 Células ductales.....	17
B. 2.2.3 Células centroacinares.....	18
B. 3. Desarrollo Pancreático.....	19
B. 4 Factores de señalización en la morfogénesis pancreática.....	23
B. 4.1 Factores de señalización pro-endocrinos.....	23
B. 4.2 Factores de señalización pro-exocrinos.....	24
B. 5. Programación metabólica y Ventana crítica.....	25
B. 6. Expansión del islote pancreático durante el desarrollo.....	27
B. 7. Mantenimiento posnatal del islote.....	28
B. 7.1 Proliferación.....	29
B. 7.2 Hipertrofia celular.....	29
B. 7.3 Muerte celular.....	30
B. 7.4 Neogénesis.....	30
B. 8. Proteínas de regeneración asociadas a la neogénesis.....	32

C. Planteamiento del problema	34
D. Objetivo general	35
D.1. Objetivos particulares.....	35
E. Hipótesis	35
F. Material y Métodos	36
F. 1.1 Unidades de Experimentación.....	36
F. 1.2 Dieta Control y dieta suplementada.....	36
F. 1.3 Curva de tolerancia a la glucosa.....	37
F. 1.4 Análisis inmunohistoquímico de páncreas.....	37
F. 1.5 Identificación de neogénesis.....	38
F. 1.5 Estadística.....	38
G. Resultados	38
G. 1.1 Curva de crecimiento.....	38
G. 1.2 Curva de tolerancia a la glucosa.....	39
G. 1.3 Análisis histológicos: Morfología del Islote.....	40
G. 1.3.1 Frecuencia de tamaño de islotes.....	40
G. 1.3.2 Tamaño promedio del islote.....	41
G. 1.3.3 Fracción del total del área pancreática.....	42
G. 1.3.4 Número de islotes por cada 10mm ²	43
G. 1.3.5 Composición del islote: área de células α y β	43
G. 1.3.6 Número de células α y β por islote.....	44
G. 1.3.7 Número de islotes cercanos a ductos (neogénesis) y su composición.....	45
G. 1.3.8 Área positiva a RegIII δ	47
H. Discusión	50
I. Conclusión	52
J. REFERENCIAS	53

A. RESUMEN

La biotina es una vitamina hidrosoluble esencial que funciona como grupo prostético de las enzimas carboxilasas. Los requerimientos diarios de la vitamina en individuos adultos son 30 microgramos. En concentraciones de 1.5 a 3 órdenes de magnitud por arriba de sus requerimientos diarios, (concentraciones suprafisiológicas) se ha encontrado que modifica funciones biológicas como: proliferación celular, desarrollo embrionario, respuesta inmunológica y del metabolismo a través de su efecto sobre la expresión génica. En modelos *in vivo* se ha visto que la biotina incrementa la expresión de genes que son importantes en el mantenimiento del islote y la secreción de insulina dependiente de glucosa.

Estudios previos demostraron que en ratones la suplementación con biotina a partir del destete durante ocho semanas, incrementó la secreción de insulina, la expresión de genes que participan en la secreción y producción de insulina, así como el tamaño de los islotes aumentando el número de células α y β . En una investigación posterior se encontró que la suplementación con biotina durante etapas tempranas de la vida (3 semanas después del destete) tiene un efecto protector ante el desarrollo de hiperglucemia y daño de las células β en la edad adulta. Sin embargo, se desconocen los cambios que produjo la biotina durante este periodo que permitió al islote resistir este daño. En este trabajo se analizó cuál es el efecto de dos semanas de tratamiento de la suplementación con biotina, posteriores al destete, sobre el tamaño y la composición de células de los islotes, así como su capacidad de regeneración, analizando el proceso de neogénesis y la participación de la proteína RegIII δ .

Ratones hembra BALB/cAnN Hsd dispuestos en dos grupos denominados control y suplementado se les administró una dieta con 0.8 o 100 mg de biotina/kg de alimento, respectivamente durante 14 días a partir del destete. Los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas en las curvas de tolerancia a la glucosa entre los grupos, sin embargo el grupo suplementado mostró una tendencia a tener concentraciones menores de glucosa en sangre, lo cual se había observado en trabajos anteriores. En cuanto al área promedio del islote el grupo suplementado presentó un tamaño mayor cuya diferencia fue estadísticamente significativa, con respecto al grupo control. La composición de los islotes del grupo suplementado reveló un aumento en el número de células α , respecto al control, mientras que las células β no exhibieron cambios entre los grupos. Además, el

área de las células α dentro del islote para el grupo suplementado, fue significativamente mayor; en tanto que el área de las células β fue menor con respecto al grupo control.

El análisis de los islotes positivos a neogénesis mediante el criterio del número de células que separan al islote del ducto, reveló que las células β del grupo suplementado, se encuentran incrementadas en número con respecto al grupo control, esto pudiendo deberse a que los islotes neogénicos correspondientes al grupo suplementado, tienen un mayor grado de maduración y por lo tanto tienen un mayor número de células β . No obstante entre ambos grupos no se manifestó una diferencia significativa en el número de islotes positivos a neogénesis. De la misma forma no se mostraron diferencias entre los grupos, en la presencia del marcador RegIII δ , el cual se ha sugerido que participa en el proceso de neogénesis en condiciones de daño pancreático.

Los resultados anteriores indican que la suplementación con biotina durante dos semanas sí contribuye al aumento observado en el tamaño del islote por medio del incremento en el número de células α , así como en su respectiva área. Sin embargo en cuanto a las células β , el grupo suplementado presentó una menor área de éstas dentro del islote, manteniendo sin cambios el número de células β , lo que podría deberse a una disminución en el tamaño de estas.

Finalmente no se encontraron diferencias en el número de islotes positivos a neogénesis, ni en la expresión de la proteína RegIII δ , a pesar de que los islotes positivos a neogénesis del grupo suplementado tuvieron significativamente un mayor número de células β , por lo que la neogénesis no se considera como el principal mecanismo de expansión de la célula β después del tratamiento.

B. Introducción

Las vitaminas son compuestos orgánicos, necesarios en pequeñas cantidades y esenciales para mantener un adecuado metabolismo celular (Godínez-Rubí, 2012). Hasta hace poco solamente a las vitaminas liposolubles se les había atribuido funciones específicas en la modulación de la expresión génica, por ejemplo la vitamina A y D intervienen en procesos como la reproducción, el desarrollo embrionario y la función inmunitaria, sin embargo en los últimos años los estudios sobre las vitaminas hidrosolubles, que se han caracterizado por actuar como cofactores enzimáticos, han demostrado su capacidad para actuar sobre la regulación génica (Pekovich *et al*, 1998; Oka T, 2001. Zemleni, 2009).

B. 1.1 *Biotina*

La biotina o vitamina H es una vitamina hidrosoluble esencial, que funciona como grupo prostético que se une covalentemente a sistemas de enzimas, en las que participa en reacciones de carboxilación y transcarboxilación.

Fue aislada por primera vez en 1936 por Kögl y Tonnis, y la determinación de su estructura fue descubierta por Du Vigneau *et al* en 1942 (Harris *et al*, 1943), la cual consiste en un compuesto bícíclico con un anillo que contiene un grupo ureido (-N-CO-N-) y otro que contiene azufre y se denomina tetrahidrotiofeno, del cual se ramifica una cadena lateral de ácido valérico (Mock, 1991).

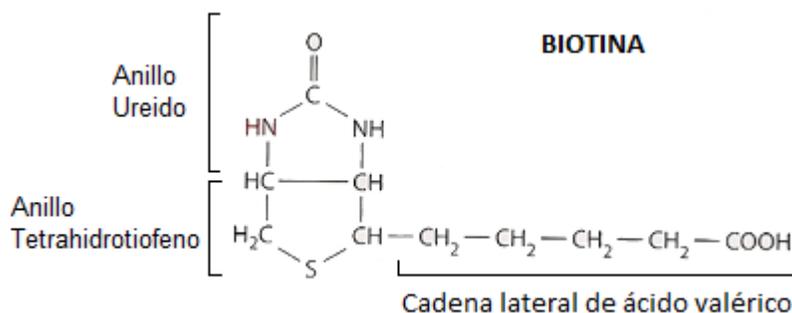


Figura 1. Estructura química de la biotina

La biotina es esencial para todos los organismos conocidos y es sintetizada por plantas y microorganismos. Al igual que en todos los mamíferos, los humanos y roedores se carece de la habilidad de sintetizar esta vitamina (Zemleni, 2009). La biotina puede encontrarse en la mayoría de los alimentos, siendo algunos como el hígado, riñón, huevo, levadura y leche algunas de las fuentes más ricas en este, en comparación de granos de cereales, fruta y carne.

Los requerimientos en el adulto van desde los 30 $\mu\text{g}/\text{día}$ hasta los 200 $\mu\text{g}/\text{día}$ (Yates, 1998; Hernández, 1999), esta cantidad comúnmente se encuentra contenida en la dieta, incluso sin contemplar la biotina que es sintetizada por las bacterias en el intestino grueso, aunque su contribución cuantitativa al metabolismo no está clara (Said, 2011).

La deficiencia de biotina en el humano es rara, debido a su amplia distribución en los alimentos y su reutilización a partir de la proteólisis de las carboxilasas. Sin embargo, desordenes recesivos autosomales pueden causar un mal funcionamiento en la actividad de las carboxilasas dependientes de biotina que dan como consecuencia un fenotipo semejante al desarrollado por la deficiencia de esta vitamina (Pacheco-Alvarez, 2002; Wolf, 1982).

La biotina de los alimentos se encuentra principalmente unida a proteínas. La digestión de las proteínas de la dieta unidas a biotina, da origen a la biocitina, donde se encuentra unida covalentemente a una lisina. Es en la región del duodeno del intestino delgado donde tanto la biotina libre y la biocitina son asimiladas por los enterocitos a través del transportador múltiple de vitaminas dependiente de sodio (SMVT), en reconocimiento de la fracción de ácido valérico (Cohen, *et al.*, 1982); posteriormente son transportadas en la sangre unida a la albumina y a las α y β -globulinas. La enzima biotinidasa, contenida en plasma y eritrocitos, cataliza la hidrólisis de biocitina a biotina libre. Finalmente la biotina en la sangre es captada por el hígado, músculo y riñón, y está presente en carboxilasas citosólicas y mitocondriales.

La función bioquímica de la biotina es la de participar como grupo prostético de cinco enzimas carboxilasas: Acetil-CoA carboxilasa (ACC), tanto en la isoforma citosólica (ACC1) como la mitocondrial (ACC2); de las enzimas mitocondriales piruvato carboxilasa (PC), propinil-CoA carboxilasa (PCC) y metilcrotonil-CoA carboxilasa (MCC) (Chapman A. *et al.*, 1999). Las cuales intervienen en reacciones de síntesis de grasa, carbohidratos y aminoácidos (De Luis Román, 2010).

Enzima	Reacción	Metabolismo
Acetil-CoA Carboxilasa	Acetil CoA + HCO ₃ ⁻ + ATP ↔ Malonil CoA+ADP+Pi	Síntesis de ácidos grasos
Piruvato carboxilasa	Piruvato + HCO ₃ ⁻ + ATP ↔ Oxalacetato + ADP + Pi	Gluconeogénesis
Propinil-CoA carboxilasa	Propinil-CoA + HCO ₃ ⁻ + ATP ↔ Metilmalonil CoA + ADP + Pi	Oxidación de ácidos grasos. Degradación de isoleucina
β-Metilcrotonil-CoA carboxilasa	β-Metilcrotonil CoA + HCO ₃ ⁻ + ATP ↔ β-Metilglutaconil CoA + ADP + Pi	Degradación de leucina a acetoacetato, y de ciertos isoprenoides

Tabla 1. Carboxilasas asociadas a biotina. Modificada Harris R. S. Vitamins and Hormones. Volumen 22.

La unión covalente de la biotina a las apocarboxilasas (carboxilasas sin actividad enzimática) correspondientes requiere de una conversión ATP dependiente de la vitamina a biotinil-5'-adenilato seguida de la formación de un enlace semipeptídico del residuo biotinil con el grupo epsilon-amino de los residuos lisil, ubicado dentro de una secuencia Met-Lys-Met, específica de las apocarboxilasas (Lamhonwah, *et al.*, 1987), esta reacción es catalizada por una holocarboxilasa sintetaza.

Durante el periodo de funcionamiento de las holocarboxilasas, la biotina se mantiene unida a estas, hasta que son degradadas por proteólisis en los lisosomas, para dar lugar a residuos de biocitina. La enzima biotinidasa se encarga nuevamente de romper la unión entre lisina y biotina, permitiendo la reutilización de biotina libre.

El catabolismo de la biotina se da por dos diferentes vías: a través de la β-oxidación de la cadena lateral de ácido valérico y mediante la oxidación del anillo de tiofeno de la biotina. En los mamíferos durante el catabolismo de la biotina se forman diferentes metabolitos los cuales incluyen a la bisnorbiotina, biotina sulfóxidos, bisnorbiotina metilcetona, biotina sulfona y tetranorbiotina-1-sulfoxido (Coates, 2005). En la orina humana el principal producto excretado es la biotina intacta, bis-norbiotina y biotina sulfóxido (Castillo, 1991; McCormick, 1994).

B. 1.1.2 Efectos supra fisiológicos de la biotina

Diferente a su función como grupo prostético, se ha evidenciado, que la concentración de biotina, en niveles de varios ordenes de magnitud por arriba de sus requerimientos diarios (concentraciones suprafisiológicas) tiene efecto sobre la expresión genética. Tales efectos no son exclusivos de la molécula de biotina misma, ni son resultado de la actividad de las carboxilasas, ya

que se ha observado que los metabolitos resultantes del catabolismo de la biotina como la bisnorbiotina tienen la misma capacidad de modificar la expresión genética (Rodríguez-Melendez, 2003; Rodríguez-Melendez 2006).

Los primeros estudios que encontraron acciones de concentraciones suprafisiológicas de biotina, fueron realizados por Dakshinamurti *et al.*, en la década de 1960 (Dakshinamurti, 1968; Dakshinamurti, 1970). Actualmente se tiene en cuenta que su participación en la regulación génica se da tanto a nivel transcripcional como a nivel post transcripcional, lo cual tiene amplios efectos sobre procesos sistémicos como la proliferación celular, el desarrollo embrionario (Watanabe T. *et al.*, 1990; Watanabe T., 1996; Watanabe T., 2009), funciones inmunológicas y el metabolismo (Rodríguez, 2003), principalmente en la homeostasis de lípidos y glucosa (Fernández-Mejía, 2005)

A nivel transcripcional se ha evidenciado su influencia en enzimas de su propio metabolismo como la holocarboxilasa sintetasa (HCS) (Rodríguez- Melendez, 2001; Solórzano-Vargas, 2002), la acetil coenzima A carboxilasa-1 (ACC-1), la propinil coenzima A carboxilasa-A (PCCA) (Solórzano-Vargas, 2002), así como en proteínas no relacionadas con éste como la interleucina 2 y el receptor de interleucina 2, los factores transcripcionales NF- κ B, N-myc, c-myb, N-ras y raf.

La biotina tiene también efectos a nivel post transcripcional estudios realizados por Stockert *et al.*, demostraron modificaciones en la expresión del receptor de asialoglicoproteínas a través de una vía que requiere GMPc y de la proteína cinasa G (PKG) (Stockert *et al.*, 1990; Stockert *et al.*, 1997; Collins J. *et al.*, 1988; De la Vega L. *et al.*, 2000). De la misma forma la biotina regula la expresión del receptor de la insulina por un mecanismo post transcripcional que requiere de la activación de la PKG (De la Vega L. & Stockert, 2000).

Por medio de estudios utilizando microarreglos de DNA, se han identificado miles de genes afectados por concentraciones suprafisiológicas de biotina (Rodríguez-Meléndez, 2006). En el metabolismo de la glucosa ha resultado de gran interés debido a la gran cantidad de genes regulados por esta vitamina, como la glucocinasa (GK) hepática (Chauhan 1991), la fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPCK) hepática, la glucocinasa (GK) pancreática (Vilches-Flores A., 2005), así también como en insulina, el factor transcripcional de las células β ; PDX-1.

La biotina a dosis suprafisiológicas se ha reportado que disminuye la hiperglucemia, resultando útil en el tratamiento de esta condición (Albarracín, *et al.*, 2005; Singer, *et al.*, 2006). Estudios clínicos

en pacientes con diabetes tipo 1, tratados con biotina por una semana sin recibir insulina exógena, disminuyeron sus niveles de glucosa en ayuno (Coggeshal, *et al.*, 1985). Mientras que otro estudio en pacientes con diabetes tipo 2, la administración oral de 9mg de biotina cada día por un mes, disminuyó las concentraciones de glucosa en ayuno, así como de piruvato y lactato (Maebashi, *et al.*, 1993).

B. 1.1.3 Mecanismos de regulación en la expresión génica por biotina

La modificación en la expresión génica por la biotina se explica por tres mecanismos, el primero a través de la activación de la guanilato ciclasa soluble por la biotinil-AMP, el segundo a por medio de la translocación de NF- κ B al núcleo en respuesta a la deficiencia de biotina, y el tercero por la remodelación de cromatina por biotinilación de histonas. Estos mecanismos aunque distintos, no son considerados excluyentes para poder llevarse a cabo concomitantemente en las células (Rodríguez-Melendez, 2003).

B. 1.1.4 Efectos de la suplementación de biotina en páncreas

Estudios previos de este grupo de trabajo presentados por Lazo de la Vega *et al.*, 2013, mostraron los efectos *in vivo* de una dieta suplementada con biotina en ratones tratados por ocho semanas pos destete en comparación a un grupo de ratones control. Los resultados de la dieta enriquecida arrojaron un aumento en la expresión del mRNA de varios factores de transcripción participantes en la expresión y secreción de la insulina tales como Foxa2 (forkhead box A2), Pdx-1 (pancreatic and duodenal homeobox) y Hnf4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α), así mismo el mRNA de la glucosinasa, Cacna1d (calcium voltage-gated channel subunit alpha1 D), acetil-CoA carboxilasa e insulina también se vieron incrementados. Todos estos efectos fueron consistentes con un mejoramiento en la tolerancia a la glucosa asociado con un aumento en los niveles de insulina en suero por estimulación de glucosa. Además la suplementación con biotina produjo cambios en la arquitectura y morfología del islote que consistieron en un aumento en el porcentaje de islotes con células α al centro (40.6%) y un aumento en la proporción de las células β y células α en el área pancreática por amplificación en el tamaño de los islotes, sin presentarse cambios en la proporción ni composición de las células α y β (Lazo de la Vega M., *et al.*, 2013), esto último podría deberse a procesos como incremento en la proliferación, disminución de apoptosis o un aumento en la neogénesis.

B. 2. Páncreas

El páncreas es tanto una glándula endocrina como una exocrina, que participa en funciones fisiológicas fundamentales como la digestión del alimento y la homeostasis de la glucosa. En los mamíferos, el páncreas se localiza en el marco duodenal, la primera parte del intestino delgado, y contempla una composición determinada por una cabeza, un cuerpo y una cola, y esta habitualmente conectado con el duodeno por dos conductos. La cabeza es la porción ensanchada del órgano cercana a la curvatura del duodeno, por encima y a la izquierda de la cabeza se encuentran el cuerpo y la cola de forma ahusada.

Casi el 99% de las células del órgano se disponen en racimos llamados acinos. Los acinos producen enzimas digestivas, que fluyen al tubo digestivo a través de una red de conductos. Los ductos se encuentran formados por las células ductales quienes son las responsables de producir bicarbonato de sodio, el cual neutraliza el ácido estomacal y ajusta el pH para la activación de las enzimas digestivas (Pinho, 2011).

El jugo pancreático es secretado dentro de ductos que se unen íntimamente para formar dos largos conductos principales: el conducto pancreático o conducto de Wirsung y el conducto accesorio o conducto de Sartorini, que vuelcan las secreciones en el duodeno. El órgano pancreático se halla cubierto completamente por una capa de tejido conectivo, rico en células mesoteliales, con finos tabiques que dividen a la glándula en lóbulos.

Diseminados entre los acinos exocrinos hay pequeños racimos de tejido endocrino llamados islotes pancreáticos o islotes de Langerhans, que conforman el 1% de la masa total del páncreas (Tortora *et al.*, 2011), los cuales se encuentran presentes, con mayor densidad en la zona de la cola. Los islotes de Langerhans, también denominados micro órganos endocrinos (Mezza, 2014), se pueden definir como agregados celulares vascularizados que comprenden más de un tipo de células productoras de hormonas pancreáticas (Bouwens, 2004). Son las unidades funcionales del sistema multi hormonal pancreático. Cada islote pancreático contiene cinco tipos celulares diferentes: células productoras de insulina o células β , que representan 70%; células productoras de glucagón o células α , que representan 20%; las células productoras de somatostatina o células δ , que representan entre 5 a 10%, las células productoras del polipéptido pancreático o PP, que abarcan alrededor de 2% y las células secretoras de ghrelina o células ϵ abarcando menos del 1%. Todas estas hormonas están involucradas en la regulación del metabolismo de nutrientes y homeostasis de la glucosa. Sin embargo, son la insulina y el glucagón quienes juegan un papel directo en el mantenimiento homeostático de la glucosa.

Las células de los islotes están delimitadas en forma incompleta por una capa delgada de tejido conectivo reticular que se continúa en el interior de los islotes en escasa cantidad (Ross *et al.*, 1997).

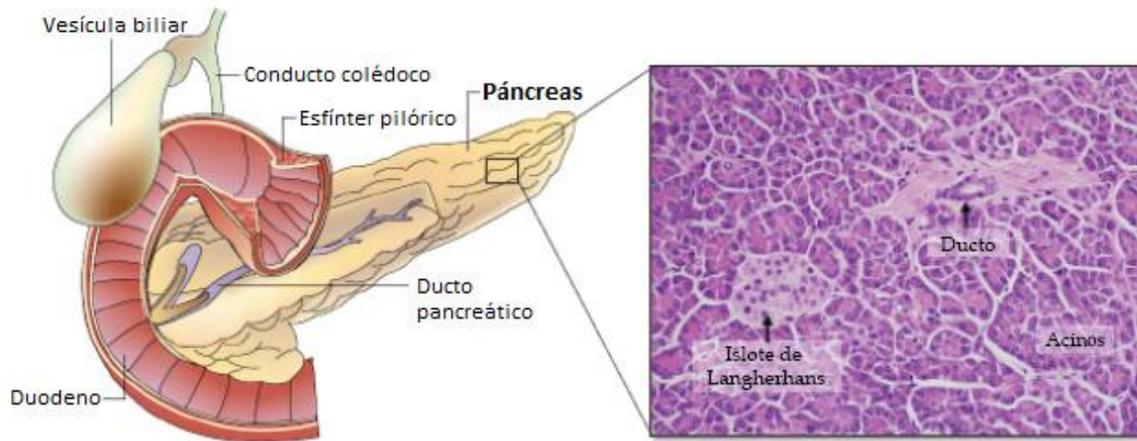


Figura 2. Anatomía del páncreas. Localización del páncreas en el humano, se muestra su composición exocrina (ductos y acinos) y endocrina. Adaptada de Bardeesy y DePinho, 2002

B. 2.1 Arquitectura del islote

En la mayoría de los mamíferos las células endocrinas conforman grupos esféricos u ovoides conocidos como islotes, estas estructuras se encuentran altamente organizadas. En los ratones y ratas, las células β se localizan predominantemente en el centro, mientras que los otros tipos celulares se localizan en la periferia (Krstić, 1997). Su diámetro puede oscilar de los 50 a los 500 μm y llegan a conformarse por 50 a 300 células en promedio (Hiriart M, 2002).

Los islotes se encuentran bien vascularizados por numerosos capilares, esta organización del aporte vascular permite llevar la sangre del núcleo a la periferia y se le conoce como BAD (β - α - δ) por su forma centrífuga de aporte vascular (Vinik, 2004), ya que va desde las células β hacia las α , δ y demás que las rodean. De esta manera las células β son el primer tipo celular en notar los cambios metabólicos transmitidos en la sangre (Burkitt, 1993).

Los islotes están inervados por fibras nerviosas autónomas, conteniendo nervios parasimpáticos y simpáticos que entran en el islote y terminan en la proximidad de las células endocrinas (Eisenbarth, 2004), y existen comunicaciones intercelulares.

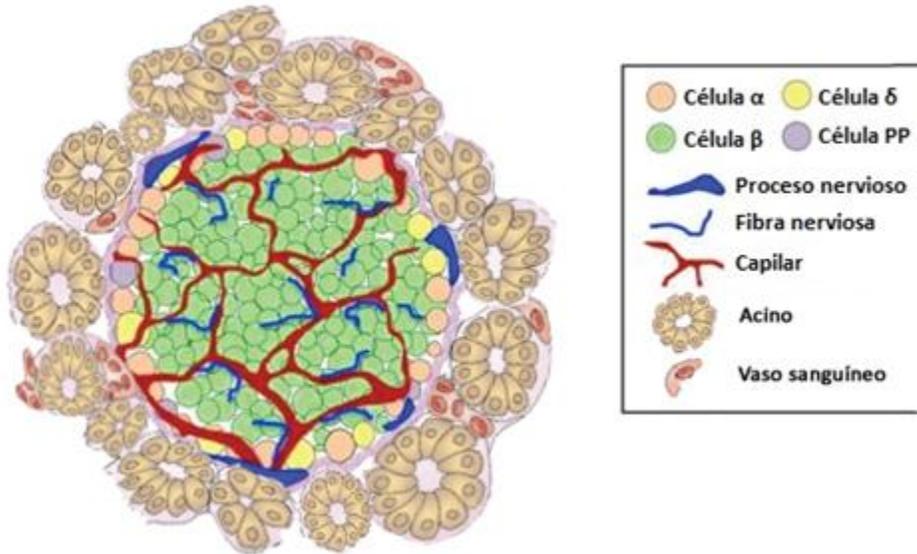


Figura 3. **Composición del Islote de Langerhans de ratón.** Adaptada de Reinert, 2014.

B. 2.2 *Arquitectura del tejido exocrino*

Los tipos celulares pancreáticos exocrinos comprenden el 90% de la masa celular parenquimal en el páncreas adulto. De la misma forma que las células del islote, las células acinares y ductales tienen un origen a partir de precursores pluripotentes, dentro del epitelio pancreático embrionario (Means, 2001).

La parte exocrina del páncreas consiste de células acinares, ductales y centroacinares. Las células acinares sintetizan y secretan enzimas digestivas, las cuales están concentradas en un fluido rico en bicarbonato que se transporta a través de un complejo de ductos. Los ductos terminales o intercalados tienen una superficie plana revestida por epitelio escamoso. Las células al final de los ductos terminales que interactúan con las células acinares son llamadas células centroacinares (Means, 2001).

B. 2.2.1 *Células acinares*

Las células acinares o acinos se caracterizan por tener una forma piramidal y ser grandes, llegan a medir hasta 30µm desde la parte apical hasta la parte basal. Su retículo endoplasmático rugoso se encuentra ampliamente concentrado, debido a su función de síntesis y secreción de enzimas digestivas (Han 1986) y poseen una gran cantidad de transcritos que codifican para enzimas proteolíticas como la amilasa, tripsina, elastasa, ribonucleasas, lipasas, fosfolipasas y

carboxipeptidasa A (Rutter, 1968; Jorgensen, 2007); una vez sintetizadas estas enzimas son organizadas en la región apical dentro de gránulos de secreción.

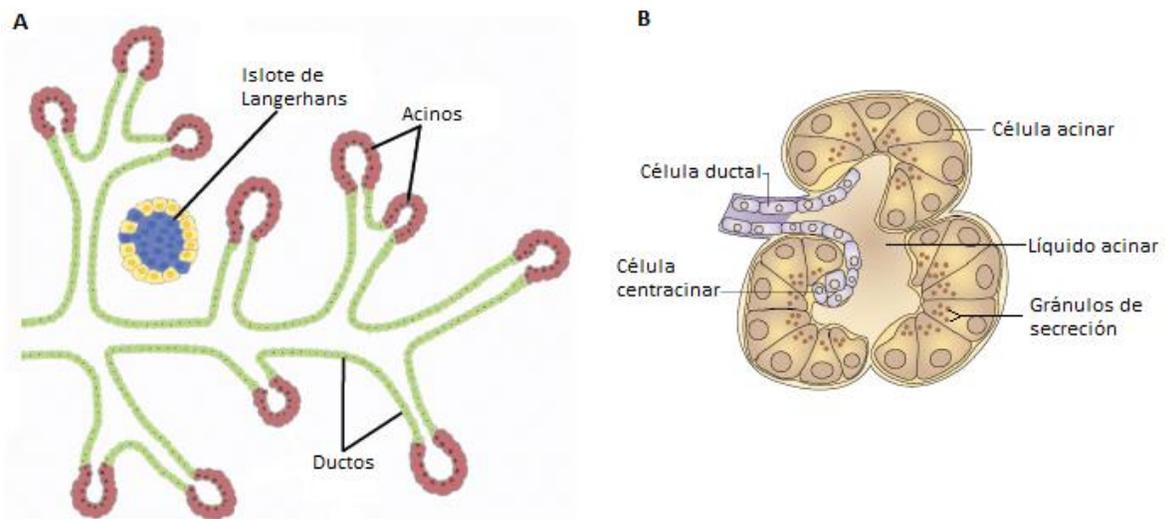


Figura 4. (A) Acinos pancreáticos ubicados en el sistema ductal. (B) Composición del acino pancreático. Adaptada de Cano *et al*, 2007, Bardeesy y DePinho, 2002.

B. 2.2.2 Células ductales

Las células epiteliales ductales contenidas en el árbol epitelial de los ductos tienen como funciones principales secretar fluido rico en bicarbonato con el fin de diluir y optimizar el pH del concentrado de enzimas secretado por las células acinares, y transportar esta solución al lumen intestinal. Los ductos se encuentran clasificados según el tamaño y posición dentro del árbol epitelial ductal. Los ductos intercalados se unen para formar ductos intralobulares (revestidos por epitelio cúbico), y estos a su vez se unen para formar ductos interlobulares, los cuales finalmente se fusionan para formar el ducto principal (cubierto por epitelio columnar simple) que pasa a lo largo del páncreas hasta el duodeno, donde el fluido con las enzimas digestivas es vertido (Reichert, 2011).

Las células ductales expresan marcadores como anhidrasa carbonica II (CAII) y factores transcripcionales como Sox9, Hnf1 β y HNF6 (Reichert, 2011), citoqueratina 19 (CK19), así como otras citoqueratinas las cuales pueden ser específicas de la especie.

De manera simplificada las células ductales terminales muestran una forma aplanada, con poco citoplasma, mientras que las células ductales más centrales tienen una forma cuboidal, y una región mitocondrial más densa. Además de estas diferencias las células ductales también muestran una heterogeneidad en la expresión de factores de transcripción como Sox9, Hnf1 β y HNF6 a lo largo del ducto epitelial, sin embargo aún se desconoce la razón.

B. 2.2.3 Células centroacinares

Uno de los tipos celulares más intrigantes son las células centroacinares ya que se ubican en el límite de las células acinares y el epitelio ductal, presentan características de epitelio ductal, pero se encuentran replegados dentro del epitelio acinar, por lo que no está claro si las células centroacinares forman parte de las células ductales terminales o pertenecen a otro tipo celular, e incluso si posiblemente alberguen múltiples tipos celulares (Leeson, 1986). A diferencia de las células acinares, las células centroacinares son comúnmente menores a 10µm de diámetro y contienen poco citoplasma (Cleveland, 2012).

Debido las características morfológicas y ubicación de este tipo de células, algunos estudios las han propuesto como una fuente de células progenitoras multipotentes en el páncreas adulto (Seymour, 2007; Hayashi, 1999; Gasslander, 1992; Stanger, 2005), además, en modelos de daño pancreático como pancreatectomía parcial y daño por la administración de estreptozotocina, se ha demostrado que proliferan rápidamente (Hayashi, 1999 y 2003; Seymour, 2007; Nagasao, 2005).

El origen de las células centroacinares se desconoce aún, en parte por la falta de marcadores específicos, así como el desconocimiento que se tiene sobre la heterogeneidad celular que posiblemente tiene lugar dentro de la posición centroacinar (Cleveland, 2012), sin embargo algunas de estas células se ha revelado que expresan Sox9, el cual se encuentra también en células progenitoras durante el desarrollo pancreático.

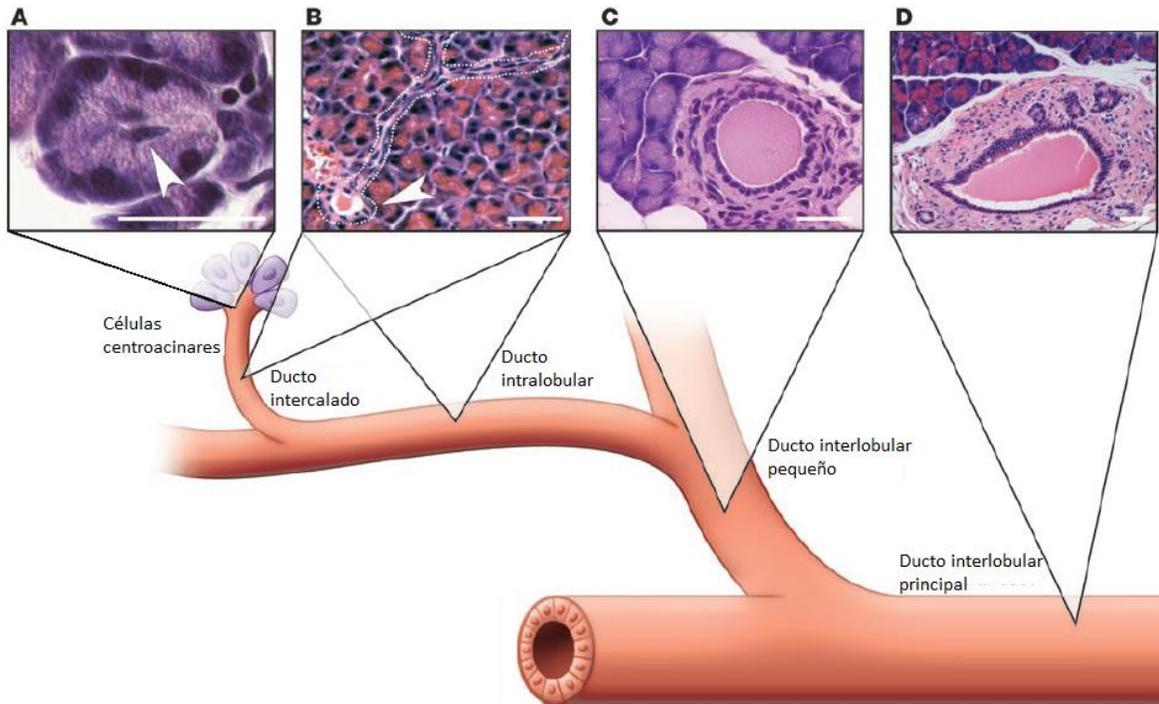


Figura 5. Organización anatómica del árbol ductal pancreático. (A) Células centroacinares son células ubicadas al final de los ductos, donde se encuentran con los acinos (flecha blanca, escala a 10 µm). (B) Ductos terminales o ductos intercalados (línea punteada), están compuestos de epitelio plano y se superpone dentro de los ductos intralobulares (flecha blanca) cubiertos por epitelio cúbico (escala a 10 µm). (C) Ductos intralobulares convergen para formar ductos interlobulares pequeños rodeados por mesénquima (escala a 10 µm). (D) Ductos interlobulares principales son cubiertos por epitelio columnar (escala a 10 µm). Adaptada de Reichert, 2011.

B. 3. Desarrollo Pancreático

Uno de los modelos animales donde se tiene mejor descrito el proceso de morfogénesis pancreático es el ratón, el cual ha sido de gran importancia para entenderlo en el humano ya que es muy semejante. Durante la morfogénesis del páncreas en el ratón, se activa un complejo programa molecular altamente orquestado que controla la distribución de las células progenitoras hacia células de linajes exocrino, endocrino y ductal. Los primeros eventos que regulan el desarrollo de las regiones endodérmicas donde se dará origen al páncreas, son mediados tanto por señales extrínsecas provenientes del mesodermo contiguo, como por programaciones intrínsecas que son controladas por factores expresados dentro de las mismas células del endodermo (Pan & Wright, 2011).

La formación del páncreas en el ratón inicia alrededor del día embrionario E9, cuando dos rudimentos, uno dorsal primero y otro ventral después, se hacen visibles en la zona del endodermo del intestino primitivo que dará lugar al duodeno (Barbera & Gasa, 2007). Para el

rudimento dorsal, las señales inductivas son derivadas del mesodermo durante la gastrulación, después las señales permisivas son dadas por la notocorda, la aorta dorsal y finalmente las señales proliferativas por el mesénquima pancreático. En el caso del rudimento ventral, su desarrollo está dirigido por distintos grupos de señales provenientes del mesodermo lateral, el mesodermo cardiaco y el *septum transversum*.

La formación del páncreas en el roedor se divide comúnmente en dos etapas de desarrollo. La primera etapa, conocida como transición primaria ocurre entre el E9.5-E12.5, y está determinado por un cambio morfogenético drástico en el epitelio pancreático. En esta etapa hay una proliferación activa de los progenitores pancreáticos para generar un epitelio estratificado, que dará origen al crecimiento del árbol epitelial.

En esta fase del desarrollo aparecen las primeras células endocrinas en diferenciarse en el primordio dorsal, principalmente células positivas a glucagón (Pictet *et al.*, 1972; Herrera, 2000; Kesavan *et al.*, 2009; Villasenor *et al.*, 2010). El páncreas exocrino empieza a diferenciarse hacia el día 14.5 y en el día 15.5 los acinos ya son claramente distinguibles de los ductos. Aunque poco se sabe de la diferenciación de las células ductales, se tiene claro que al día E12.5 los precursores ductales pueden notarse.

Hacia el día 10.5 se inicia el crecimiento y ramificación del epitelio de los dos primordios pancreáticos, los cuales entre el día E13 y E14 sufren una reorientación y se fusionan en un único órgano bipolar (Barbera & Gasa, 2007).

Aproximadamente en el día E12.5 comienzan los procesos de morfogénesis y remodelación en el epitelio pancreático protodiferenciado, así como su compartimentalización. El epitelio comienza segregarse en dominios extremos, donde yacen las células progenitoras que se diferenciarán a células acinares y dominios troncales que constan de progenitores endocrino-ductales (Zhou *et al.*, 2007).

Al día E13.5, comienza la segunda transición, en la que hay una ola de diferenciación masiva y una distribución hacia los tres principales linajes.

Las células acinares que son originadas del epitelio de los dominios extremos poseen una gran actividad proliferativa, incrementando su número para la formación del órgano. En tanto las células endocrinas surgen a partir de células progenitoras endocrinas comprometidas presentes en el epitelio del dominio troncal, también conocido como ducto primitivo, donde las células

endocrinas son difundidas por delaminación, a través de la transición epitelio-mesénquima (Rukstalis & Habner, 2007).

Un vez que las células endocrinas abandonan el epitelio, se unen en agrupamientos de células endocrinas, formando islotes poco maduros, que generalmente permanecen próximos o incluso relativamente asociados con uno o más de sus ductos de origen.

Al finalizar la transición secundaria aproximadamente en el día E16, el epitelio pancreático se expande más debido a la proliferación de las células acinares, por su parte las células endocrinas empiezan a agruparse en islotes

Es hasta poco antes de nacer (E18-E19) que los islotes están plenamente formados. La maduración final del islote se da durante las primeras semanas de nacimiento. En el ratón adulto, los islotes maduros se caracterizan por tener las células β esencialmente en el centro, rodeadas por los demás tipos celulares (Pan & Wright, 2011).

Aproximadamente el 80% de la masa celular endocrina presente en el nacimiento es generada por neogénesis a través de la proliferación y diferenciación de células progenitoras endocrinas contenidas en el epitelio ductal, y el otro 20% proveniente de la proliferación de células del islote. Después del nacimiento, el mecanismo predominante para el mantenimiento de la masa del islote es la autoreplicación, existiendo un periodo corto de proliferación para las células β observado en las primeras cuatro semanas de vida posnatal y un amplio periodo después del destete, pero en menor proporción, y que continuará disminuyendo con el tiempo (Bouwens & Rooman, 2005).

En el tejido acinar también hay presencia de diferenciación, maduración y proliferación de las células acinares después del nacimiento, con el fin de compensar el crecimiento corporal, sin embargo esto disminuye antes del destete (Desai *et al.*, 2007; Salpeter *et al.*, 2010).

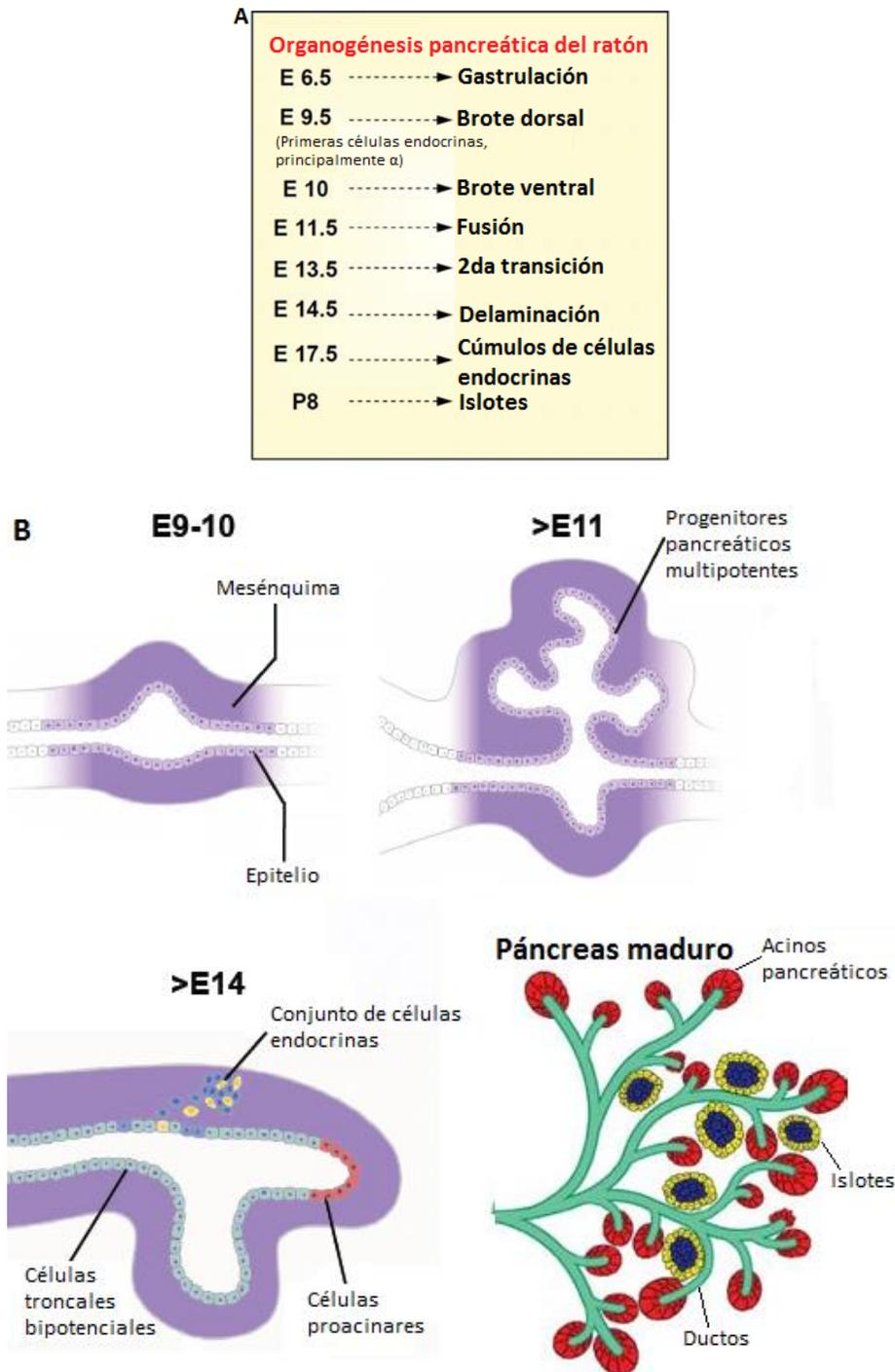


Figura 6. (A). Principales etapas del desarrollo pancreático. Adaptada de Pan, 2011. (B). Desarrollo del páncreas. E9-10. El desarrollo comienza aproximadamente en el E9, con la aparición del rudimento dorsal y ventral por señales extrínsecas. En el E9.5 comienza la transición primaria, caracterizada por presentarse un epitelio estratificado y primeras células endocrinas. En el E10.5 hay crecimiento y ramificación del epitelio. Cerca del final de la primera transición los brotes se fusionan y las células comienzan a protodiferenciarse. En el E14, ya ha comenzado la segunda transición con la delaminación de epitelios y la diferenciación hacia linajes endocrinos y exocrinos. La morfogénesis del páncreas termina aproximadamente en el E19 y su maduración poco después del nacimiento. Adaptada de Cano *et al*, 2007.

B. 4. Factores de señalización en la morfogénesis pancreática

Es por medio de cambios coordinados en la regulación de factores de transcripción dirigidos positiva o negativamente sobre la expresión de genes específicos, que las células precursoras se definen y funcionan con respecto a su linaje.

En el principio de la formación del tejido endodérmico, del cual deriva el páncreas, participan señales inductivas originadas del mesénquima que lo rodea, las moléculas que participan en este proceso incluyen a FGF4 (Fibroblast growth factor), BMP (Bone morphogenic protein), Wnt, ácido retinoico, Hedgehog y Notch.

Una vez que el endodermo pancreático es recién especificado, comienzan a expresarse factores de transcripción cruciales para el desarrollo pancreático. Pdx-1 (Pancreatic and duodenal homeobox-1) es considerado el factor central que comienza el complejo de señalización y regulación transcripcional que dirigen la proliferación, expansión y diferenciación de todos los linajes del páncreas. Pdx-1 es expresado en el endodermo prepancreático al día E8.5, y su expresión y mantenimiento continúa mucho después en las células β (Pan & Wright, 2011).

Otro factor importante expresado en el endodermo prepancreático, antes de que se inicie la formación de los primordios, es Hb9 o Minx 1, el cual al día E8 es expresado dentro en la notocorda y en ambos brotes pancreáticos (Li *et al.*, 1999; Harrison *et al.*, 1999), siendo esencial en la formación del brote dorsal.

B. 4.1 Factores de señalización pro-endocrinos

Pdx-1, Neurogenina 3, NeuroD, Hnf6, IA-1 contribuyen a la proliferación, diferenciación y compromiso hacia el linaje endocrino (Murtaugh, 2003). Neurogenina 3 es el factor pro-endocrino clave, actuando a modo de interruptor de la cascada transcripcional que define la formación de células endocrinas del islote. Aunque su expresión es transitoria, decayendo al día E15.5 hasta niveles muy bajos, otros factores activados directa o indirectamente por Neurogenina3 continúan y finalizan el proceso de diferenciación endocrina iniciado.

En esta etapa de determinación del subtipo endocrino, caracterizada en la segunda transición, los factores que participan en paralelo o río abajo de Neurogenina3 son para las células β : Pax4, IA-1, Nkx2.2, Nkx6.1, Pdx-1, Maf A, Hlxb9, Foxa1 y Foxa 2, mientras que para las células α son: Arx, Brn4, MafB, Irx1 y 2, Nkx2.2 y Pax6. Para el resto de las células endocrinas se tienen caracterizados

muy pocos factores, sin embargo, en células delta hay expresión de Pdx-1, células pp son positivas a Arx y células épsilon a Pax4 y Nkx2.2 (Barberá & Gasa, 2007).

B. 4.2 Factores de señalización pro-exocrinos

La especificación del linaje exocrino está dada tanto por la ausencia de factores de transcripción y por la presencia de señales permisivas aportadas por el mesénquima pancreático contiguo. La diferenciación acinar durante el desarrollo es regulada por el factor de transcripción bHLH y Ptf1a. Ptf1a es expresado tempranamente al día E9.5 en la mayoría de las células de los brotes pancreáticos nacientes, y es esencial en la organogénesis del páncreas en el ratón y el humano (Kawaguchi *et al.*, 2002; Krapp *et al.*, 1998; Sellick *et al.*, 2004), también regula el destino de los progenitores hacia los linajes celulares pancreáticos, después su expresión es confinada hacia la diferenciación de células acinares y células acinares maduras (Burlinson *et al.*, 2008).

Otros factores que participan en la diferenciación de las células acinares son GATA4, Mist1 y Nr5s2.

En el caso de los ductos pancreáticos Gu *et al.*, 2002 mostró que estos emergen de células que expresan Pdx-1, lo que demuestra que células positivas a Pdx-1 no endocrinas muestran características físicas de ramificación ductal comenzando la etapa E13.5, donde pierden la expresión de Pdx-1 para posteriormente ser positivas a CK19, Hnf1b, Hnf6, Foxa 2 y Sox9. Sin embargo, en el caso de Sox9 la expresión en páncreas de ratones adultos y humanos está restringida a células centroacinares y células ductales terminales, de donde pueden diferenciarse células a un linaje endocrino ante un daño (Furuyama *et al.*, 2011; Kopp *et al.*, 2011).

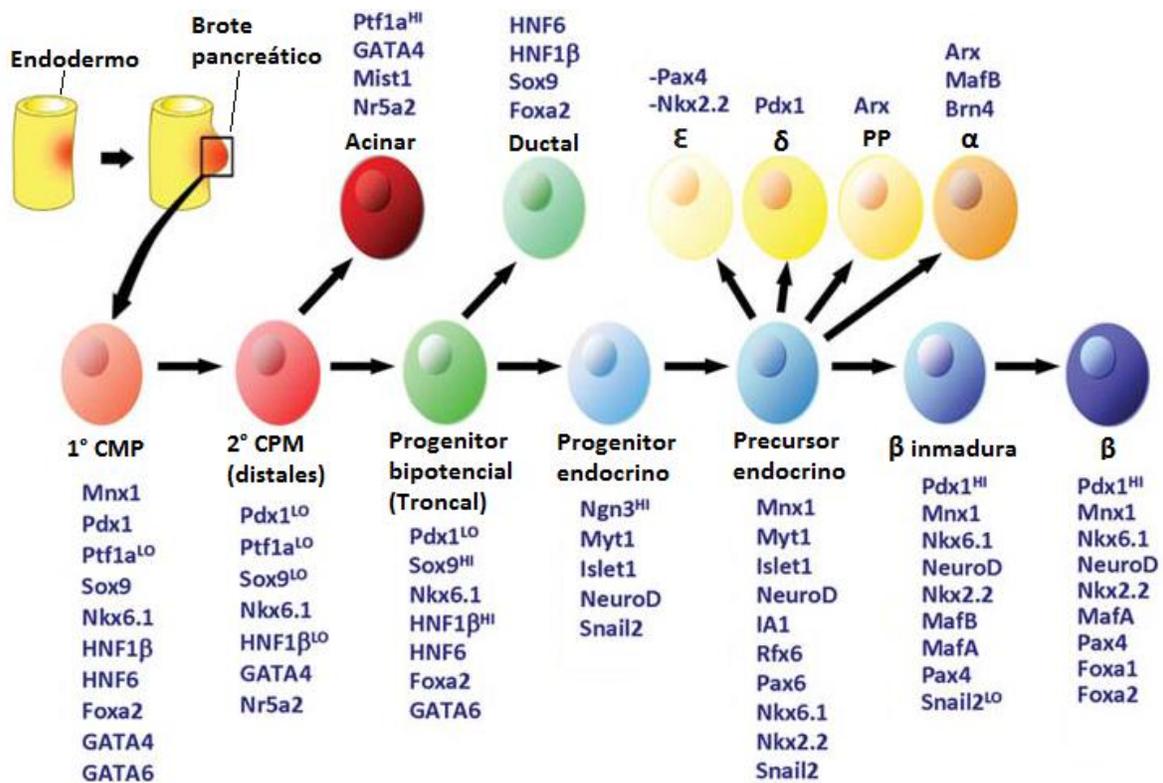


Figura 7. Factores de Transcripción pancreáticos. Principales Factores de Transcripción expresados durante el desarrollo del páncreas, los cuales determinan la especificidad de los distintos linajes pancreáticos celulares. *CPM (Células Progenitoras Multipotentes). Adaptada de Pan & Wright, 2011.

B. 5. Programación metabólica y Ventana crítica

La programación metabólica, se entiende como el mecanismo en el cual eventos en la vida temprana inducen, suprimen o dañan el desarrollo y función de los órganos a largo plazo, como respuesta a señales endógenas inducidas durante la ventana crítica (Lucas A., 1991)

La ventana crítica es definida por Lucas A. (1998) como un periodo de cambios estructurales y funcionales importantes durante el desarrollo normal de un órgano, cuando se expone a ciertos cambios ambientales, los cuales pueden originar consecuencias en la vida adulta. Tales consecuencias pueden resultar positivas para su buen funcionamiento en la vida, o adversas, como predisposición a condiciones crónicas en el adulto, como la diabetes mellitus tipo 2, enfermedades renales y cardiovasculares, así como obesidad en la niñez.

Las señales y cambios que ocurren durante el desarrollo embrionario en el tejido pancreático no son exclusivas de esta etapa, aun en el periodo post natal se mantienen señales que representan modificaciones en el órgano pancreático, especialmente en tejido endocrino, que son relevantes

para la correcta maduración tanto estructural como funcional de los islotes, estas etapas comprenden el nacimiento, la lactancia, y el destete.

Específicamente en el destete se experimenta un periodo de desarrollo vulnerable, al que se le ha identificado como una ventana crítica, ya que se presenta un cambio nutricional drástico en la dieta del individuo, pasando de una dieta rica en lípidos dada por la leche materna, a una dieta rica en carbohidratos (Schwitzgebel *et al*, 2009), con lo cual se sufren modificaciones en el desarrollo final del islote.

En los roedores esta ventana crítica se mantiene después de 21 días del nacimiento, es decir la etapa de lactancia, la cual según McCance (1962) se mantiene durante las primeras semanas de vida, periodo en el que las modificaciones tienen un amplio efecto sobre la programación metabólica.

Estudios en ratas reportan que a partir del día 21 al 28 post natal se produce un estado de hiperinsulinemia e hiperglicemia, el cual se asocia a un aumento en el número de células β y su incapacidad a responder a altas concentraciones de glucosa por su inmadurez funcional. Con respecto a lo reportado en la masa de células positivas a glucagón, se encontró que posterior al día 20 hay una disminución de éstas en la cabeza del páncreas, mientras que en el cuerpo y cola se observa un incremento particularmente en el islote y pequeños grupos dispersos de estas células, esto asociado a bajos niveles de glucagón en plasma (Aguayo-Mazzucato, 2006).

Actualmente se propone a la ventana crítica como un área de investigación importante para la epigenética, donde hay efectos en la programación, o cambios en la expresión de los genes a partir de la nutrición temprana.

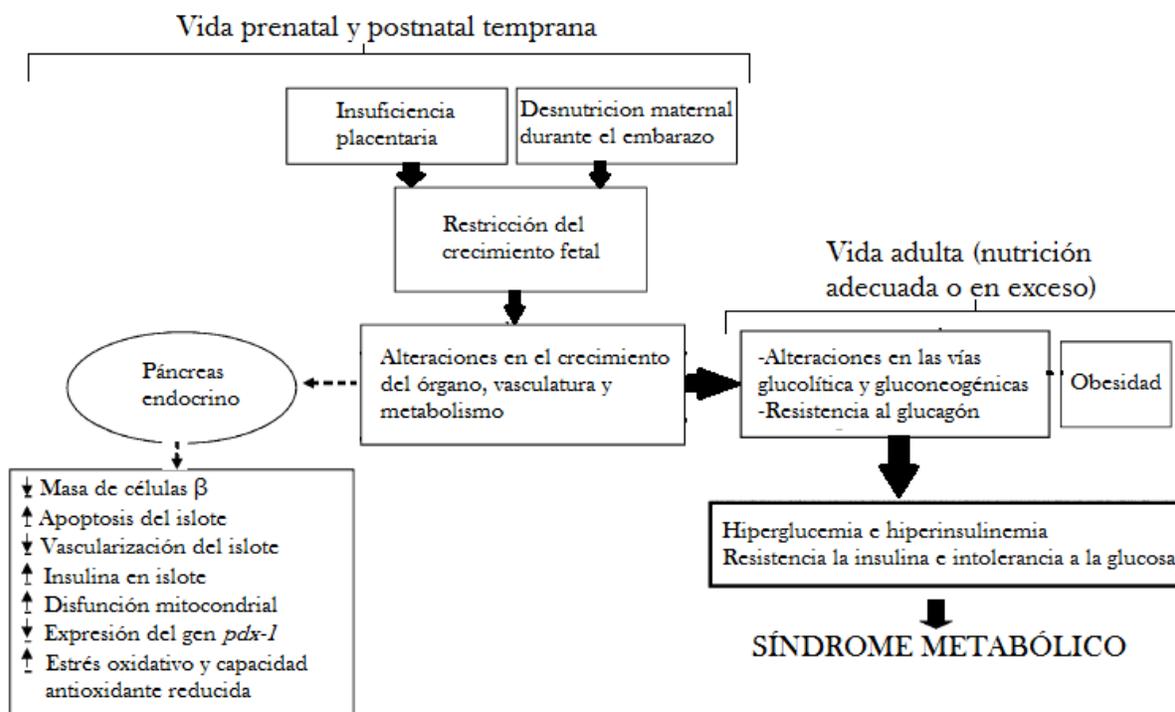


Figura 8. Representación esquemática sobre la programación metabólica y su influencia en el desarrollo de síndromes metabólicos. Modificada de Tarry-Adkins & Ozanne, 2011.

B. 6. Expansión del islote pancreático durante el desarrollo

Como se mencionó anteriormente, es durante la segunda transición en el desarrollo pancreático en el ratón que comienza la morfogénesis del islote en los dominios troncales, donde hay una expresión de hormonas endocrinas en células proendocrinas que formarán estructuras semejantes a islotes, o bien se unen a islotes ya existentes. Alrededor del día E18-21 (y durante las primeras semanas de vida) es donde tiene lugar la máxima formación y aparición masiva del apartado endocrino; este proceso de morfogénesis está dado por medio del mecanismo denominado como neogénesis. La neogénesis del islote se define habitualmente como la formación de nuevos islotes a partir de células precursoras o progenitoras no diferenciadas localizadas en el epitelio ductal (Bouwens, 2004). Estas células se caracterizan por tener una proliferación activa y expresión de citoqueratinas específicas como la CK19 y CK20, cualidades que van perdiendo gradualmente hasta su completa diferenciación.

Las células en transición son comunes en este período y coexpresan hormonas endocrinas del islote y citoqueratinas, y desaparecen hasta poco antes del nacimiento, para reaparecer únicamente en condiciones de daño pancreático o del islote (Bouwens, 2004).

En el caso de las células que aparecen en días anteriores al día E15 se desconoce si contribuyen a la formación de los islotes finales.

Estudios previos (Swenne & Ericksson, 1982) concluyeron que durante esta etapa del desarrollo la mayor parte de la masa de células β , hasta un 90% es originada por células progenitoras fuera del islote, en lugar de mitosis por células β que es aproximadamente 10% (Wang *et al.*, 1994), llegando a tener un incremento en el número de células del islote de más del 100% por día durante los últimos días de gestación (McEvoy & Madson, 1980). De la misma forma otros estudios en rata encontraron que, al día 17E, las células progenitoras fuera del islote positivas a CK20 forman grandes agregados, los cuales se encuentran proliferando, y posteriormente van perdiendo la expresión de CK20 desde el centro del islote hacia el manto, al mismo tiempo que las células del centro comienzan a expresar hormonas endocrinas en dirección al manto. El manto de células positivas a CK20 desaparece aproximadamente en el destete. Hasta este momento pueden encontrarse células coexpresando CK20/Insulina, después la expresión de CK20 es restringida a células ductales o células centroacinares (Bouwens, 1994; Bouwens, 1996). Al igual que en los roedores, en los humanos también han sido observadas células precursoras del islote con alta actividad de proliferación y expresando citoqueratinas particulares (CK19; Bouwens, 1995; Bouwens, 1998; Bouwens, 1998).

En el ratón, aproximadamente después del primer mes de vida, el páncreas toma una configuración adulta, presentando islotes y estructuras ductales bien definidas. En el resto de su vida adulta la presencia de células con marcadores endocrinos en los ductos es prácticamente nula, y pocas células tienen actividad mitótica, finalizando la generación de nuevos islotes (Gu, 1993).

B. 7. Mantenimiento posnatal del islote

El papel que lleva a cabo el tejido endocrino pancreático es de gran relevancia para la regulación del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. Uno de los tipos celulares de mayor interés en el islote es la célula β , debido a que sintetiza la hormona insulina que actúa en todas las células del cuerpo, permitiendo la entrada de glucosa a las células, La disminución en su producción o liberación puede conducir a síntomas de diabetes. Para combatir o evitar este síndrome es importante mantener una adecuada masa de células β que lleven a cabo una correcta función.

En la actualidad es bien aceptado que la célula β es dinámica y capaz de ajustarse ante cambios en la demanda metabólica, tanto en condiciones fisiológicas como en condiciones patológicas.

Ejemplo de esto es el incremento de la masa celular β a través de la vida en correlación al peso corporal (Montanya, 2000). Sin embargo son muchos los factores que provocan un gran estrés a las células β y que sobrepasan su capacidad de resistencia, principalmente caracterizados por un aumento en la demanda metabólica (como la obesidad, el embarazo o la resistencia insulínica) ocasionando daños irreversibles en su desempeño.

Los mecanismos principales que participan en la remodelación de la masa celular endocrina y principalmente la masa de células β (por encontrarse en mayor proporción y ser más susceptibles), en respuesta a un estímulo, son la proliferación, hipertrofia, neogénesis y apoptosis; en conjunto contribuyen determinando el aumento o reducción en la masa celular a lo largo de la vida.

B. 7.1 Proliferación

La proliferación celular o replicación es el proceso por el cual una célula da origen a dos células hijas aumentando su número en un tejido que se encuentra en desarrollo o bien que entra en un estado de regeneración.

En condiciones normales de un adulto, se ha encontrado que las células β en el islote pancreático, tienen un índice de regeneración de 3% solamente (Dor, 2006) con un número limitado de divisiones por célula para toda la vida del individuo, este índice disminuye con la edad y aunque esta capacidad es baja se ha reportado que es capaz de sostener una población celular que secreta insulina en cantidades adecuadas para un individuo sano (Hellerström & Swenne, 1991). Sin embargo algunos autores como Bonner-Weir (2008, 2010), Bouwens (1998, 2005) y Davani (2007) señalan que este mecanismo no es suficiente para sostener el mantenimiento del islote y de las células β y por lo tanto participan otros mecanismos que producen células endocrinas nuevas a partir de células indiferenciadas.

Por otro lado en individuos con diabetes la proliferación de células β preexistentes es insuficiente, ya que además de presentar problemas en la secreción y/o sensibilidad a la insulina, puede haber una destrucción de ellas, así como un daño en las células restantes.

B. 7.2 Hipertrofia celular

Esta condición se caracteriza por el incremento en el tamaño de las células β , lo cual se ve reflejado en el tamaño del islote, y aparece como consecuencia de la falta de división celular en el tejido, ante un aumento en la demanda funcional o por una estimulación específica. En individuos adultos con daño metabólico como la diabetes, las células β con hipertrofia tienen un aumento en su capacidad funcional, produciendo y liberando más insulina con el fin de seguir manteniendo

una correcta homeostasis, sin embargo esto es sólo por un periodo de tiempo, ya que después las células hipertróficas no son capaces de soportar la carga, ocasionando cambios degenerativos y muerte celular.

B. 7.3 Muerte celular

La muerte de la población celular del islote está dada por apoptosis y necrosis. En el individuo adulto, la muerte celular sobre un tipo en particular como la célula β , afecta su proporción dentro del islote, así como su masa total, provocando deficiencias en su funcionamiento. Otro efecto observado dentro del islote a nivel morfológico, es el aumento en la masa de los otros tipos celulares. Durante el periodo neonatal en los roedores, que se caracteriza por un alto índice de replicación y neogénesis, hay también un breve lapso de aumento en la apoptosis (Bonner-Weir *et al.*, 2010; O'Brien *et al.*, 2002).

B. 7.4 Neogénesis

La neogénesis, es el proceso considerado responsable de la morfogénesis de los islotes durante la etapa de desarrollo embrionario y neonatal. A partir de células indiferenciadas provenientes de la región ductal, que comienzan a expresar marcadores endocrinos, al mismo tiempo que migran, forman agregados celulares lo que da lugar a los islotes pancreáticos.

En el ratón, el páncreas toma una configuración adulta con islotes bien definidos y separados de estructuras ductales alrededor de las 2-3 semanas de edad, una vez que los animales pasaron el periodo de post-ablactación (Gu & Sarvertnick, 1993).

Aunque actualmente hay evidencia de que en el páncreas de roedores adultos existe la presencia de células remanentes o células madre con capacidad de diferenciación que dan origen a células endocrinas ubicadas en los ductos (Barberá & Gasa, 2007), contribuyendo principalmente con la población de las células β , aunque aún se considera debatible su existencia, ubicación, aportación en la masa celular y las condiciones en las cuales se lleva a cabo este proceso.

Investigaciones realizadas desde comienzos del siglo pasado han expuesto que la regeneración acinar y del islote ocurría después de la obstrucción de un ducto pancreático (Shaw *et al.*, 1926). A partir de 1947 se encontró que el daño pancreático, especialmente en las células β por aloxano en ratas (Hughes, 1947), causaba la pérdida de islotes, seguida de una fase de regeneración, esto también se observó con la administración de estreptozotocina (Cantenys *et al.*, 1981). Además Gu y Savertnick, 1993 evidenciaron la distinguida habilidad de regeneración endocrina mediante la neogénesis en modelos de ratones transgénicos con el gen IFN- γ sobre-expresado unido al

promotor de insulina, señalando la similitud entre la neogénesis inducida de la neogénesis durante el desarrollo embrionario.

Análisis morfológicos del páncreas sugieren que las células progenitoras residen en los ductos. Un estudio de trazado de linaje y la ligación ductal en ratones adultos hecho por Xu y su equipo de trabajo (Xu, 2008) demostró que la neogénesis de células β es acompañada de la inducción de Ngn3 en células progenitoras endocrinas en la porción del ducto ligado, pero no en la porción no dañada del páncreas. A estos experimentos se suman otros, hechos en modelos de daño pancreático (Lee, 2006) y trazado de linajes (Bonner-Weir, 2008) que también han indicado la existencia de células no diferenciadas en los ductos que originan células β , apoyando así la neogénesis de los islotes ocurrida en el desarrollo normal (durante las primeras semanas) y en respuesta a una señal de estrés o daño físico y fisiológico.

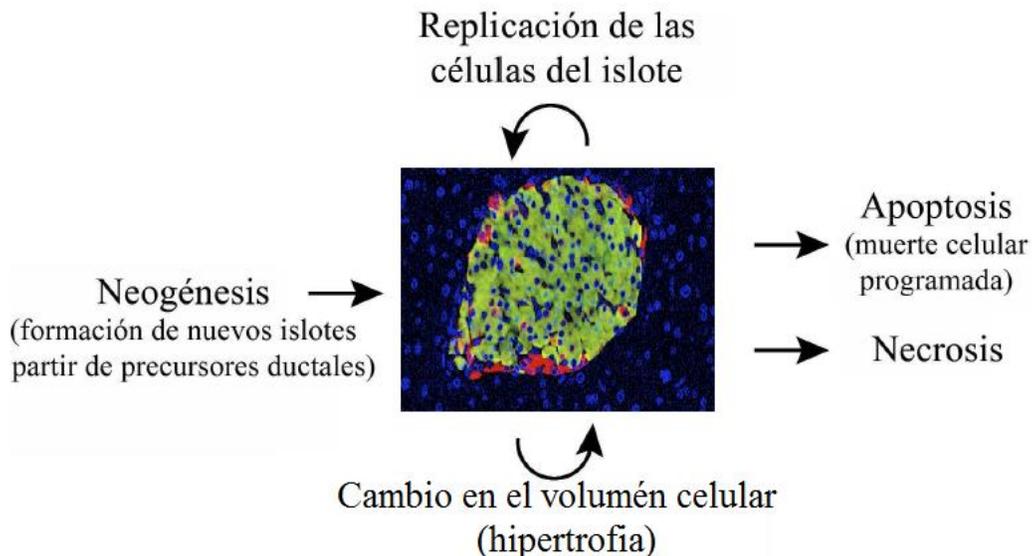


Figura 9. Mecanismos de remodelación pancreática. En conjunto estos mecanismos contribuyen a regular el contenido celular endocrino. Adaptada de Barberá y Gasa, 2007.

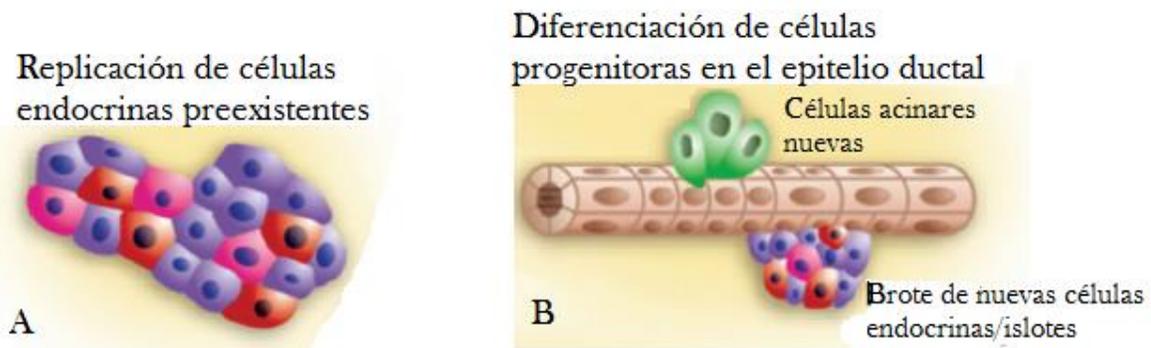


Figura 10. Principales mecanismos observados en modelos de regeneración del islote. (A) Replicación de células de linaje endocrino. (B) Neogénesis, generación de nuevas células endocrinas a partir de células no diferenciadas ubicadas en los ductos. Adaptada de Bansal *et al.*, 2013.

B. 8. Proteínas de regeneración asociadas a la neogénesis

La familia de proteínas de regeneración conocida como Reg, que comprende proteínas lectina tipo C, fueron descubiertas independientemente en el desarrollo de la pancreatitis y en modelos de regeneración del islote pancreático (Parikh, 2012).

Los miembros de la familia Reg, están asociados a diversas patologías que incluyen a la diabetes y ciertas formas de cáncer gastrointestinal. Tienen un papel clave como proteínas anti-inflamatorias, anti-apoptóticas, y agentes mitogénicos en múltiples contextos fisiológicos y de padecimientos. Sin embargo, aún existe una gran falta de conocimiento en la regulación de la expresión de sus genes, además las vías relacionadas con su producción, sus moléculas diana, y su paso por otras vías de señalización.

El nombre Reg proviene de “regenerating islet-derived”, sin embargo no todas las proteínas están asociadas con la regeneración del islote. La designación de Reg fue dada debido a que la proteína Rat RegI (litostatina) fue redescubierta en una librería de cDNA hecha a partir de islotes regenerados que fueron aislados de páncreas de ratas parcialmente pancreatectomizadas y tratadas con nicotidamina adicionalmente, Reg no fue encontrado en islotes normales. Se concluyó que la expresión de este gen en la regeneración e hiperplasia del islote sugiere un posible rol en la replicación, crecimiento y maduración de células β (Kobayashi *et al.*, 2000). Con el tiempo otras proteínas Reg fueron encontradas en especies distintas, una de ellas, la proteína INGAP (islet neogenesis associated protein) fue aislada de un páncreas de hámster que fue sometido al procedimiento de envoltura en celofán, lo cual induce la formación de nuevos islotes a partir de los ductos pancreáticos (Rafaeloff *et al.*, 1997). Estudios con islotes neonatales tratados con INGAP identificaron 210 genes regulados por esta proteína, entre los que se encuentran algunos relacionados con la secreción y crecimiento de la célula β (HNF-3 β /Foxa-2, SUR1, IGF-1, insulina y glucagón (Barbosa H, 2006).

RegIII δ , también conocida como INAPrp es otra proteína encontrada en ratón con una similitud del 72.2% respecto a INGAP (Sasahara, 2000), compartiendo las mismas funciones, además de poder encontrarse en páncreas que no fueron sometidos a algún daño.

Sin embargo, aunque no está claro cuál es el proceso de regeneración de los islotes efectuado por Reg, todos los miembros, llevan a cabo uno en particular y su presencia es utilizada como marcador de neogénesis en el proceso de regeneración y expansión del islote.

C. Planteamiento del problema

Como se ha descrito anteriormente, eventos en la vida temprana pueden inducir cambios en el desarrollo y función de los órganos a largo plazo. Se ha documentado que las etapas tempranas de la vida son críticas en el desarrollo de la masa y la función de los islotes pancreáticos, los cuales permitirán mantener la homeostasis de la glucosa en etapas posteriores de la vida. Diversos estudios han encontrado que concentraciones farmacológicas de la vitamina biotina favorecen el metabolismo de glucosa y mejora el estado diabético, sin embargo, se desconoce si la biotina administrada en etapas tempranas de la vida tiene efectos protectores frente el desarrollo de la diabetes en la edad adulta. En un estudio previo se analizaron los efectos de la suplementación con biotina durante las primeras tres semanas después del destete (periodo de crecimiento de los ratones) frente a la inducción de daño de las células β pancreáticas en la etapa adulta, para lo cual ratones de la cepa Balb/c recibieron una dieta suplementada con concentraciones farmacológicas de biotina (108 mg biotina/kg dieta) o una dieta control (0.8 mg biotina/kg dieta) durante las 3 semanas posteriores al destete, a los cuales, concluido dicho periodo, se les administró dieta control hasta el final del experimento. Dos semanas después del cambio de dieta se indujo daño de las células β inyectando a los ratones estreptozotocina. Los resultados revelaron que los animales tratados con estreptozotocina que recibieron la dieta suplementada con biotina durante tres semanas tenían una mejor tolerancia a la glucosa, recuperación mayor del peso corporal, mayor secreción de insulina y proporción de células β que el grupo diabético control. Estos resultados indican que la suplementación con biotina durante etapas tempranas de la vida tiene un efecto protector ante el desarrollo de hiperglucemia y daño de las células β en la edad adulta. Sin embargo, se desconocen los cambios que produjo la biotina durante las etapas tempranas de la vida que permitieron a los islotes resistir este daño. Estudios en nuestro laboratorio se encuentran dilucidando el curso temporal de los mecanismos que pudiesen estar participando en esta protección. En esta tesis se plantea estudiar el efecto de la suplementación con biotina durante dos semanas, posteriores al destete, sobre el tamaño y la composición de células de los islotes, así como su capacidad de regeneración, analizando el proceso de neogénesis y la participación de la proteína RegIII δ .

D. Objetivo general

Evaluar los efectos de la suplementación por biotina durante etapas tempranas de la vida (dos semanas de tratamiento de la suplementación con biotina, posteriores al destete) sobre el tamaño y la composición de células de los islotes, así como su capacidad de regeneración, analizando el proceso de neogénesis y la participación de la proteína RegIII δ en el páncreas de ratones.

D.1. Objetivos particulares

Analizar los efectos de la suplementación con biotina sobre:

1. La tasa de crecimiento de los ratones y su tolerancia a la glucosa.
2. Los cambios morfológicos del islote, analizando el área promedio del islote, frecuencia en el tamaño de los islotes, número de células α y β por islote, así como su respectiva área, y tamaño promedio de células α y β .
3. La capacidad de expansión del islote pancreático por medio del número total de islotes positivos a neogénesis y del número de células α y β .
4. La expresión del factor RegIII δ como marcador de neogénesis.

E. Hipótesis

El aumento del número y tamaño de los islotes aunado a una mayor capacidad de regeneración por mecanismos de neogénesis, podrían participar en las modificaciones producidas por la dieta suplementada con biotina en la etapa temprana de la vida que le permitan enfrentar mejor procesos que dañan el islote en la edad adulta.

F. Material y Métodos

F. 1.1 Unidades de Experimentación

Como sujetos de experimentación se utilizaron 12 ratones hembras pertenecientes a la cepa BALB/cAnN Hsd, recién destetadas, es decir con una edad de 21 días; las cuales fueron repartidas en dos grupos experimentales denominados de acuerdo al tratamiento al que fueron sometidos. Uno de los grupos, se alimentó con la dieta usualmente usada en los bioterios (2018S Teklad Global 18% Protein Rodent Maintenance Diet, HarlanTeklad) que contiene 0.80 mg/Kg de biotina, la cual se designó como dieta control. El otro grupo se alimentó con la misma dieta pero suplementada con biotina a una concentración de 108 mg/kg, designada como dieta suplementada. Ambos grupos se les proporcionó la dieta respectiva durante un periodo de 2 semanas.

Los animales fueron manipulados y mantenidos en condiciones normales según los protocolos establecidos por el Comité de Ética para la Experimentación del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Durante los periodos de tratamiento se registró el peso de cada animal así como el peso del alimento cada día por medio de una balanza (Ohaus, Alemania), esto con el fin de medir el consumo de alimento y comparar pesos entre tratamientos.

Una vez finalizado el tratamiento los animales fueron puestos en un ayuno de 16 horas y anestesiados con Sevoflurane (Laboratorios Abbott México) para posteriormente extraer de cada ratón una muestra de sangre procedente de la vena cava inferior y el tejido pancreático, al finalizar esto, la eutanasia de los animales se dio mediante dislocación cervical.

F. 1.2 Dieta Control y dieta suplementada

Para la preparación de las dietas control y suplementada, y con el fin de mantener las mismas condiciones en ambas, se requirió el triturado y molido de la dieta 2018S Teklad Global 18% Protein Rodent Maintenance Diet, HarlanTeklad, la cual en el caso de la denominada dieta control no se alteró su composición original. En contraste a la dieta suplementada, a la cual se le añadieron 107.98 mg de biotina por kilogramo de dieta molida. Posteriormente mediante la adición de agua se formaron nuevamente los pellets de las dos dietas y se dejaron secar en una campana de extracción, para evitar su contaminación, finalmente se esterilizaron en una autoclave para su consumo posterior.

F. 1.3 Curva de tolerancia a la glucosa

Al finalizar el periodo experimental de dos semanas de administración de la dieta, se realizó una curva de tolerancia a la glucosa para la cual se mantuvo en un ayuno de 16 horas a los ratones y se les inyectó glucosa intraperitoneal a una dosis de 2g/Kg peso. Las muestras de sangre fueron tomadas de la vena caudal y las concentraciones de glucosa en sangre se midieron con un glucómetro (Precision QID, MediSense, Inc., Abbott Laboratories) antes de la inyección de glucosa y a los 15, 30, 60 y 120 minutos después de la inyección.

F. 1.4 Análisis inmunohistoquímico de páncreas

Los páncreas obtenidos de cinco ratones de cada grupo fueron fijados en paraformaldehído al 4% disuelto en buffer de fosfatos salino (PBS) durante 24 horas a 4° C. Posteriormente se mantuvieron en tubos eppendorf de 1.5 ml con únicamente solución de PBS, para su conservación y embebido en parafina (Paraplast) a 58° C, con lo que se formaron los bloques, a partir de los cuales se elaboraron cortes del tejido. Para cada páncreas las secciones de tejido se cortaron con un micrótopo a un grosor de 5 µm y después fueron montados en portaobjetos de vidrio que se recubrieron anticipadamente con Poly-L-lisina.

Los tejidos fijados se desparafinaron y rehidrataron introduciéndolos en soluciones de xilol y alcohol de diferentes grados, absoluto, 96°, 80°, 75°, 50°, después se realizó un lavado con solución PBS para conservar las condiciones fisiológicas de las células. Para la recuperación antigénica se llevó a cabo un lavado en buffer de citratos pre-calentado a 90° C, durante 10 minutos.

Posteriormente se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente con buffer de perforación (preparado con PBS, Tritón al 3% y suero normal de cabra al 1%) en una cámara húmeda.

En seguida se incubaron los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C. Se usó el anticuerpo primario polyclonal para la identificación de insulina de ratón producido en cobayo (Invitrogen) a una dilución de 1:150; el anticuerpo primario polyclonal para glucagón de ratón producido en ratón (Sigma) a una dilución 1:4000; y el anticuerpo primario policlonal para regIIIδ (INGAPrp) de ratón producido en conejo (Santa cruz).

A continuación se hicieron lavados con la solución PBS/SNC 1%, con el propósito de quitar el anticuerpo primario excedente y bloquear reacciones inespecíficas. Después se realizó la incubación del anticuerpo secundario para lo cual se utilizaron los anticuerpos anti-cobayo conjugado con FITC (Jackson Inmuno Research Laboratories) a una dilución de 1:200, anti-conejo y anti-ratón ambos conjugados con Cy3 (Jackson Inmuno Research Laboratories) a una dilución de 1:800. Al finalizar la incubación, las laminillas se lavaron con PBS e incubaron por 5 minutos con

DAPI a una dilución de 1:1000 para teñir los núcleos. Por último se cubrieron con medio de montaje (DAKO) y un cubreobjetos limpio.

Para la obtención de las imágenes se usó un microscopio Nikon Optiphot para epifluorescencia con una cámara digital Nikon Coolpix 4300. La edición de las imágenes y su análisis se llevó a cabo mediante el programa ImageJ 1.47v (National Institutes of Health, USA).

F. 1.5 Identificación de neogénesis

El análisis para la identificación de neogénesis se realizó de dos formas. En la primera se tomó en cuenta la distancia entre una estructura endocrina/islote y un ducto pancreático, considerando únicamente distancias menores a 5 células, En la segunda, se utilizó el marcaje de un anticuerpo para regIII δ , con el fin de identificar su presencia en el proceso de neogénesis a partir de ductos pancreáticos.

F. 1.6 Estadística

El análisis estadístico así como las gráficas de los resultados se realizaron con el programa GraphPad Prism 6.01v. Los datos de significancia P menores a 0.05 son resultado de una prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

G. Resultados

G. 1.1 Curva de crecimiento

El seguimiento del peso de los animales se dio cada día durante todo el periodo experimental con el fin de conocer el buen estado de crecimiento y desarrollo de los animales. En la siguiente gráfica se muestra una curva de crecimiento por grupos, control v.s. suplementado, presentado en porcentaje por cada día. Se puede observar que en ambos grupos hay un aumento de peso de casi un 60% al día 14, lo que equivale aproximadamente a 5gr, respecto al peso inicial. En el día 9 puede notarse una baja en el peso corporal del grupo suplementado, en comparación al grupo control, sin embargo al final del experimento los grupos no presentan diferencias estadísticamente significativas en su crecimiento (figura 11).

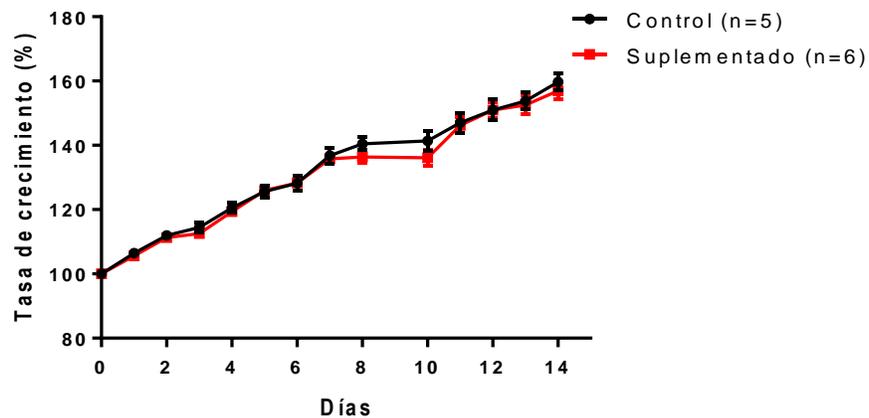


Figura 11. Curva de crecimiento. Se muestra el peso corporal expresado en porcentaje a lo largo del periodo de experimentación. Los grupos se muestran como control con una n=5 (negro) y suplementado con una n=6 (rojo). Los datos presentan la media \pm ES.

G. 1.2 Curva de tolerancia a la glucosa

Con el fin de comparar las concentraciones de glucosa en sangre entre ambos grupos y saber si la biotina tiene un efecto en la homeostasis de la glucosa, se realizó una curva de tolerancia a la glucosa en ayuno al finalizar el periodo de experimentación. No se observaron diferencias significativas en la curva a lo largo de los tiempos, se puede notar una pequeña tendencia del grupo suplementado a tener concentraciones ligeramente menores respecto al grupo control (figura 12), esto mismo es reflejado en el promedio de concentraciones de glucosa (figura 13), así como en el área bajo la curva (figura 14).

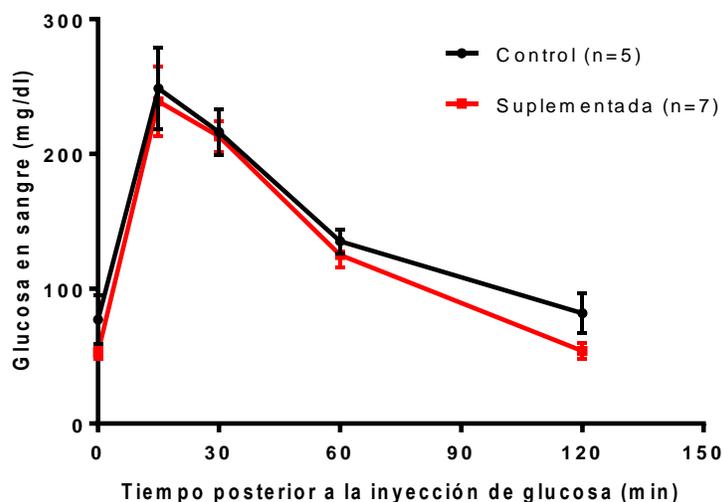


Figura 12. Curva de tolerancia a la glucosa. Para ambos grupos en condiciones de ayuno no se identificaron diferencias significativas. Los grupos se muestran como control con una n=5 (negro) y suplementado con una n=7 (rojo). Los datos se encuentran en mg/dl y presentan la media \pm ES.

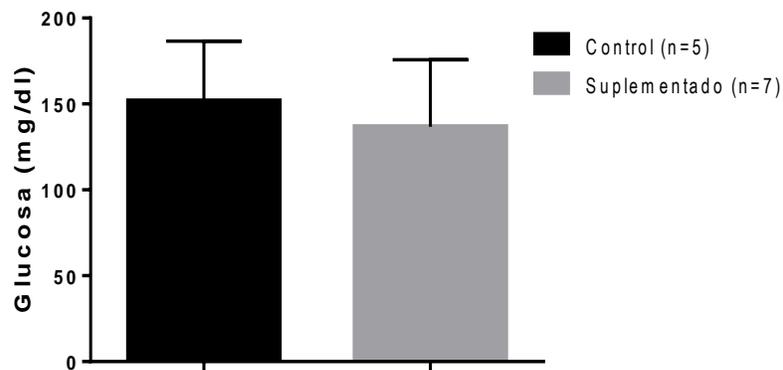


Figura 13. Concentración de glucosa en sangre. El promedio de la concentración de glucosa en sangre se obtuvo a partir de las concentraciones dadas en la curva de glucosa. No se presentan diferencias significativas. Los grupos se muestran como control con una n=5 (negro) y suplementado con una n=7 (gris). Los datos se analizaron mediante una prueba de Mann-Whitney, y se encuentran en mg/dl mostrando la media \pm ES.

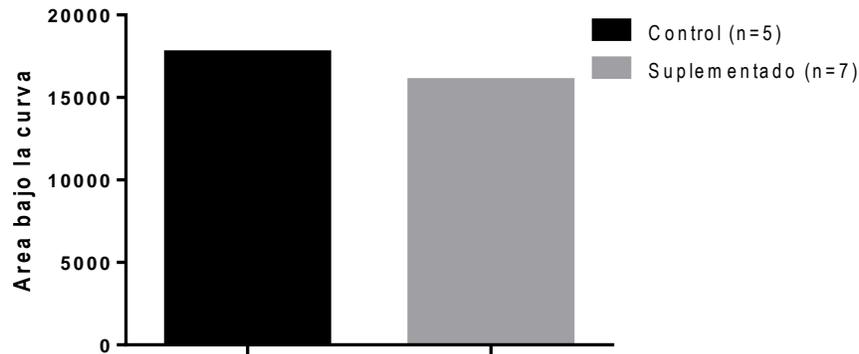


Figura 14. Área bajo la curva obtenida a partir de la curva de glucosa. No se encontraron diferencias significativas. Los grupos se muestran como control con una n=5 (negro) y suplementado con una n=7 (gris). Se presenta únicamente la media.

G. 1.3 Análisis histológicos: Morfología del Islote

A partir de cortes histológicos de páncreas en ambos grupos experimentales se realizó el análisis morfológico del islote, con el fin de determinar si hubo un aumento en la masa endocrina del grupo suplementado para lo cual se cuantificaron las siguientes variables: tamaño promedio del islote, número de islotes, fracción del área pancreática total, área de células α y β en el islote, distribución del tamaño de islotes y número promedio de células α y β por islote; para el análisis de la neogénesis se evaluó el número islotes cercanos a ductos, número de células α y β cercanas a ductos y mediante el marcaje de RegIII δ para identificar su participación en el proceso.

G. 1.3.1 Frecuencia de tamaño de islotes

Considerando el número total de islotes analizados para cada grupo se clasificaron por rango de tamaño y la frecuencia con la que estos se presentaban. Se observa que tanto el grupo control como el suplementado presentan islotes desde tamaños menores a $50\mu\text{m}^2$ hasta $55000\mu\text{m}^2$ aproximadamente, de la misma manera, la frecuencia en tamaños es similar, con pequeñas variaciones en el grupo suplementado, en donde se observa un leve aumento en islotes de $5000\mu\text{m}^2$ y $20000\mu\text{m}^2$ de tamaño (figura 15).

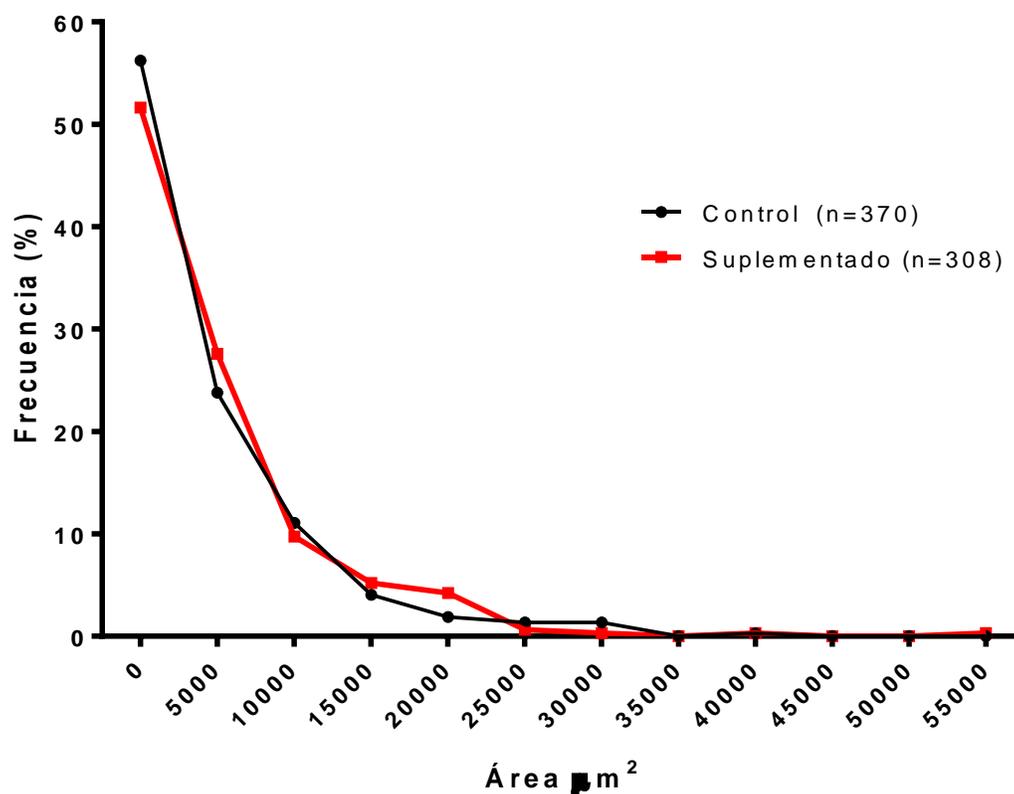


Figura 15. Distribución de frecuencias del tamaño de los islotes dadas en cada grupo. Los datos son expresados en frecuencia (%) por área (μm^2). Los grupos se muestran como control con una n=370 islotes (negro) y suplementado con una n=308 islotes (rojo).

G. 1.3.2 Tamaño promedio del islote

Se eligieron tres laminillas independientes y no seriadas de cada páncreas de ratón, de las cuales se cuantificó el área de cada islote encontrado y se obtuvo el promedio para cada grupo. En la figura 16B se puede observar el número total de islotes analizados por grupo y el área promedio en μm^2 de estos. El grupo suplementado presentó una diferencia significativa respecto al grupo control, revelando un incremento en el tamaño promedio de los islotes a pesar de tener un menor número de estos en el tejido pancreático.

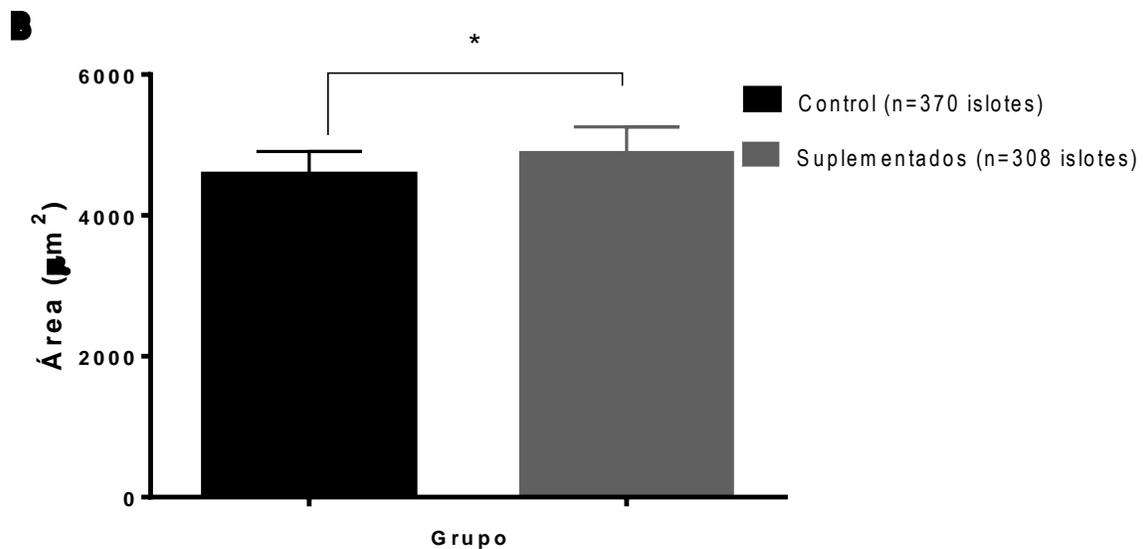
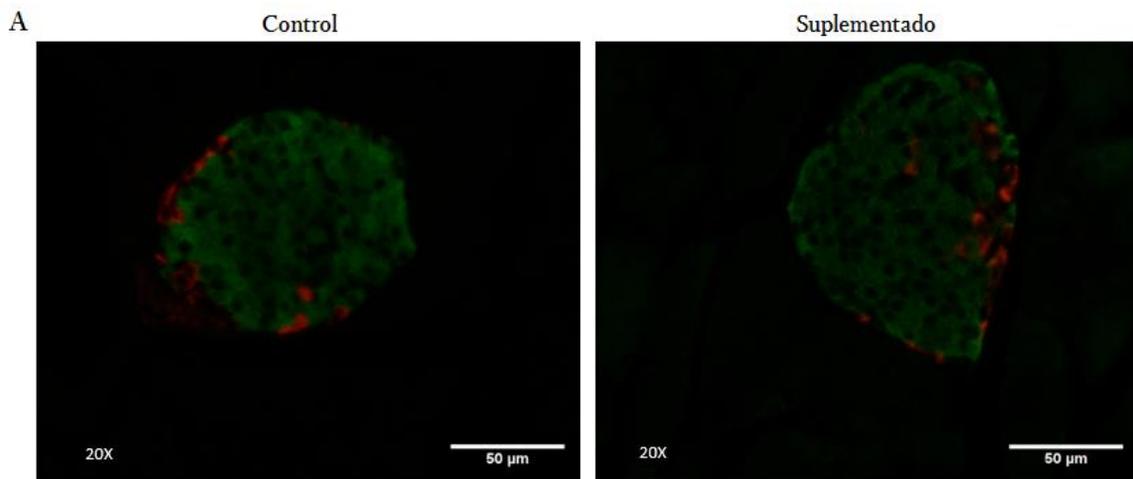


Figura 16. Tamaño del islote. Las imágenes representativas de inmunofluorescencia (A) correspondientes a los grupos mencionados muestran la morfología del islote con base en el área de insulina (verde) y glucagón (rojo). La escala es equivalente a 50 µm. En la gráfica (B) se presenta el tamaño promedio del islote. El grupo control contiene una n=370 (negro) y el suplementado una n=308 (gris). Los datos se analizaron mediante una prueba de Mann-Whitney resultando una significancia de $p \leq 0.05$ con respecto al grupo control. Los datos se presentan como la media \pm ES.

G. 1.3.3 Fracción del total del área pancreática

En ambos grupos se realizó la cuantificación del área ocupada por el islote, por las células β y por las células α respecto al área pancreática total, por medio del marcaje inmunohistoquímico de insulina, así como el marcaje de glucagón. Los resultados de las tres áreas, no muestran diferencias significativas entre los grupos estudiados (figura 17).

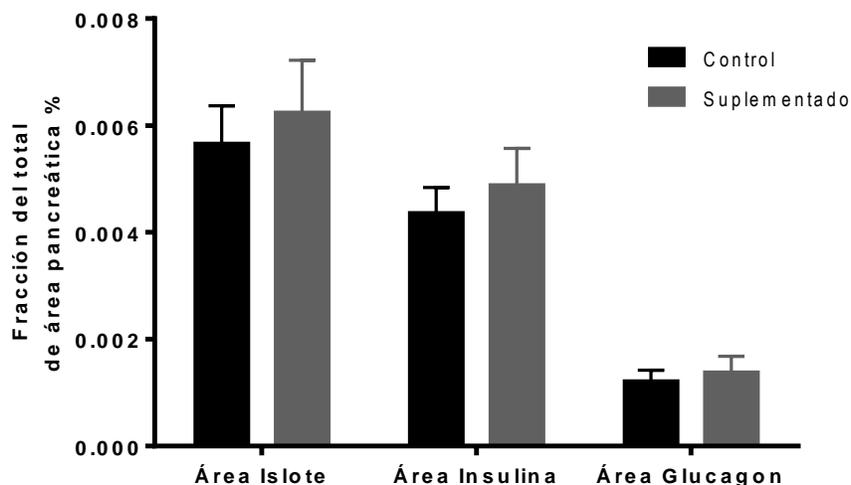


Figura 17. Fracción del área pancreática total. Los datos son expresados en porcentaje como el área de los islotes, de las células productoras de insulina y de las de glucagon cada una entre el área total del páncreas. Los grupos se muestran como control (negro) y suplementado (gris) para cada fracción. Se presenta la media \pm ES.

G. 1.3.4 Número de islotes por cada 10mm²

A partir del área total del páncreas y del número de islotes localizados en cada grupo, se determinó el promedio de islotes encontrados por cada diez milímetros cuadrados de tejido, resultando sin ningún cambio significativo en el número de islotes para ambos grupos (figura 18).

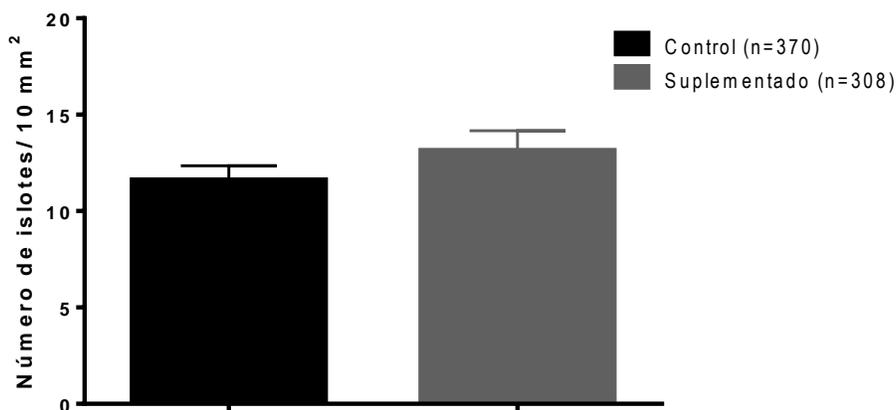


Figura 18. Número de islotes por área total del páncreas. Los grupos se muestran como control con una n=370 islote (negro) y suplementado con una n=308 islotes (gris). Los datos se analizaron por una t-Student no pareada y presentan la media \pm ES.

G. 1.3.5 Composición del islote: área de células α y β

Para examinar si la composición de los islotes, correspondiente a los dos principales tipos de células endocrinas, α y β , presentaban alguna modificación en su masa después del periodo de

experimentación, que se manifestara en la expansión del islote previamente observada, se analizó el área positiva para glucagón y para insulina de cada islote encontrado. El resultado mostrado en la figura 19, denota que las células α del grupo suplementado presentan un aumento en la proporción del área dentro del islote, mientras que para las células β del mismo grupo se observó una disminución, ambas estadísticamente significativas.

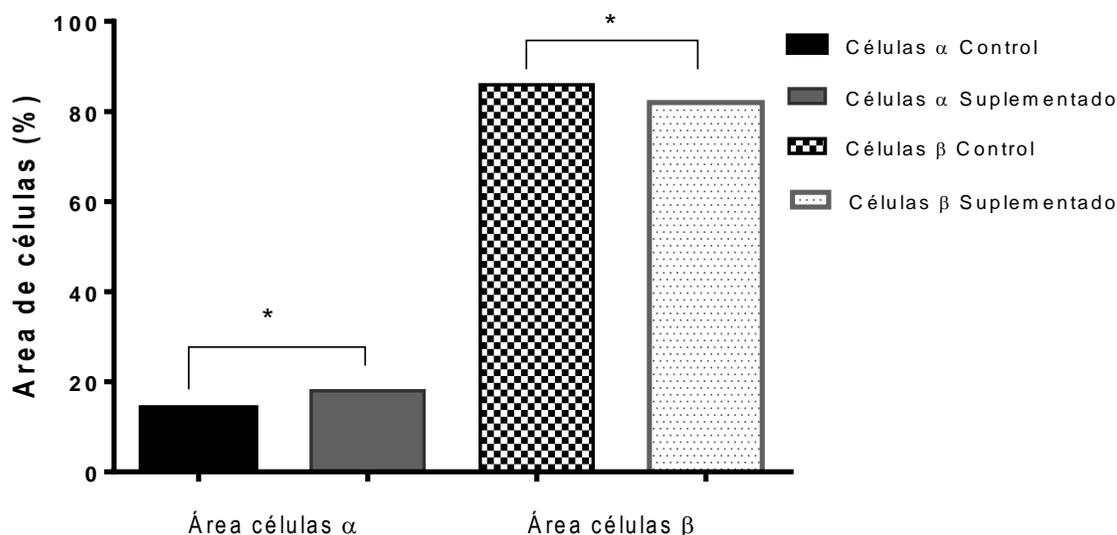


Figura 19. Proporción de células α y β dentro del islote, puede observarse que los datos resultan inversamente proporcionales conformando el cien por ciento en el área del islote. Los islotes analizados corresponden a una de $n=370$ y $n=308$ para el grupo control y el grupo suplementado respectivamente. Los datos se analizaron mediante una prueba de Mann-Whitney y son expresados en porcentaje, presentan la media \pm ES. La significancia fue de $p \leq 0.05$.

G. 1.3.6 Número de células α y β por islote

Con el fin de determinar si los cambios observados en la masa de los islotes del grupo suplementado, se deben a una alteración en el número de células que lo constituyen, se evaluó el número de células α y β en el total de islotes encontrados en cada grupo. Se puede observar que el grupo suplementado tiene una distribución en el número de células α significativamente mayor al grupo control, mientras que para las células β no presentan diferencias entre los grupos (figura 20).

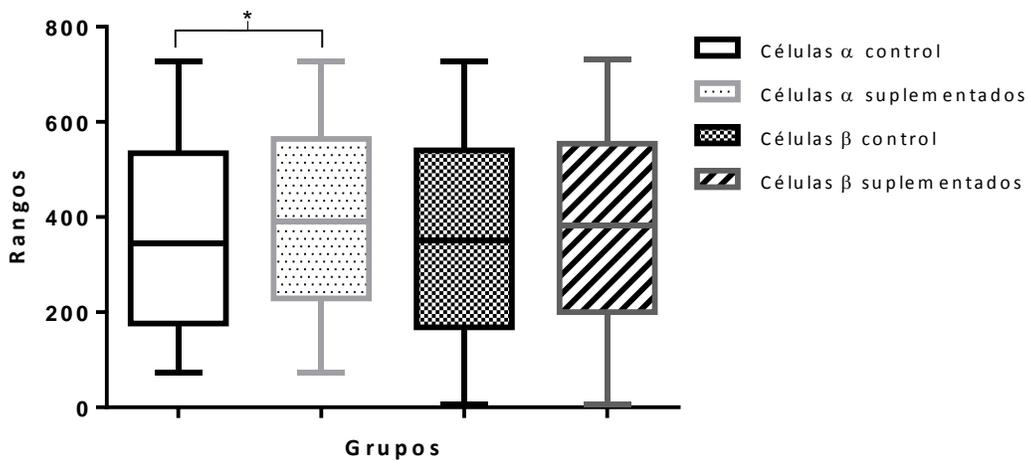


Figura 20. Número de células α y β en el islote. Los datos son organizados en rangos. Se muestra la distribución de los datos y la localización de la mediana de cada grupo. El análisis se realizó mediante una prueba de Mann-Whitney y la significancia resultante fue de $p < 0.05$.

G. 1.3.7 Número de islotes cercanos a ductos (neogénesis) y su composición

A partir del criterio de distancia celular para considerar el proceso de origen de los islotes por neogénesis, que contempla la distancia menor a 5 células que hay entre un ducto y el islote o bien una estructura semejante a un islote (Montanya, 2009). El resultado observado en la figura 21, no muestra diferencias en el promedio de islotes originados por neogénesis.

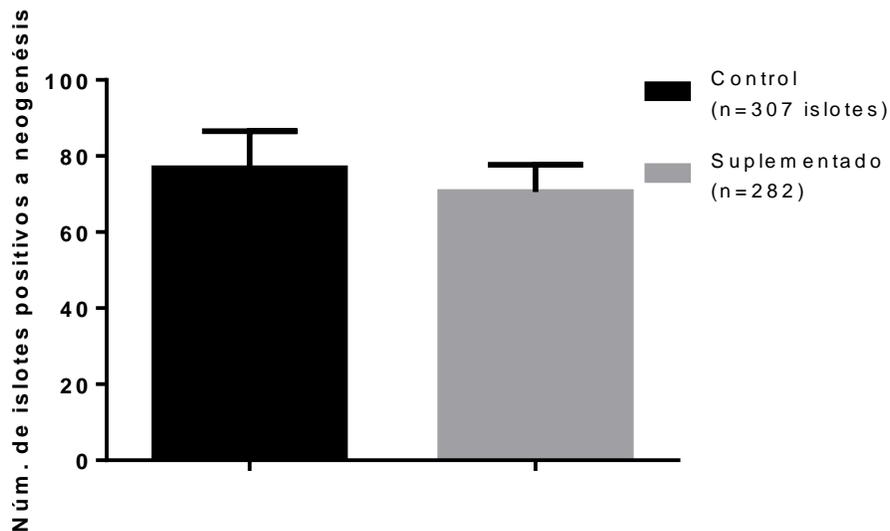


Figura 21. Número de islotes positivos a neogénesis encontrados para cada grupo. Los grupos son presentados como control con una $n=307$ (negro) y suplementado con una $n=282$ (gris), y se analizaron mediante una prueba de Mann-Whitney. Se muestra la media \pm ES.

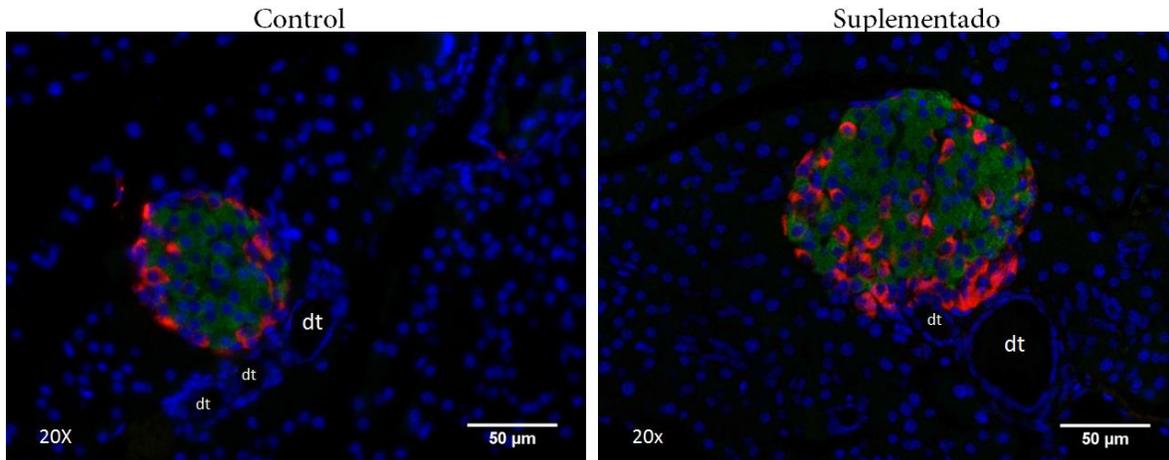


Figura 22. La inmunofluorescencia en las imágenes representativas muestran la cercanía de los islotes a estructuras ductales (dt), e incluso la presencia de células α y β dentro de ductos. La morfología del islote se observa mediante la expresión de insulina (verde) y glucagón (rojo). La escala es equivalente a 50 μm .

De aquellos islotes positivos a neogénesis (figura 22) se analizó el número total de células α y de células β que los constituyen. Respecto a las células que los integran, las células α no revelaron una diferencia significativa entre ambos grupos, siendo similar la distribución de rangos del número de células. Mientras que para las células β el resultado mostró una diferencia significativa para el grupo suplementado respecto al grupo control, indicando un mayor número de células β (figura 23).

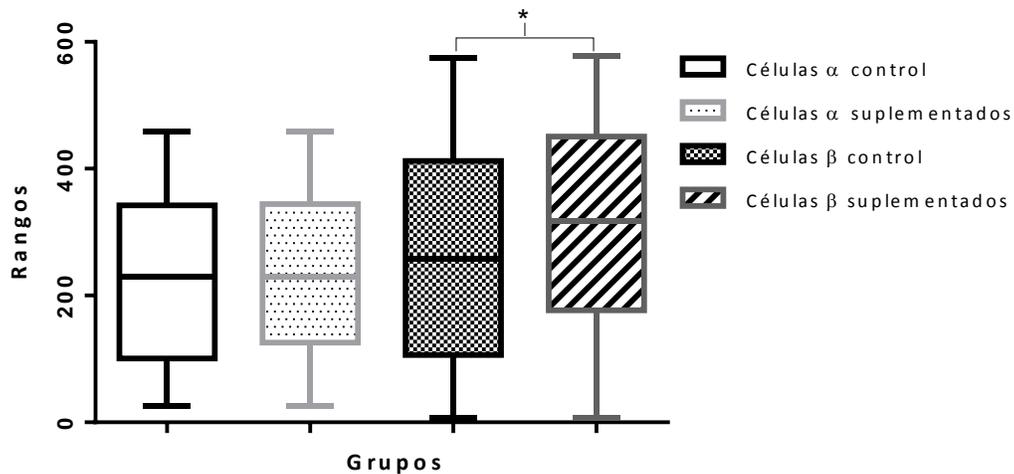


Figura 23. Número de células α y β en el islotes positivos a neogénesis. Se muestra la distribución de los datos y la localización de la mediana para de cada grupo, la significancia señalada fue $p \leq 0.05$, como resultado del análisis por la prueba de Mann-Whitney.

G. 1.3.8 Área positiva a RegIII δ

RegIII δ ha sido propuesto como una molécula positiva en modelos de daño pancreático, así como en páncreas de roedores en desarrollo y durante las primeras semanas de vida. La expresión de tal proteína se ha reportado en células presentes en los ductos y células dentro del islote (más comúnmente en las células α), como consecuencia de su migración y posterior diferenciación en células endocrinas. Con el objetivo de observar más claramente si la expansión en el tamaño del islote es debida a un proceso de neogénesis, y si la suplementación con biotina tiene repercusión en algún factor relacionado con este mecanismo, se realizó la detección de RegIII δ mediante un anticuerpo específico.

Los resultados obtenidos a partir del análisis del área de RegIII δ en islotes de ambos grupos, control y suplementado, no encontraron una diferencia significativa en la presencia del marcador (figura 24), así como en su intensidad y localización (figura 25 y 26).

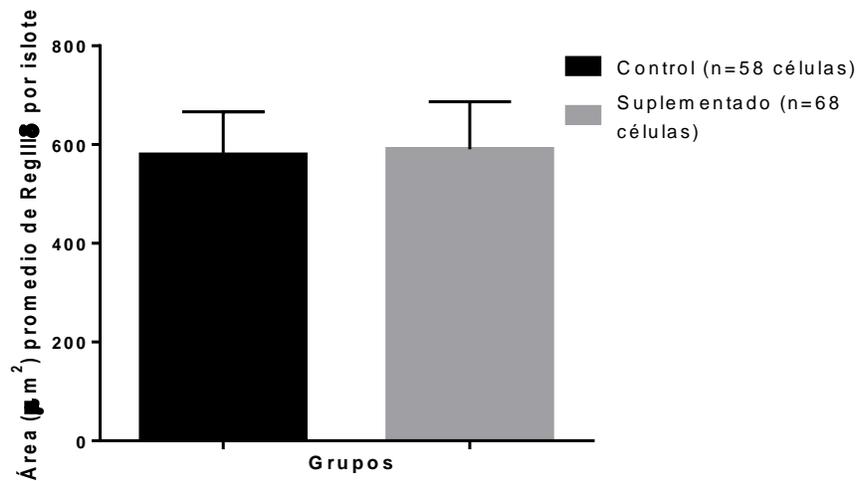


Figura 24. Área de RegIII δ en islotes. Los datos expuestos corresponden al grupo control con una n=58 (negro) y el grupo suplementado correspondiente a una n=68. El área de RegIII δ en los islotes se analizó por medio de una prueba de Mann-Whitney, sin resultar significativa. Se muestra la media \pm ES.

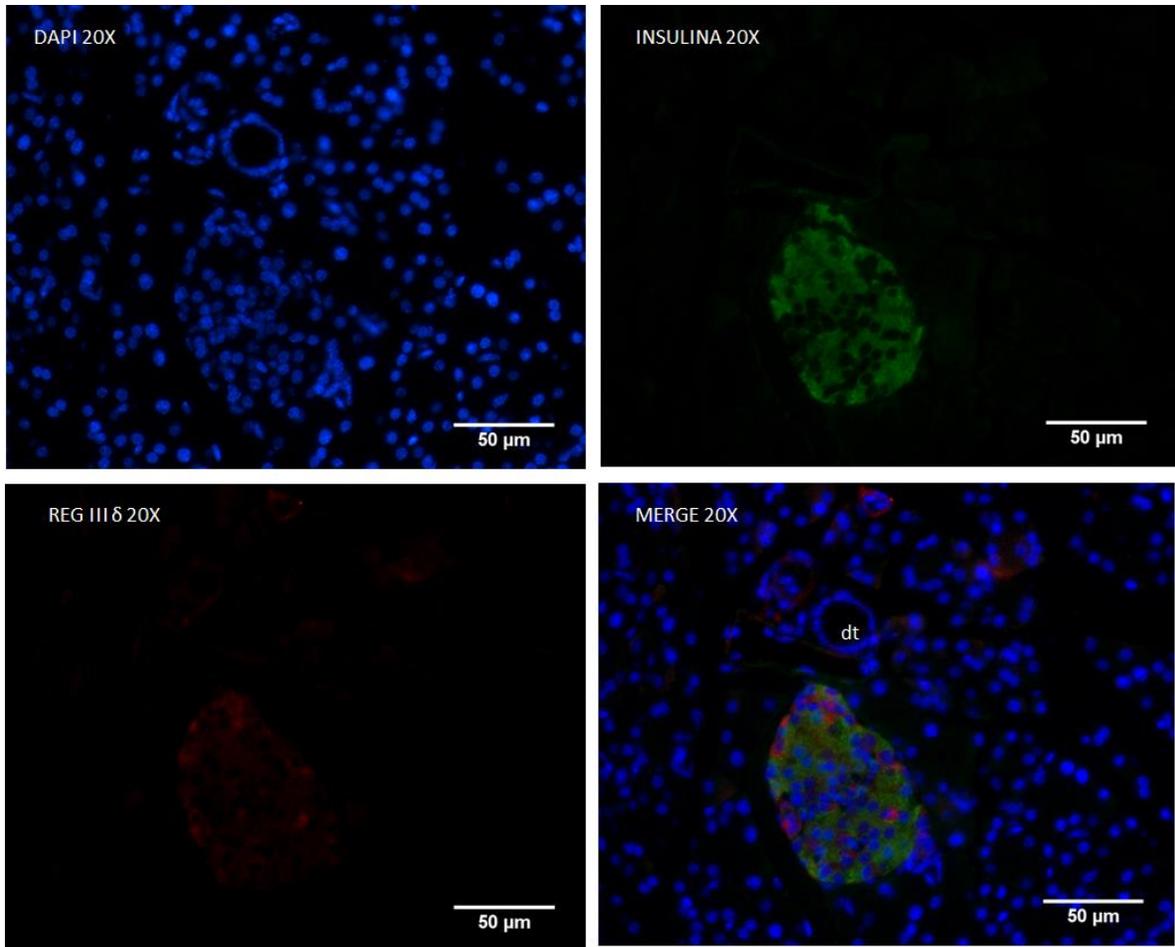


Figura 25. RegIII δ en islotes positivos a neogénesis del grupo control. La presencia de RegIII δ , sólo se mostró en algunos islotes, siendo las células de la periferia donde comúnmente se presentaba y con poca intensidad.

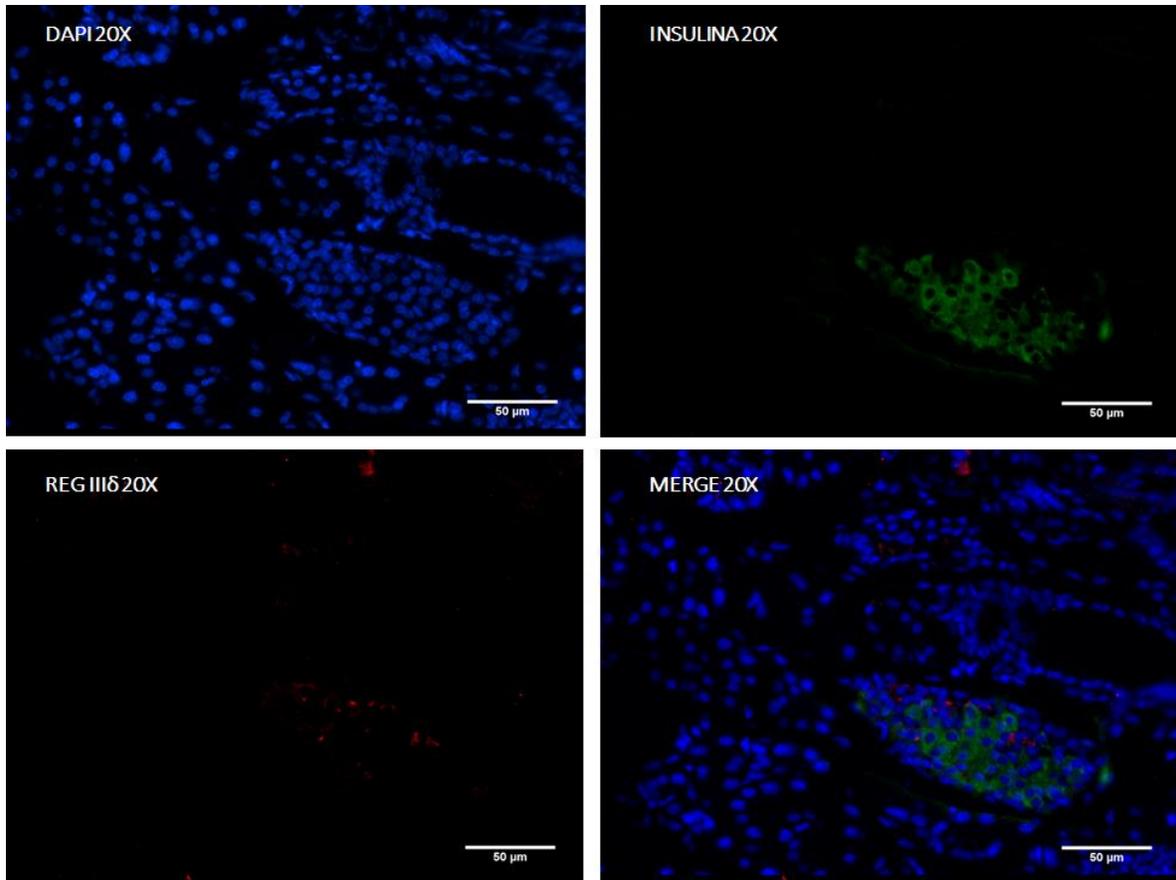


Figura 26. RegIIIδ en islotes positivos a neogénesis del grupo suplementado. La presencia de RegIIIδ, sólo se mostró en algunos islotes, siendo las células de la periferia donde comúnmente se presentaba y con poca intensidad.

H. Discusión

Estudios previos, realizados en el laboratorio en donde se llevó a cabo este trabajo de tesis, mostraron que la suplementación con biotina durante etapas tempranas de la vida (3 semanas después del destete) en ratones hembra, tiene un efecto protector ante el desarrollo de hiperglucemia y daño de las células β en la edad adulta (Ruíz, 2015). Dado que se desconocen los cambios que produjo la biotina durante este periodo, los cuales permitieron al islote resistir este daño, estudios en nuestro laboratorio se encuentran analizando el curso temporal de eventos que se desarrollan durante este periodo. Una posibilidad de enfrentar adecuadamente este daño podría estar dada por un aumento en el número y tamaño de los islotes, ya que investigaciones de Lazo de la Vega (2012) en el laboratorio encontraron que la suplementación con biotina a partir del destete, durante ocho semanas produjo un aumento en número de células α y β modificando el tamaño de los islotes. Por lo que en este trabajo se analizaron cambios morfológicos acontecidos en los islotes en etapas tempranas de la vida en respuesta a la suplementación con biotina, así como su capacidad de regeneración, analizando el proceso de neogénesis y la participación de la proteína RegIII δ . Dado que al inicio de este trabajo de tesis, hallazgos en nuestro laboratorio indicaron que los cambios morfológicos que se observan con la dieta suplementada con biotina no se producen en la primera semana de tratamiento sino que se generan gradualmente con el tiempo (Méndez, 2015) se escogió analizar dos semanas de administración.

Con el fin de identificar que tanto el grupo control como el suplementado no mostraran diferencias en el tamaño y peso, así como en su salud, se compararon los pesos corporales. Los resultados nos indicaron que no hubo una diferencia entre los pesos de los sujetos, lo cual coincide con resultados previos (Lazo de la Vega 2012).

La respuesta de la glucosa en sangre también fue evaluada por medio de una curva de tolerancia a la glucosa, ambos grupos respondieron sin cambios significativos; esto difiere de los resultados previamente reportados indicando que una dieta con concentraciones suprafisiológicas de biotina en ratones macho durante una (Flores, 2011) y ocho semanas (Lazo de la Vega M., *et al.*, 2013) presentan una mejor tolerancia a la glucosa. Las diferencias observadas podrían estar asociadas al sexo de los sujetos de experimentación, ya que los estudios previos se realizaron en ratones macho, en tanto que este trabajo se realizó en hembras, y se ha visto que existe dimorfismo sexual en la homeostasis de la glucosa (Vital, 2006). Realizar estudios que analicen si los efectos de la

suplementación con biotina difieren dependiendo del sexo de los animales, será de gran importancia para definir las discrepancias entre los dos estudios aquí referidos.

El análisis de los resultados morfológicos en el presente estudio, mostró que no hubo diferencia significativa en el número de islotes por área de corte de páncreas, sin embargo, se observó un aumento en la el área de los islotes presentes en el grupo suplementado que corresponde a lo reportado por Lazo de la Vega, 2013 y Flores, 2011 con respecto al aumento en el tamaño de los islotes. Por otro lado, los datos obtenidos en las mediciones de la frecuencia de tamaño de los islotes revelaron que el aumento de área total observada está asociado con menos islotes de 5,000 micras y mayor número de islotes con área de 20,000 micras.

El análisis de la composición de los islotes puso de manifiesto que hubo un número significativamente ($p < 0.05$) mayor de células α en los islotes del grupo suplementado, así como una mayor área dentro del islote; mientras que no hubo una diferencia estadísticamente significativa en el número de células β , aunque sí una tendencia a ser mayor. En cuanto al área de las células β estas se vieron reducidas, probablemente por una disminución en su tamaño celular. Por último, los resultados sugieren que el aumento del tamaño del islote relacionado principalmente al incremento en número de células α , observado en el grupo suplementado, no está asociado al proceso de neogénesis estrictamente ya que no se observaron diferencias entre los grupos en la cercanía de los islotes a los ductos, ni en la presencia de RegIII δ .

Además es importante mencionar que el marcaje en RegIII δ se vio mayormente en las células de la periferia donde coincidía con células positivas a glucagón, por lo que el aumento en el número de células β de los islotes positivos a neogénesis bien podría estar ligado a un proceso de transdiferenciación (Thorel *et al.*, 2010, Guz, 2001) que incluya a las células α e inclusive a otras células del islote, sin embargo, se requieren estudios específicos para probar esta posibilidad.

I. Conclusión

Los resultados de este trabajo indican, que la suplementación con biotina durante dos semanas en ratones hembra de 21 días de edad, aumentó el tamaño del islote y produjo un aumento en el número de células α .

En los islotes se encontró una menor área correspondiente a células β , no vinculada su número de células dentro del islote.

En la expansión del área del islote no participa la neogénesis como proceso exclusivo, sin embargo, los islotes derivados de este proceso si fueron estimulados por el tratamiento con biotina resultando en un aumento en el número de células que lo integran, principalmente α y β .

J. REFERENCIAS

- Aguayo-Mazzucato C, Sanchez-Soto C, Godinez-Puig V, Gutiérrez-Ospina G & Hiriart M. 2006. Restructuring of pancreatic islets and insulin secretion in a postnatal critical window. *PLoS ONE* 1 (1): e35.
- Albarracín C, Fuqua B, Geohas J, Finch M & Komorowski J. Improvement in glycemic control, lipids and insulin sensitivity with the combination of chromium picolinate and biotin in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2005; 54: A428.
- Bansal VS, Raja CP, Venkataraman K & Vijayalakshmi MA. Genes involved in pancreatic islet cell rejuvenation. *Indian J Med Res* 2013; 137 (4):695–703.
- Barberá Albert & Gasa Rosa. Capítulo 8. Desarrollo Embrionario del páncreas y regeneración en el páncreas adulto. En E. Montanya (Ed.), *El islote pancreático en el desarrollo y tratamiento de la diabetes*. Madrid, España: Editorial de la Sociedad Española de Diabetes; 2007. pp. 125-136.
- Bardeesy N & DePinho RA. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:897-909.
- Bonner-Weir S, Inada A, Yatoh S, Li WC & Aye T. Transdifferentiation of pancreatic ductal cells to endocrine β -cells. *Biochem Soc Trans* 2008; 36. 353-356.
- Bonner-Weir S, Li WC, Ouziel-Yahalom L, Guo L, Weir GC & Sharma A. Beta-cell growth and regeneration: replication is only part of the story. *Diabetes* 2010; 59:2340-8.
- Bouwens L & Pipeleers DG. Extrainsular beta-cells associated with ductules are frequent in adult human pancreas. *Diabetologia* 1998; 41(6): 629–633.
- Bouwens L & Rooman I. Regulation of pancreatic beta-cell mass. *Physiol Rev* 2005; 85:1255–1270.
- Bouwens L, Braet F & Heimberg H. Identification of rat pancreatic duct cells by their expression of cytokeratins 7, 19, and 20 in vivo and after isolation and culture. *J. Histochem. Cytochem* 1995; 43 (3): 245–253.
- Bouwens L, Wang RN, De Blay E, Pipeleers DG & Kloppel G. Cytokeratins as markers of ductal cell differentiation and islet neogenesis in the neonatal rat pancreas. *Diabetes* 1994; 43(11):1279–1283.
- Bouwens L. (2004). Islet Morphogenesis and Stem Cell Markers. *Cell Biochem Biophys* 2004; 40(3 Suppl):81-88.
- Bouwens L. Cytokeratins and cell differentiation in the pancreas. Review. *J. Pathol* 1998; 184(3): 234–239.
- Bouwens, L & De Blay E. Islet morphogenesis and stem cell markers in rat pancreas. *J. Histochem. Cytochem* 1996; 44 (9): 947–951.
- Burkitt HG, Young B & Heath JW. *Wheater's Functional Histology*. 3rd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1993.
- Burlison JS, Long Q, Fujitani Y, Wright CV & Magnuson MA. Pdx-1 and Ptf1a concurrently determine fate specification of pancreatic multipotent progenitor cells. *Dev Biol* 2008; 316(1):74–86.
- Cano DA, Hebrok M & Zenker M. Pancreatic development and disease. *Gastroenterology* 2007; 132:745-62.

- Cantenys D, Portha B. et al. Histogenesis of the endocrine pancreas in newborn rats after destruction by streptozotocin. *Virchows Arch. (Cell Pathol)* 1981; 35: 109-122.
- Castillo F & Cardenas J. Vitaminas hidrosolubles y coenzimas. En Herrera E. *Bioquímica. Aspectos estructurales y vías metabólicas*. Madrid: Interamericana, McGraw-Hill, 1991; pp. 167-225.
- Chauhan J & Dakshinamurti K. Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats. *J Biol Chem* 1991; 266, 10035-10038.
- Cleveland M, Sawyer JM, Afelik S, Jensen J & Leach S. Exocrine ontogenies: On the development of pancreatic acinar, ductal and centroacinar cells. *Semin Cell Dev Biol* 2012; 23(6): 711–719.
- Coates PM, Blackman MR, Cragg GM, Levine M, Moss J & White JD (Ed), *Encyclopedia of Dietary Supplements*. New York, NY: Marcel Dekker, 2005; p. 35.
- Coggeshall J, Heggors J, Robson M & Beker H. Biotin status and plasma glucose in diabetics. *Ann N Y Acad Sci* 1985; 447:389-393.
- Cohen N & Thomas M. Biotin transport into fully differentiated 3T3-L1 cells. *Biochim Biophys Res Comm* 1982; 108(4): 1508-16.
- Collins JC, Paietta E, Green R, Morell AG & Stockert RJ. Biotin-dependent expression of the asialoglycoprotein receptor in HepG2 cells. *J Biol Chem* 1988; 263: 11280-11283.
- Dakshinamurti K & Cheah-Tan C. Liver glucokinase of the biotin deficient rat. *Can J Biochem* 1968; 46, 75-80.
- Dakshinamurti K & Ho Chong Hong. Regulation of key hepatic glycolytic enzymes. *Enzymol Biol Clin* 1970; 11, 423-8.
- Davani BL, Ikonomou L, Raaka BM et al. Human islet-derived precursor cells are mesenchymal stromal cells that differentiate and mature to hormone-expression cells in vivo. *Stem Cells* 2007; 25: 3215–22.
- De la Vega L & Stockert R. Regulation of the insulin and asialoglycoprotein receptors via cGMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol- Cell Physiol* 2000; 279(6): C2037-C2042.
- De la Vega L & Stockert RJ. The cytoplasmic coatomer protein COPI-A potential translational regulator. *J Biol Chem* 1999; 247(44): 31135-8.
- De Luis Román D, Bellido D & García P. *Nutrición clínica y metabolismo*. Madrid, España: Díaz de Santos, 2010; p. 55.
- Desai BM, Oliver-Krasinski J, De Leon DD, Farzad C, Hong N, Leach SD & Stoffers DA. Preexisting pancreatic acinar cells contribute to acinar cell, but not islet beta-cell, regeneration. *J Clin Invest* 2007; 117:971–977.
- Dor Yuval. β -cell proliferation is the major source of new pancreatic β cells. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2006; 2(5):242-243.
- Eisenbarth GS. *Immunology of type 1 diabetes*. 2nd ed. Plenum publishers, 2004; p. 84.
- Fernández-Mejía C. Pharmacological effects of biotin. *J Nutr Biochem* 2005; 16: 424- 427.
- Flores Aguilar MA. Efectos de la biotina en el metabolismo de carbohidratos en la semana posterior al destete de ratón (tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México; 2015.

- Furuyama K, Kawaguchi Y, Akiyama H, Horiguchi M, Kodama S, Kuhara T, Hosokawa S & Elbahrawy A. Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. *Nat Genet.* 2011; 43(1):34–41.
- Gasslander T, Ihse I & Smeds S. The importance of the centroacinar region in cerulein-induced mouse pancreatic growth. *Scand J Gastroenterol*, 1992; 27(7):564–70.
- Godínez-Rubí M, Valle-Anaya M, Anaya-Prado R. Vitaminas hidrosolubles y su efecto sobre la expresión génica. *Rev Latinoam Cir* 2012; 2(1):40-48.
- Gu G, Dubauskaite J & Melton DA. Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* 2002; 129:2447–2457.
- Gu, D., & Sarvetnick, N. Epithelial cell proliferation and islet neogenesis in IFN-g transgenic mice. *Development* 1993; 118: 33–46.
- Guz Y, Nasir, I, & Teitelman G. Regeneration of pancreatic beta cells from intra-islet precursor cells in an experimental model of diabetes. *Endocrinology* 2001; 142, 4956– 4968.
- Han JH, Rall L & Rutter WJ. Selective expression of rat pancreatic genes during embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986; 83(1):110-114.
- Harris RS, Wol IG, Lovaine JA. *Vitamins and hormones*, vol 22. Academic Press, New York, 1964; 22: 399-410.
- Harris SA, Wolf DE, Mozingo R & Folkers K. Synthetic biotin. *Science* 1943; 97(2524):447-8.
- Harrison KA, Thaler J, Pfaff SL, Gu H, Kehrl JH. Pancreas dorsal lobe agenesis and abnormal islets of Langerhans in Hlxb9-deficient mice. *Nat Genet* 1999; 23:71–75.
- Hayashi K, et al. Regional differences in the cellular proliferation activity of the regenerating rat pancreas after partial pancreatectomy. *Arch Histol Cytol* 1999; 62(4):337-46.
- Hayashi KY, et al. Differentiation and proliferation of endocrine cells in the regenerating rat pancreas after 90% pancreatectomy. *Arch Histol Cytol* 2003; 66(2):163–74.
- Hellerström C & Swenne I. Functional maturation and proliferation of fetal pancreatic beta-cells. *Diabetes* 1991; 40 Suppl 2:89-93.
- Hernández M, Sastre A. *Tratado de nutrición.* . Madrid, España: Díaz de Santos, 1999; pp. 174-176.
- Herrera PL. Adult insulin- and glucagon- producing cells differentiate from two independent cell lineages. *Development* 2000; 127:2317–2322.
- Hiriart M. *El páncreas endócrino en Fisiología médica. El manual moderno.* México. 2002.
- Hughes, H.J. Cyclical changes in the islets of Langerhans in the rat pancreas. *J Anat* 1947; 81: 82-92.
- Jorgensen M, et al. An Illustrated Review of Early Pancreas Development in Mouse. *Endocrine Reviews.* 2007; 28(6):685–705.
- Juhl, K, Bonner-Weir S, & Sharma A. Regenerating pancreatic beta-cells: plasticity of adult pancreatic cells and the feasibility of in-vivo neogenesis. *Curr Opin Organ Transplant* 2010; 15:79-85.
- Kawaguchi Y, Cooper B, Gannon M, Ray M, MacDonald RJ & Wright CV. The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nat Genet* 2002; 32:128–134.

- Kesavan G, Sand FW, Greiner TU, Johansson JK, Kobberup S, Wu X, Brakebusch C, Semb H. Cdc42- mediated tubulogenesis controls cell specification. *Cell* 2009; 139:791–801.
- Kobayashi S, Akiyama T, Nata K, Abe M, Tajima M, Shervani NJ, Unno M, Matsuno S, Sasaki H, Takasawa S & Okamoto H. Identification of a receptor for reg (regenerating gene) protein, a pancreatic β -cell regeneration factor. *J Biol Chem* 2000; 275: 10723–10726.
- Kopp JL, et al. Sox9+ ductal cells are multipotent progenitors throughout development but do not produce new endocrine cells in the normal or injured adult pancreas. *Development*. 2011; 138(4): 653–65.
- Krapp A, Knofler M, Ledermann B, Burki K, Berney C, Zoerkler N, Hagenbuchle O & Wellauer PK. The bHLH protein PTF1-p48 is essential for the formation of the exocrine and the correct spatial organization of the endocrine pancreas. *Genes Dev* 1998; 12:3752–3763.
- Krstić RV. *Human Microscopic Anatomy. An atlas for students of medicine and Biology.* Germany: Springer-Verlag 1997. pp. 248-255.
- Lamhonwah A, Quan F & Gravel R. Sequence homology around the biotin-binding site of human propionyl-CoA carboxylase. *Arch Biochem Biophys* 1987; 254, 631-6.
- Lazo de la Vega-Monroy ML, Larrieta E, German M, Baez-Saldana A & Fernández-Mejía C. Effects of biotin supplementation in the diet on insulin secretion, islet gene expression, glucose homeostasis and beta-cell proportion. *J Nutr Biochem* 2013; 24(1): 169–177.
- Lee SC, De León DD & Kaestner KH. Regeneration of pancreatic islets after partial pancreatectomy in mice does not involve the reactivation of Neurogenin-3. *Diabetes* 2006; 55: 269-272.
- Leeson TS & Leeson R. Close association of centroacinar/ductular and insular cells in the rat pancreas. *Histol Histopathol* 1986; 1(1):33–42.
- Li H, Arber S, Jessell TM, Edlund H. Selective agenesis of the dorsal pancreas in mice lacking homeobox gene Hlx9. *Nat Genet* 1999; 23:67–70.
- Lucas A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp* 1991; 156, 38-55.
- Lucas A. Programming by early nutrition: an experimental approach. *J Nutr* 1998; 128: 401S-406S.
- McCance RA. Food growth and time. *Lancet* 1962; 2: 271–272.
- McCormick DB & Greene HL. Vitamins. In Burtis C. A. Ashwood E. R. *Tietz textbook of clinical chemistry.* Philadelphia: Saunders, 1994; 1275-1316.
- McEvoy RC & Madson KL. Pancreatic insulin, glucagon, and somatostatin positive islet cell populations during the perinatal development of the rat. I. Morphometric quantitation. *Biol. Neonate* 1980; 38: 248–254.
- Means AL & Leach SD. Lineage, commitment and cellular differentiation in exocrine pancreas. *Pancreatology* 2001; 1(6):587-96.
- Méndez Coronado AK. Efectos de la biotina sobre las células alfa pancreáticas en el periodo posterior al destete de ratón (tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México; 2015.
- Mezza T & Kulkarni RN. The regulation of pre- and postmaturational plasticity of mammalian islet cell mass. *Diabetologia* 2014; 57:1291–1303.

- Mock DM. Biotina. En *Conocimientos actuales sobre nutrición*. 6a Ed. Organización Panamericana de la Salud e Instituto Internacional de Ciencias de la Vida (Publicación científica) 1991; 216-235.
- Montanya E & Téllez N. Pancreatic Remodeling: Beta-Cell Apoptosis, Proliferation and Neogenesis, and the Measurement of Beta-Cell Mass and of Individual Beta-Cell Size, in Type 2 Diabetes. *Methods and Protocols*. Human Press. Buckingham, UK. 2009. pp. 141-142.
- Montanya E, Nacher V, Biarnés M, Soler J. Linear correlation between beta-cell mass and body weight throughout the lifespan in Lewis rats. *Diabetes* 2000; 49: 1341 – 1346.
- Murtaugh LC, Melton DA. Genes, signals, and lineages in pancreas development. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2003; 19:71–89.
- Nagasao J, et al. Morphological changes in the rat endocrine pancreas within 12 h of intravenous streptozotocin administration. *Anat Histol Embryol* 2005; 34(1):42–7.
- O'Brien BA, Fieldus WE, Field CJ, & Finegood DT. Clearance of apoptotic beta-cells is reduced in neonatal autoimmune diabetes-prone rats. *Cell Death Differ* 2002; 9:457-64.
- Oka T. Modulation of gene expression by vitamin B6. *Nutrition Research Reviews* 2001; 14: 257–265.
- Pacheco-Alvarez D, Solorzano-Vargas RS & Del Rio AL. Biotin in metabolism and its relationship to human disease. *Arch Med Res* 2002; 33 (5):439-47.
- Pan FC & Wright C. Pancreas Organogenesis: From Bud to Plexus to Gland Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists. 2011; 240 (3): 530-65.
- Parikh A, Stephan AF & Tzanakakis ES. Regenerating proteins and their expression, regulation and signaling. *Biomol. Concepts* 2012; 3 57–70.
- Pekovich, SR, Martin PR, Singleton, CK. Thiamine deficiency decreases steady-state transketolase and pyruvate dehydrogenase but not a-ketoglutarate dehydrogenase mRNA levels in three human cell types. *J Nutr* 1998; 128: 683–687.
- Pictet RL, Clark WR, Williams RH, Rutter WJ. An ultrastructural analysis of the developing embryonic pancreas. *Dev Biol* 1972; 29:436–467.
- Pinho AV. Pancreatic Acinar Cell Plasticity. Senescence, epithelial-mesenchymal transition and p53 (tesis doctoral). Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, España; 2011.
- Rafaeloff R, Pittenger GL, Barlow SW, Qin XF, Yan B, Rosenberg L, Duguid WP & Vinik AI. Cloning and sequencing of the pancreatic islet neogenesis associated protein (INGAP) gene and its expression in islet neogenesis in hamsters. *J Clin Invest* 1997; 99: 2100-2109.
- Reichert M & Rustgi AK. Pancreatic ductal cells in development, regeneration, and neoplasia. *J Clin Invest*. 2011; 121(12):4572–4578.
- Reinert RB, Cai Q, Hong JY, Plank JL, Aamodt K, Prasad N, Aramandla R, Dai C, Levy SE, Pozzi A, Labosky PA, Wright CV, Brissova M, Powers AC. Vascular endothelial growth factor coordinates islet innervation via vascular scaffolding. *Development* 2014; 141:1480-1491.
- Rodríguez-Melendez R & Zempleni J. Regulation of gene expression by biotin (review). *J Nutr Biochem* 2003; 14: 680- 90.

- Rodriguez-Melendez R, Griffin JB, & Zemleni J. The expression of genes encoding ribosomal subunits and eukaryotic translation initiation factor 5A depends on biotin and bisnorbiotin in HepG2 cells. *J Nutr Biochem* 2006; 17(1):23-30.
- Ross MH, Kayne GI & Romrell LJ. *Histología*. 3ra Ed. Editorial Panamericana, 1997; p. 511.
- Ruiz Mora E. Efecto de la suplementación con biotina en los islotes pancreáticos de ratón ante la inducción de diabetes por estreptozotocina (tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México; 2015.
- Rukstalis JM & Habener JF. Snail2, a mediator of epithelial-mesenchymal transitions, expressed in progenitor cells of the developing endocrine pancreas. *Gene Expr Patterns* 2007; 7:471–479.
- Rutter WJ, K JD, Bradshaw WS, Clark WR, Ronzio RA & Sanders TG. Regulation of Specific Protein Synthesis in Cytodifferentiation. *J Cell Physiol*. 1968; 72(S1):1.
- Said HM. Intestinal absorption of water-soluble vitamins in health and disease. *Biochem J*. 80 2011; 437(3):357-72.
- Sasahara K, Yamaoka T, Moritani M, Yoshimoto K, Kuroda Y & Itakura M. (2000). Molecular cloning and tissue-specific expression of a new member of the regenerating protein family, islet neogenesis-associated protein-related protein. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1500: 142-146.
- Schwitzgebel V, Somme E & Klee P. Modeling intrauterine growth retardation in rodents: impact on pancreas development and glucose homeostasis. *Molecular and cellular endocrinology* 2009; 304: 78-83
- Sellick GS, Barker KT, Stolte-Dijkstra I, Fleischmann C, Coleman RJ, Garrett C, Gloyn AL, Edghill EL, Hattersley AT, Wellauer PK, Goodwin G, Houlston RS. Mutations in PTF1A cause pancreatic and cerebellar agenesis. *Nat Genet* 2004; 36:1301–1305.
- Seymour PA, et al. SOX9 is required for maintenance of the pancreatic progenitor cell pool. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(6):1865–70.
- Shaw, J.W. & Latimer, E.O. Regeneration of pancreatic tissue from the transplanted pancreatic duct in the dog. *Am J Physiol* 1926; 76, 49-53.
- Singer G & Geohas J. The effect of chromium picolinate and biotin supplementation on glycemic control in poorly controlled patients with type 2 diabetes mellitus: a placebo-controlled, double-blinded, randomized trial. *Diabetes Technol Ther* 2006; 8(6): 636-643.
- Solórzano-Vargas S, Pacheco-Álvarez D & León del Río A. Holocarboxylase synthetase is an obligate participant in biotin-mediated regulation of its own expression and of biotin-dependent carboxylases mRNA levels in human cells. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99(8): 5325–30.
- Stanger BZ, et al. Pten constrains centroacinar cell expansion and malignant transformation in the pancreas. *Cancer Cell*. 2005; 8(3):185–95.
- Stockert RJ & Morell A. Second messenger modulation of the asialoglycoprotein receptor. *J Biol Chem* 1990; 265(4): 1841-6.
- Stockert RJ & Ren Q. Cytoplasmic protein mRNA interaction mediates cGMP-modulated translational control of the asialoglycoprotein receptor. *J Biol Chem* 1997; 272(14): 9161-5.
- Swenne, I. & Eriksson, U. Diabetes in pregnancy: islet cell proliferation in the fetal rat pancreas. *Diabetologia* 1982; 2: 525–528.

- Tarry-Adkins JL & Ozanne SE. Mechanisms of early life programming: current knowledge and future directions. *Am J Clin Nutr* 2011; 94 (suppl):1765S–71S.
- Thorel F, Nepote V, Avril I, Kohno K, Desgraz R, Chera S & Herrera PL. Conversion of adult pancreatic alphacells to beta-cells after extreme betacell loss. *Nature* 2010; 464:1149–1154.
- Tortora G & Derrickson B. *Principios de anatomía y fisiología*. 11ª ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2011.
- Vilches-Flores A & Fernández-Mejía C. Efecto de la biotina sobre la expresión genética y el metabolismo. *Rev. invest. clín.* [revista en la Internet] 2005; 57 (5): 716-724.
- Villasenor A, Chong DC, Henkemeyer M & Cleaver O. Epithelial dynamics of pancreatic branching morphogenesis. *Development* 2010; 137:4295–4305.
- Vinik A, Rosenberg L, Pittenger and Taylor-Fishwick. Stimulation of pancreatic islet neogenesis: a posible treatment for type 1 and type 2 diabetes. *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes* 2004; 11:125-140
- Vital P, Larrieta E, Hiriart M. Sexual dimorphism in insulin sensitivity and susceptibility to develop diabetes in rats. *J Endocrinol.* 2006; 1:425–432.
- Wang, RN, Bouwens L, & Klöppel G. Beta-cell proliferation in normal and streptozotocin-treated newborn rats: site, dynamics and capacity. *Diabetologia* 1994; 37, 1088–1096.
- Watanabe T, Nagai Y, Taniguchi A, Ebara S, Kimura S & Fukui T. Effects of biotin deficiency on embryonic development in mice. *Nutrition* 2009; 25, 78-84.
- Watanabe T. & Endo A. Teratogenic effects of maternal biotin deficiency on mouse embryos examined at midgestation. *Teratology* 1990; 42, 295-300.
- Watanabe T. Morphological and biochemical effects of excessive amounts of biotin on embryonic development in mice. *Experientia* 1996; 52, 149-154.
- Wolf B & Feldman GL. The biotin-dependent carboxylase deficiencies. *Am J Hum Genet* 1982; 34(5):699-716.
- Xu X, D'Hoker J, Stange G, Bonne S, De Leu N, Xiao X, Van de Casteele M, Mellitzer G, Ling Z, Pipeleers D, Bouwens L, Scharfmann R, Gradwohl G & Heimberg H. Beta-cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas. *Cell* 2008; 132: 197–207.
- Yates AA, Schlicker SA & Suitor CW. Dietary Reference Intakes: the new basis for recommendations for calcium and related nutrients, B vitamins, and choline. *J Am Diet Assoc* 1998; 98(6):699-706.
- Zemleni J, Wijeratne SSK, Hassan YI. Biotin. *Biofactors* 2009; 35(1):36-46.
- Zhou Q, Law AC, Rajagopal J, Anderson WJ, Gray PA, Melton DA. A multipotent progenitor domain guides pancreatic organogenesis. *Dev Cell* 2007; 13: 103–114.