



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**“EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE BIOTINA EN EL DESARROLLO  
DEL ISLOTE PANCREÁTICO”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

**M.en C. WILMA INÉS TIXI VERDUGO**

**TUTOR PRINCIPAL**

DRA. CRISTINA FERNÁNDEZ MEJÍA  
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

DR. JUAN MIRANDA RÍOS  
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

DR. ARMANDO ROBERTO TOVAR PALACIO  
[Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán](#)

Ciudad de México. Marzo, 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

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

El trabajo realizado durante los estudios de Doctorado  
fue posible gracias al apoyo de:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**)

CVU/Becario: 378371

Programa de Apoyo a los estudios de Posgrado (**PAEP**), UNAM

Dirección General de Asuntos del Personal Académico (**PAPIIT**)

IN210714

## AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. María Cristina Fernández Mejía**, por ser quien dirigió esta tesis. Muchas gracias por toda la paciencia y la dedicación depositadas en este trabajo y en mi persona. Gracias por ser el apoyo y la guía durante todos estos años.

Al **Dr. Armando Tovar Palacio** y al **Dr. Juan Miranda Rios**, miembros de mi comité tutorial. Gracias por todas las aportaciones para la realización de este proyecto de tesis.

A los miembros del Jurado de Exámen:

**Dra. Victoria Eugenia Chagayo Hazas**

**Dra. María Cristina Revilla Monsalve**

**Dra. Lidya Sumiko Morimoto Martín**

**Dra. Elia Martha Pérez Armendáriz**

**Dra. Verónica Guarner Lans**

Por aceptar ser los revisores de esta tesis, gracias por cada una de sus críticas y comentarios.

A la **Dra. Georgina Díaz Herrera** de la Unidad de Modelos biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, gracias por el apoyo técnico brindado en el cuidado de los animales de experimentación.

Al **Dr. Miguel Tapia Rodríguez** de la Unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas, gracias por la asesoría y el apoyo técnico para la realización de esta tesis.

A cada uno de mis compañeros de laboratorio que más que mis amigos son mi familia Mexicana. Gracias por todos los momentos compartidos, gracias por las críticas y las discusiones constructivas.

A mi familia por ser un pilar muy importante en mi vida, gracias por estar.

## ÍNDICE:

|  |    |
|--|----|
| A. RESUMEN .....   | 1  |
| B. ABSTRACT .....  | 3  |
| C. ABREVIATURAS .....                                      | 5  |
| D. INTRODUCCIÓN .....                                      | 7  |
| D.1. El páncreas.....                                      | 7  |
| D.1.1. El páncreas exocrino.....                           | 7  |
| D.1.2. El páncreas endocrino.....                          | 8  |
| D.1.3. Organogénesis y morfogénesis del páncreas.....      | 9  |
| D.1.3.1. Desarrollo embrionario del páncreas.....          | 9  |
| D.1.3.1.1. Primer estadio .....                            | 9  |
| D.1.3.1.2. Segundo estadio .....                           | 10 |
| D.1.4. Formación del islote. ....                          | 11 |
| D.1.4.1. Número de islotes.....                            | 13 |
| D.1.5. Masa de las células beta. ....                      | 13 |
| D.1.5.1. Neogénesis.....                                   | 13 |
| D.1.5.1.1. Proteínas REG (INGAP).....                      | 14 |
| D.1.5.2. Proliferación.....                                | 15 |
| D.1.5.3. Apoptosis.....                                    | 16 |
| D.1.6. Las células beta. ....                              | 17 |
| D.1.6.1. La función de las células beta.....               | 17 |
| D.1.6.2. Secreción de insulina.....                        | 17 |
| D.1.7. Cito-arquitectura de los islotes pancreáticos. .... | 20 |
| D.1.7.1. En roedores .....                                 | 20 |
| D.1.7.2. En humanos.....                                   | 21 |
| D.1.8. Maduración de las células beta .....                | 22 |
| D.1.8.1. Maduración de la secreción de insulina .....      | 22 |

|  |    |
|--|----|
| D.1.8.2. Ventanas críticas en el desarrollo del islote.....  | 23 |
| D.2. Biotina .....   | 25 |
| D.2.1. Estructura.....   | 25 |
| D.2.2. Ingesta adecuada de biotina.....  | 25 |
| D.2.3. Biodisponibilidad de la biotina .....   | 26 |
| D.2.3.1. Digestión de la biotina contenida en la dieta.....  | 26 |
| D.2.3.1.1. Absorción .....   | 26 |
| D.2.3.1.2. Transporte celular .....  | 27 |
| D.2.3.1.3. Distribución en tejidos .....   | 27 |
| D.2.3.1.4. Eliminación.....  | 27 |
| D.2.4. Biotina en la leche humana .....  | 28 |
| D.2.5. Síntesis por la Microflora intestinal .....   | 29 |
| D.2.6. Toxicidad.....  | 29 |
| D.2.7. Función Bioquímica.....   | 29 |
| D.2.7.1. Acetil- C oA carboxilasa .....  | 30 |
| D.2.7.2. Piruvato carboxilasa.....   | 31 |
| D.2.7.3. Propionil CoA carboxilasa .....   | 31 |
| D.2.7.4. $\beta$ -Metilcrotonil-CoA carboxilasa .....  | 31 |
| D.2.8. Efectos de concentraciones farmacológicas de biotina.....                                   | 32 |
| D.2.8.1. Efectos farmacológicos de la biotina sobre la expresión de genes.....                     | 32 |
| D.2.8.2. Efectos de concentraciones farmacológicas de biotina sobre el islote<br>pancreático ..... | 33 |
| D.2.8.3. Efectos de la suplementación con biotina sobre las funciones<br>reproductivas.....        | 34 |
| D.2.8.4. Efectos de la suplementación con biotina sobre el desarrollo<br>embrionario .....         | 36 |
| E. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....   | 37 |
| F. HIPÓTESIS.....  | 38 |
| G. OBJETIVO.....   | 38 |

|  |    |
|--|----|
| H. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....   | 38 |
| I. DISEÑO EXPERIMENTAL:.....   | 40 |
| I.1. Efecto de la suplementación con biotina sobre el desarrollo del páncreas al ser administrada durante la gestación y lactancia .....                                 | 40 |
| I.2. Efecto de la suplementación con biotina sobre la maduración del páncreas al ser administrada durante la primera semana post-destete .....                           | 40 |
| J. MATERIALES Y MÉTODOS.....   | 41 |
| J.1. Modelo animal.....  | 41 |
| J.1.1. Grupo experimental de gestación y lactancia.....  | 41 |
| J.1.2. Grupos experimental de la primera semana post-destete.....  | 41 |
| J.2. Inmunofluorescencia y análisis morfométricos.....   | 41 |
| J.3. Proliferación celular del islote .....  | 42 |
| J.4. Neogénesis del islote pancreático .....   | 43 |
| J.5. Apoptosis del islote pancreático .....  | 43 |
| J.6. Aislamiento de islotes pancreáticos.....  | 43 |
| J.7. Medición de glucosa en sangre .....   | 44 |
| J.8. Medición de insulina en plasma.....   | 44 |
| J.9. Curva de tolerancia a la glucosa.....   | 44 |
| J.10. Curva de tolerancia a la insulina.....   | 45 |
| J.11. Análisis estadístico .....   | 45 |
| K. RESULTADOS.....   | 46 |
| K.1. Efecto de la suplementación con biotina en el modelo de gestación y lactancia .....   | 46 |
| K.1.1. Efecto de la suplementación con biotina sobre el peso y consumo de alimento en madres gestantes y lactantes .....   | 46 |
| K.1.2. Efecto de la suplementación con biotina durante la gestación y la lactancia en el tamaño de la camada, la supervivencia, el género y malformaciones externas..... | 47 |
| K.1.3. Efecto de la suplementación con biotina durante la gestación y la lactancia en el peso corporal de las crías.....   | 48 |

|   |    |
|---|----|
| K.1.4. Efecto de la suplementación con biotina durante la gestación y la lactancia en el peso corporal de la crías de acuerdo al sexo. ....                   | 49 |
| K.1.5. Efecto de la suplementación con biotina durante la gestación y la lactancia sobre el peso del páncreas, hígado, testículo y útero en las crías. ....   | 50 |
| K.1.6. Efecto de la suplementación con biotina durante la gestación y la lactancia en la morfometría de los islotes pancreáticos de las crías .....           | 51 |
| K.1.6.1. Área del islote .....  | 51 |
| K.1.6.2. Número de islotes por área de páncreas.....  | 52 |
| K.1.6.3. Composición de células alfa y beta por islote.....   | 53 |
| K.1.7. Efecto de la suplementación con biotina durante el periodo de gestación y lactancia en la secreción de insulina de islotes aislados de las crías ..... | 54 |
| K.1.8. Efecto de la suplementación con biotina durante la etapa de gestación y sobre las concentraciones de glucosa e insulina séricas en las crías .....     | 55 |
| K.1.9. Efecto de la suplementación de biotina durante la gestación y la lactancia sobre la tolerancia a la glucosa en las crías.....                          | 56 |
| K.1.10. Efecto de la suplementación con biotina durante la gestación y la lactancia en las crías sobre la tolerancia a la insulina.....                       | 58 |
| K.2. Efecto de la suplementación con biotina durante la maduración del islote (primera semana después del destete) .....                                      | 59 |
| K.2.1. Efecto de la suplementación con biotina sobre el peso corporal.....  | 59 |
| K.2.2. Consumo de alimento.....   | 60 |
| K.2.3. Efecto de la suplementación con en la morfometría y morfología del islote pancreático .....  | 60 |
| K.2.3.1. Composición de células alfa y beta por islote.....   | 60 |
| K.2.3.2. Número de islotes por área de corte. ....  | 61 |
| K.2.3.3. Área del islote. ....  | 62 |
| K.2.4. Efecto de la suplementación con biotina sobre la proliferación, neogénesis y apoptosis. ....   | 64 |
| K.2.4.1. Proliferación del islote. ....   | 64 |
| K.2.4.2. Neogénesis del islote. ....  | 65 |
| K.2.4.3. Efecto de la suplementación con biotina sobre la apoptosis del islote. ....  | 66 |



|  |    |
|--|----|
| K.2.5. Efectos de la suplementación con biotina sobre la secreción de insulina en islotes aislados .....                                   | 67 |
| K.2.6. Efecto de la suplementación con biotina sobre las concentraciones de glucosa en sangre y en una curva de tolerancia a glucosa ..... | 68 |
| K.2.7. Valores séricos de insulina en condiciones de ayuno .....   | 69 |
| L. DISCUSIÓN.....  | 70 |
| M. CONCLUSIONES .....  | 75 |
| BIBLIOGRAFÍA:.....   | 76 |

## ANEXOS

I. Wilma Tixi-Verdugo, Juan Contreras-Ramos, Gloria Sicilia-Argumedo. Michael S. German, and Cristina Fernández-Mejía. Effects of Biotin Supplementation During the First Week Postweaning Increases Pancreatic Islet Area, Beta-Cell Proportion, Islet Number, And Beta-Cell Proliferation. *Journal of Medicinal Food*, doi:10.1089/jmf.2017.0077. 2017.

II. Lazo-de-la-Vega-Monroy ML, Larrieta E, Tixi-Verdugo W, Ramírez-Mondragón R, Hernández-Araiza I, German MS, Fernandez-Mejia C. Effects of dietary biotin supplementation on glucagon production, secretion, and action. *Nutrition*, doi: 10.1016/j.nut.2017.06.014. 2017

## Índice de figuras

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Anatomía del páncreas.....   | 7  |
| Figura 2. Estructura y ubicación del islote de Langerhans dentro del tejido exocrino... 8  |    |
| Figura 3. Desarrollo embrionario del páncreas de ratón.....  | 10 |
| Figura 4. Formación de linaje endocrino durante el desarrollo del páncreas.....  | 11 |
| Figura 5. Delaminación, migración y formación del islote de Langerhans .....   | 12 |
| Figura 6. Dinámica de los procesos que regulan la masa de las células beta.....  | 16 |
| Figura 7. Secreción de insulina.....   | 19 |
| Figura 8. Citoarquitectura de los islotes pancreáticos. ....   | 22 |
| Figura 9. Estructura química de la biotina.....  | 25 |
| Figura 10. Transporte y metabolismo de la biotina.....   | 30 |
| Figura 11. Las carboxilasas y su función en el metabolismo.....  | 31 |
| Figura 12. Mecanismo de acción de la biotina en islotes pancreáticos. ....   | 34 |
| Figura 13. Efecto de la suplementación con biotina sobre el peso corporal de las madres y la ingesta de alimento durante la gestación y la lactancia. ....           | 47 |
| Figura 14. Efecto de la suplementación con biotina durante la gestación y la lactancia en el peso corporal de las crías. ....  | 49 |
| Figura 15. Efecto de la suplementación con biotina durante la gestación y la lactancia en el peso corporal de las crías hembras y machos al momento del destete..... | 50 |
| Figura 16. Efecto de la suplementación de biotina durante la gestación y la lactancia sobre el tamaño de los islotes.....  | 52 |
| Figura 17. Efecto de la suplementación de biotina durante la gestación y la lactancia sobre el número de islotes.....  | 53 |
| Figura 18. Efecto de la suplementación de biotina durante la gestación y la lactancia sobre la proporción de células alfa y beta por islote.....                     | 54 |
| Figura 19. Efecto de la suplementación con biotina durante la gestación y la lactancia en la secreción de insulina de crías machos y hembras .....                   | 55 |
| Figura 20. Efecto de la suplementación con biotina durante la gestación y la lactancia sobre la tolerancia a la glucosa en las crías macho y hembra .....            | 57 |
| Figura 21. Efecto de la suplementación con biotina durante la gestación y la lactancia sobre la tolerancia a la insulina en las crías hembra.....                    | 58 |
| Figura 22. Efecto de la suplementación con biotina en el peso corporal.. .....   | 59 |
| Figura 23. Consumo de alimento. ....   | 60 |
| Figura 24. Área promedio de células positivas a insulina ( $\beta$ ) y glucagón ( $\alpha$ ).....  | 61 |
| Figura 25. Número de islotes por área de páncreas.....   | 62 |
| Figura 26. Área del islote.. .....   | 63 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 27. Efecto de la suplementación en la proliferación del islote..                          | 64 |
| Figura 28. Efecto de la suplementación en la neogénesis del islote.....                          | 65 |
| Figura 29. Efecto de la suplementación en la apoptosis del islote.....                           | 66 |
| Figura 30. Efecto de la suplementación con biotina en la secreción de insulina.....              | 67 |
| Figura 31. Efecto de la suplementación con biotina en una curva de tolerancia a la glucosa ..... | 68 |
| Figura 32. Concentración de insulina en sangre de ratones.....                                   | 69 |

### **Indice de tablas**

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1. Efecto de la suplementación de biotina durante la gestación y la lactancia en el tamaño de la camada, la supervivencia, el género y las malformaciones externas. | 48 |
| Tabla 2. Efecto de la suplementación con biotina durante la gestación y la lactancia en el peso del páncreas, hígado, testículos y útero de las crías. ....               | 51 |
| Tabla 3. Efecto de la suplementación de biotina durante la gestación y la lactancia en los niveles de glucosa en sangre e insulina en suero de las crías.....             | 56 |

## A. RESUMEN

La biotina es una vitamina hidrosoluble del complejo B. Independientemente de su papel como grupo prostético de las carboxilasas, se ha encontrado que la biotina en concentraciones farmacológicas es capaz de modificar varias funciones biológicas como la reproducción, el desarrollo embrionario y la homeostasis de la glucosa.

En un estudio previo, se reportó que ratones alimentados con una dieta suplementada con biotina durante ocho semanas después del destete, mostraron un incremento en el tamaño de los islotes, modificación en la estructura de los islotes, la secreción de insulina basal o estimulada por glucosa y la expresión de factores de transcripción que participan en la génesis de la célula beta pancreática y en la secreción de la insulina.

A pesar de la información de las acciones de concentraciones farmacológicas sobre la reproducción, el desarrollo, la morfología, expresión de genes del islote y la secreción de la insulina, no existen estudios que analicen el efecto de dosis farmacológicas de biotina cuando es administrada durante el periodo de desarrollo del islote.

El completo desarrollo del islote pancreático abarca los periodos de gestación, lactancia y primera semana post-destete. En el presente trabajo investigamos cuales son los efectos de la suplementación con biotina en el desarrollo del páncreas y la homeostasis de la glucosa cuando se administra la vitamina: 1) durante las etapas críticas de desarrollo (gestación y la lactancia), o 2) durante la primera semana posterior al destete.

1. En el primer modelo, ratones hembras adultas BALBc / ANN Hsd que se alimentaron con una dieta control o una dieta suplementada con biotina (56 veces la contenida en la dieta control) durante la gestación y la lactancia, no mostraron cambios en el tamaño de la camada y la tasa de supervivencia; sin embargo, el peso corporal de las crías hembras disminuyó, no así el peso de la crías macho. No hubo diferencias en: a) tamaño promedio de los islotes; b) la composición del islote, área positiva a insulina o área positiva a glucagon por área de islote; c) número de islotes por área de páncreas; d) secreción de insulina en islotes aislados o niveles de insulina en suero, ni en las crías macho ni en las crías hembra. A pesar de la falta de efectos sobre la secreción de insulina, las crías hembras de madres suplementadas, mostraron mayor tolerancia a la glucosa y la insulina.

2. En el segundo modelo ratones hembras BALB / cAnN Hsd que fueron alimentadas con una dieta control o suplementada con biotina (56 veces la contenida en la dieta control) a partir del destete durante una semana mostraron un incremento en el número y área de islotes pancreáticos, además de un aumento en la proporción de células beta por islote, comparados con los ratones del grupo control. Estos efectos se relacionaron con el incremento en la proliferación de las células beta. No se encontraron diferencias en la secreción de insulina, las concentraciones de glucosa en sangre o los niveles séricos de insulina.

En conjunto nuestros estudios demuestran que los efectos de la suplementación con biotina en la dieta difieren dependiendo del periodo en la que se administra. Durante la gestación y la lactancia no se producen cambios morfológicos, en tanto que estos parámetros se modifican cuando se administra una semana después del destete y se manifiestan por un aumento en la proliferación, sin la participación de la neogénesis o la apoptosis. En cuanto a la homeostasis de la glucosa, la administración de la dieta suplementada con la vitamina durante la gestación y la lactancia aumentó la tolerancia a la glucosa y a la insulina en las crías hembras, pero no en los machos. Este efecto no se observó cuando la ingesta de la dieta se realizó durante la primera semana después del destete. Es importante señalar que esta investigación demuestra por primera vez que la biotina administrada durante la gestación y la lactancia tiene efectos dependientes del género.

## B. ABSTRACT

Biotin is a water-soluble vitamin from the B group that besides acting as a carboxylase prosthetic group, in pharmacological doses is capable to modify gene expression and diverse biological functions as metabolism, reproduction and embryonic development, and glucose homeostasis.

In a previous study we found that mice fed a biotin-supplemented diet for eight weeks after weaning showed an increase in insulin secretion and expression of genes that participate in islet development. We also found improved glucose tolerance thus increasing glucose-stimulated serum insulin levels, augmenting islet size, and, unexpectedly, modifying islet morphology

Although it has been documented by our group and other researchers that pharmacological concentrations of biotin modify reproduction, development, pancreatic islet morphology and insulin secretion, no studies have addressed the effects of biotin supplementation during on the development of pancreatic islets.

The steps of biotin development morphology and function involve islet genesis and maturation, which are produced during gestational, lactation and first-week post-weaning. In the present work we investigated the effect of a biotin-supplemented diet on pancreatic islet morphology and function during: 1) gestational and neonatal periods; 2) during the first week of weaning.

1. In the first model, female BALB/cAnN Hsd mice were fed a control or a biotin-supplemented diet (56 times that contained in the control diet) during gestation and lactation. Biotin supplementation did not affect reproduction, litter size and survival rate; however, female offspring body weight decreased. Both, male and female offspring of supplemented mothers did not show differences on: a) average islet size; b) islets number; c) proportion of islet's beta- and alpha-cell; d) insulin secretion from isolated islets or serum insulin levels. Despite of the lack of effects on insulin secretion, female, but not male offspring of supplemented mothers showed increased glucose and insulin tolerance. These results indicate that biotin supplementation during development and lactation in mice did not affect reproduction, pancreatic islet morphology and function, but improved glucose homeostasis through changes on insulin sensitivity, surprisingly this effect was gender-specific.

2. In the second model, mice were fed a control or a biotin-supplemented diet (56 times that contained in the control diet) for one week after weaning. Compared to the control,

biotin-supplemented mice showed an increase in pancreatic islet number and area in addition to an augmented proportion of beta-cells in the islet. These effects were related to an increase in beta-cell proliferation. No differences were found in insulin secretion, blood glucose concentrations, or serum insulin levels.

Taken together, our studies demonstrate that the effects of biotin supplementation in the diet differ depending on the administration period. During the gestational and lactation periods the supplemented diet did not affect biotin islet morphology, whereas when administered during the first week post-weaning morphological changes occur, and these changes are produced most likely through proliferation, without involvement of neogenesis or apoptosis. Regarding glucose homeostasis, biotin administration during gestation and lactation increased glucose insulin tolerance in female offspring, but not in males. This effect is related to changes in insulin tolerance. In contrast no changes on glucose tolerance were observed when mice were fed one-week after weaning. The present study found for the first time that a biotin-supplemented diet has sexual dimorphic effects.

### C. ABREVIATURAS

|         |  |
|---------|--|
| ACC     | Acetil-CoA Carboxilasa   |
| Akt/PKB | Proteína sinasa B  |
| AMP     | Monofosfato de adenosina                                       |
| ANOVA   | Análisis de varianza   |
| ATP     | Trifosfato de adenosina  |
| BSA     | Albúmina sérica bovina   |
| Cacna1d | Subunidad 1D del canal de calcio tipo L dependiente de voltaje |
| CAMs    | Moléculas de adhesión  |
| CK20    | Cytokeratina 20  |
| E       | Embrionario  |
| EGF     | Factor de crecimiento epidérmico                               |
| ELISA   | Ensayo inmunoenzimático  |
| EMT     | Transición epitelio mesenquimal                                |
| ES      | Error estándar   |
| Foxa1   | Forkhead box A1  |
| Foxa2   | Forkhead box A2  |
| GABA    | Ácido $\gamma$ -aminobutírico                                  |
| GK      | Glucocinasa  |
| GLP1    | Péptido similar al glucagón tipo 1                             |
| GLP1R   | Receptor del péptido 1 similar al glucagón                     |
| GLUT2   | Transportador de glucosa 2                                     |
| GMPc    | Monofosfato de guanidina cíclico                               |
| GPR119  | Proteína G acoplada al receptor 119                            |
| GSIS    | Secreción de insulina estimulada por glucosa                   |
| GTP     | Guanosín trifosfato  |

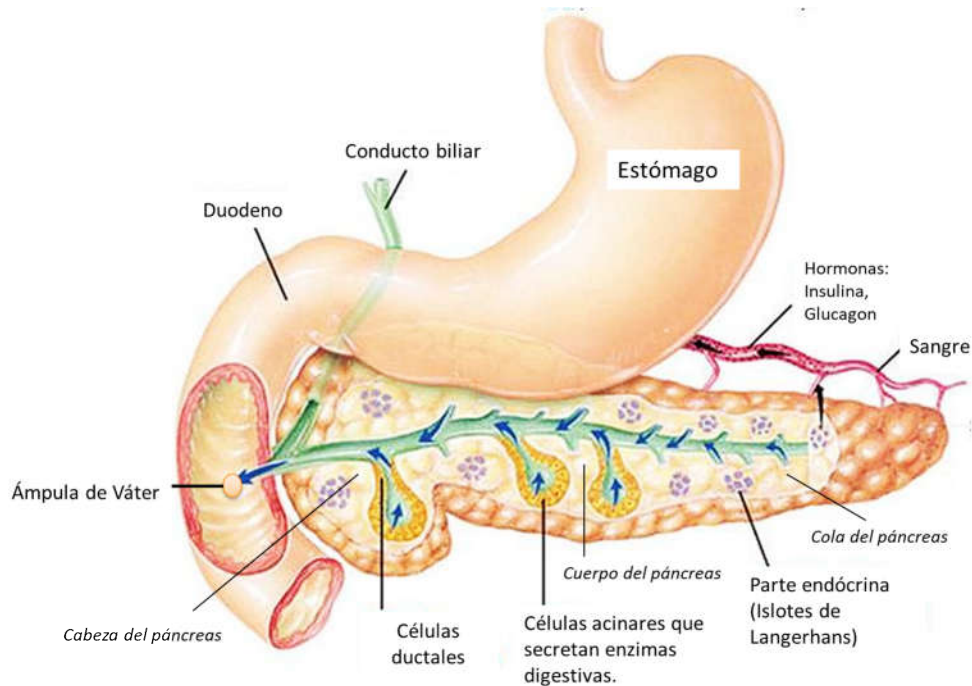


|                   |  |
|-------------------|--|
| HCS               | Holocarboxilasa sintetasa                                |
| Hnf4 $\alpha$     | Hepatocyte Nuclear Factor 4 $\alpha$                     |
| IL-6              | Interleucina-6   |
| INGAP             | Proteina asociada a la neogénesis del islote             |
| MCC               | Metilcrotonil-CoA Carboxilasa                            |
| MPCs              | Células progenitoras multipotentes                       |
| NGF               | Factor de crecimiento nervioso                           |
| Ngn3 <sup>+</sup> | Neurogenina 3  |
| Notch             | Notocorda  |
| P                 | Post-natal   |
| PC                | Piruvato Carboxilasa                                     |
| PCSK1             | Prohormona convertasa 1                                  |
| PDX-1             | Pancreatic Duodenum Homeobox 1                           |
| PI3K              | Fosfatidilinositol 3 cinasa                              |
| PKG               | Protein cinasa G   |
| PP                | Polipéptido pancreático                                  |
| RRP               | Poza de liberación rápida                                |
| SMVT              | Transportador múltiple de vitaminas dependiente de sodio |
| Sox7              | Sex Determining Region Y-Box 7                           |
| TGF               | Factor de crecimiento transformante beta                 |
| TNF               | Factor de necrosis tumoral                               |
| TrkA              | Receptor de tropomiosina cinasa A                        |
| VEGF              | Factor de crecimiento endotelial vascular                |
| 3-HIA             | Ácido 3-hidroxiisovalérico                               |

## D. INTRODUCCIÓN

### D.1. El páncreas

El páncreas es una glándula retroperitoneal ubicada detrás del estómago. Se divide en cabeza, cuerpo y cola; la cabeza está rodeada por el duodeno y la cola está próxima al bazo. Está constituido por dos componentes principales: el compartimento exocrino y el compartimento endocrino (Fig.1).



**Figura 1.** Anatomía del páncreas. Figura modificada de:  
<https://anatomytopics.wordpress.com/2008/12/23/23-anatomy-histology-embryology-of-the-pancreas/>

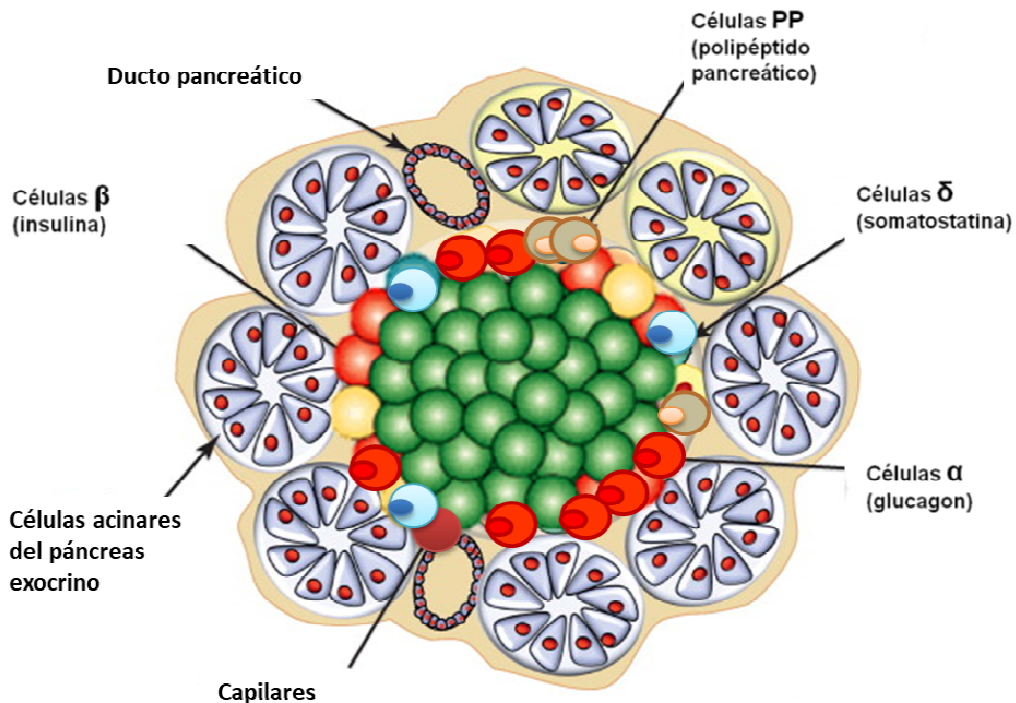
#### D.1.1. El páncreas exocrino

El compartimento exocrino está constituido por: 1) Células acinares que secretan zimógenos necesarios para la digestión de los alimentos; 2) Un epitelio ductal que neutraliza esas enzimas y las transporta a través de diferentes conductos hacia el conducto de Wirsung, para finalmente unirse al colédoco y formar la ampolla de Vater, antes de ser vertida hacia el duodeno.

### D.1.2. El páncreas endocrino

La parte endocrina representa el 2 % del tejido pancreático total y está organizado en agrupaciones de células llamadas islotes de Langerhans [1]. Los islotes de Langerhans fueron descubiertos por Paul Langerhans, un patólogo-anatomista, en Berlín (1869). La capacidad productora de insulina y la importancia funcional de las células beta, no fueron reconocidas hasta 1922, cuando Frederick Banting y Charles Best los descubrieron como fuentes de insulina en perros pancreatectomizados [2].

Los islotes pancreáticos son micro-órganos altamente vascularizados que están constituidos por cinco subtipos celulares que funcionan de manera conjunta para mantener la homeostasis de la glucosa: las células alfa, beta, delta, épsilon y células del polipéptido pancreático, las cuales sintetizan y secretan glucagon, insulina, somatostatina, grelina y polipéptido pancreático, respectivamente [1]. Cada micro-órgano posee un diámetro de 50 a 500  $\mu\text{m}$  y están compuestos por alrededor de 50 a 3.000 células [3] (Fig.2).



**Figura 2.** Estructura y ubicación del islote de Langerhans dentro del tejido exocrino. Figura modificada. <http://www.cell.com/trends/endocrinology-metabolism/home>

### **D.1.3. Organogénesis y morfogénesis del páncreas**

#### **D.1.3.1. Desarrollo embrionario del páncreas**

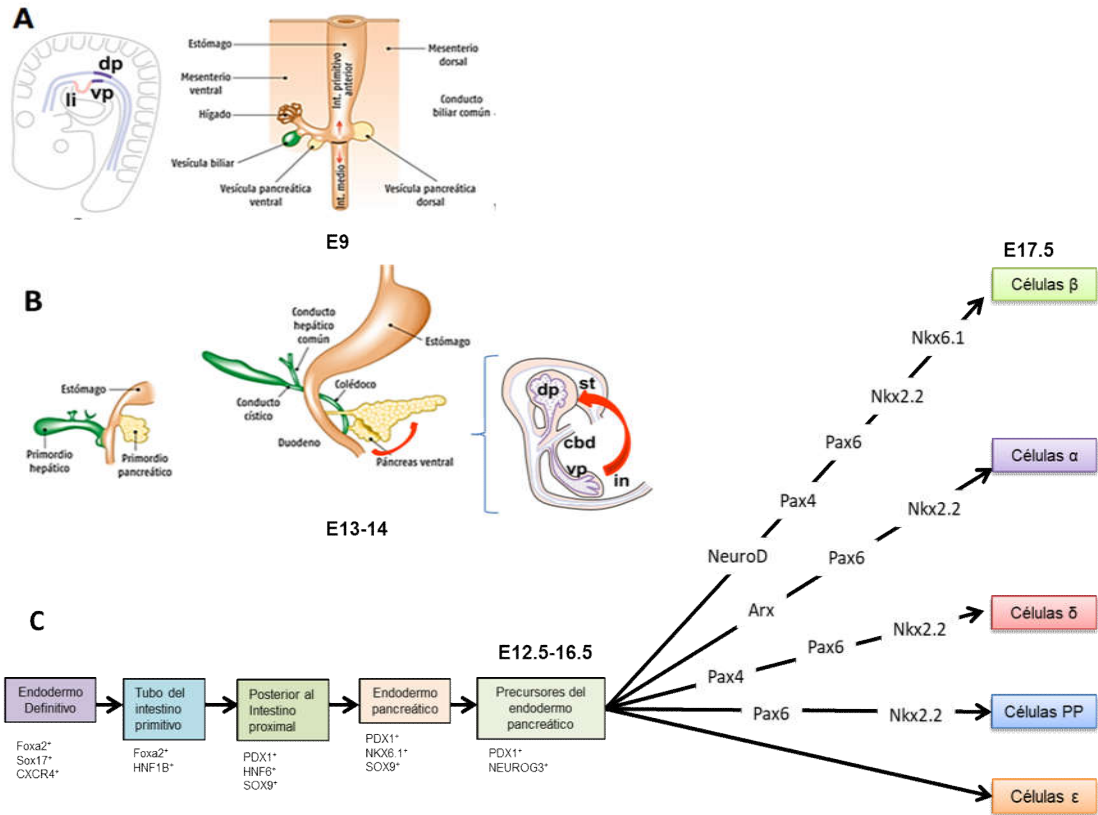
El desarrollo del páncreas es un proceso complejo y altamente regulado que controla la diferenciación y la especificación de las células progenitoras. A diferencia de los humanos, en los roedores el primer paso en el desarrollo pancreático es la especificación del endodermo primitivo, el cual sucede en los días 3-5 post-fertilización, este se caracteriza por la presencia de células precursoras positivas a Sox9 [4]. Luego de la gastrulación, entre el día E6.5 (embrionario 6.5) y E7.5 las células del endodermo definitivo quedan completamente formadas, estas células co-expresan los factores transcripcionales Foxa1 y Foxa2 [5].

La organogénesis del páncreas en los roedores, puede dividirse en dos principales estadios:

##### **D.1.3.1.1. Primer estadio**

En el primer estadio (o transición), señales desde la notocorda, endotelio, y mesénquima, inducen la formación de los primordios pancreáticos y la expansión de células progenitoras multipotentes (MPCs) a partir del día E9 (embrionario 9) [6]. Durante esta etapa, la primera señal visual de morfogénesis pancreática se da cuando dos rudimentos; uno dorsal y otro ventral se hacen visibles en la zona del endodermo del intestino primitivo, que dará lugar al duodeno, estas células pasarán por un proceso de proliferación masiva. El primordio dorsal se forma al día E9 a partir del endodermos primitivo dorsal, mientras que la yema ventral aparece aproximadamente 12 horas más tarde [7]. El primordio pancreático dorsal dará origen a la cabeza, cuerpo y cola del páncreas adulto, mientras que la yema ventral dará origen únicamente a una región de la cabeza [8].

La diferenciación endocrina es aparente desde las etapas más iniciales del desarrollo pancreático. Entre el día E9.5 y E12.5 la mayoría de las células formadas son positivas para glucagon. En el día E10.5 inicia el crecimiento y ramificación del epitelio de los dos primordios pancreáticos, los cuales entre el E13 y el E14 sufren una reorientación y se fusionan en un único órgano bipolar [9].

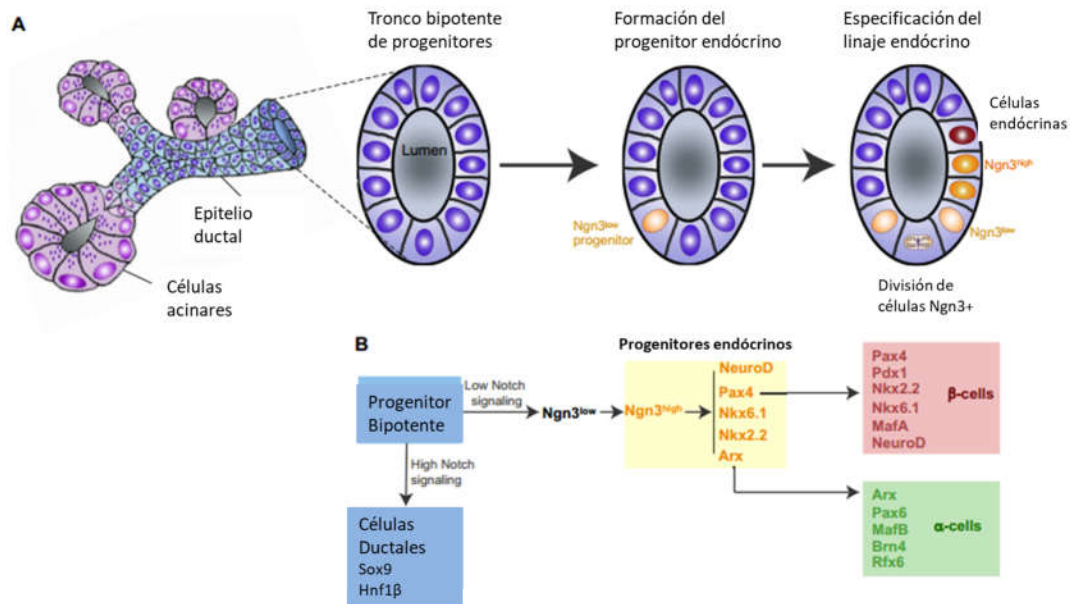


**Figura 3.** Desarrollo embrionario del páncreas de ratón. *Figura modificada.* L. Charles Murtaugh, 2007; R.E. Jennings, 2015 [10,11]. La formación del páncreas inicia en el día E9 (A) cuando se vuelven visibles dos yemas en el endodermo. Al día E13 y E14 pasa por un proceso de fusión de los dos primordios (B). Las células se diferencian hasta originar islotes visibles al día E17.5 (C).

#### D.1.3.1.2. Segundo estadio

A partir del día E12.5 se produce la diferenciación exponencial de las células endocrinas, en su mayoría células beta, a partir de precursores (neogénesis) en la etapa conocida como transición secundaria, esta etapa se caracteriza por la fusión y la remodelación del tejido para la formación de una red epitelial ramificada [9]. Estos eventos morfológicos coinciden con la formación de las tres principales células pancreáticas (endocrinas, exocrinas, ductales), resaltando una asociación entre la morfogénesis y la diferenciación [12].

El regulador maestro para la formación de las células endócrinas es Ngn3, una proteína que se expresa en progenitores Sox9<sup>+</sup>, las primeras células Ngn3<sup>+</sup> aparecen al día E9, cuyo número va en incremento durante el estadio de la segunda transición, pero declina al día E17.5 [13]. El incremento en los niveles de Ngn3 desencadena la formación de células endócrinas y la delaminación del epitelio [14] (Fig.4).



**Figura 4.** Formación de linaje endocrino durante el desarrollo del páncreas. *Figura modificada de Aimée Bastidas-Ponce, et al., 2017 [12].* Los progenitores Ngn3<sup>+</sup>, emergen de progenitores bipotentes presentes en el epitelio entre el E12.5-E16.5. Las células Ngn3<sup>+</sup> darán lugar a progenitores endocrinos post-mitóticos que expresan altos niveles de Ngn3<sup>+</sup> (A). Los niveles de señalización de Notch promueven la especificación de células epiteliales hacia células ductales bipotentes o progenitores endocrinos. La expresión de diferentes factores de transcripción, bajo el control de Ngn3, define la diferenciación de los distintos tipos de células endocrinas (B).

#### D.1.4. Formación del islote

El primer paso para la formación de los islotes involucra la delaminación de diferentes células endocrinas desde el epitelio. Se cree que la expresión de Ngn3 desencadena la maquinaria necesaria para la delaminación a través de un proceso que aún no es claro; sin embargo se han propuesto dos posibles mecanismos: 1) la división celular

asimétrica, y 2) la transición epitelio-mesenquimal (EMT) en la cual las células pierden sus características epiteliales y adquieren un fenotipo mesenquimal [12].

El paso final para la formación del islote luego de la delaminación es la migración de las células endócrinas desde el mesénquima para formar un proto-islote. El mecanismo a través del cual se da la agregación es aún desconocido, pero se cree que éste está mediado por interacciones heterotípicas y homotípicas entre las moléculas de adhesión tales como las caderinas, integrinas, y moléculas de adhesión (CAMs) [15] (Fig.5).

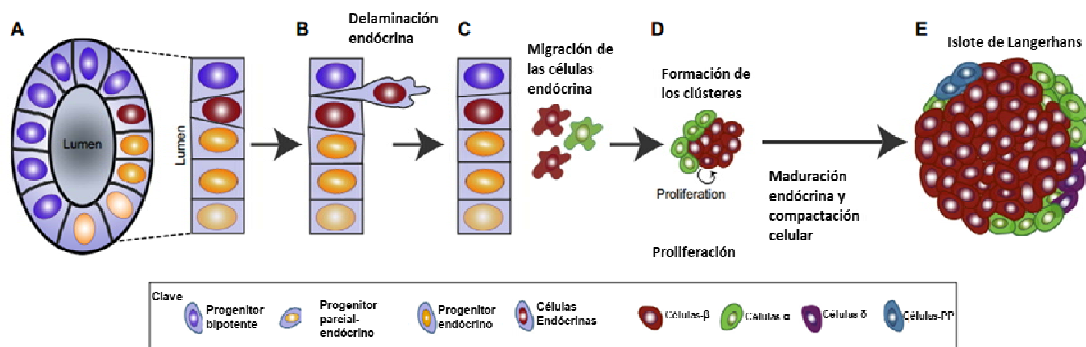


Figura 5. Delaminación, migración y formación del islote de Langerhans. *Figura modificada de Aimée Bastidas-Ponce, et al., 2017* [12]. (A, B) Después de la diferenciación dentro del epitelio, las células endócrinas abandonan el epitelial por deslaminación. (C) Las células endócrinas migran al mesénquima (D) Dentro del mesénquima se agregan para formar un proto-islote. (E) Se generan islotes funcionalmente maduros.

Hacia el día E16 las células endócrinas empiezan a agruparse, pero no 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 después del nacimiento [12]. A medida que los islotes se desarrollan y maduran, adoptan una forma esférica en la cual las  $\beta$ -células, que constituyen aproximadamente el 60-80% de los islotes maduros [16], están situados en el núcleo y están rodeados por un manto de células  $\alpha$  y células  $\delta$ .

El páncreas exocrino empieza a diferenciarse hacia el día E14.5 y en el día E15.5 los acinos ya son claramente distinguibles de los ductos. Por el contrario, se conoce muy poco sobre la diferenciación de las células ductales, a excepción de que la mayoría de

precursores ductales se distinguen de los progenitores de los linajes endocrino/exocrino antes del E12.5.

En humanos, los primordios pancreáticos son evidentes en la semana 4 de gestación y su fusión se produce al final de la semana 6. Células endocrinas positivas para las cuatro hormonas pancreáticas están presentes ya en la semana 10.

#### **D.1.4.1. Número de islotes.**

En roedores, varios estudios han reportado el incremento en el número de islotes o en agrupaciones de células insulino-positivas en el periodo postnatal (desde el nacimiento hasta los dos meses de edad) [17]. Chintinne *et al.*, reportan la existencia de alrededor de 30.000 agrupaciones de células beta de menos de 50  $\mu\text{m}$  formadas entre P2 (día postnatal 2) y 10 semanas en ratas Wistar [18]. Peng *et al.* reportaron en ratones de una semana de edad la presencia de alrededor de 50 islotes por páncreas, y de 900 islotes a los dos meses de edad [19].

#### **D.1.5. Masa de las células beta.**

La masa de las células beta está determinada por el tamaño y el número de células. Se considera que la hiperplasia y la hipertrofia contribuyen al incremento de la masa de las células beta en los animales jóvenes, sin embargo es la hipertrofia la responsable del incremento en la masa de las células beta en los animales adultos [20]. Durante el desarrollo, el incremento en la masa de las células beta está relacionado con el aumento en el peso corporal. Scaglia *et al.*, reportaron en ratas, entre el día P2 (postnatal 2) y el P9, un incremento de 1.8 veces en el peso pancreático, el cual estaba correlacionado con el incremento en el peso corporal. Entre el día P13 y P31 el peso corporal incrementó 2.6 veces, mientras que el peso pancreático incrementó 5 veces [21]. Se ha reportado que en el caso del ratón existe un incremento del peso corporal de 2.6 veces y de 3.7 veces el peso pancreático desde la semana 2 a la semana 4 de edad [22].

Entre los mecanismos que mantienen en equilibrio el número de células beta se encuentran principalmente la neogénesis, la proliferación y la apoptosis [20].

#### **D.1.5.1. Neogénesis.**

Durante la génesis del páncreas, en el desarrollo embrionario, los islotes se forman a partir del epitelio de pequeños conductos y *de novo* a partir del mesénquima pancreático. La neogénesis se define como la formación de células endocrinas a partir



de “precursores” presentes en el epitelio ductal, siendo el mecanismo que predomina en las etapas embrionarias de formación del órgano [23].

En la etapa de vida adulta, el proceso neogénico está relacionado con el mantenimiento y la expansión de la masa de las células beta en situaciones que exigen una alta demanda de insulina como la obesidad, el embarazo, una pancreatometomía parcial o un trasplante de islotes [24]. Los precursores de células beta presentes en el ducto han sido difíciles de caracterizar. Sin embargo en el feto se ha reportado como marcadores GLUT2, TrkA y Vimentina. En el adulto no existe un marcador, sin embargo la co-expresión de CK20 con insulina o glucagon han sido utilizadas como marcadores neogénicos, aunque estas células se encuentren en un estado tardío de diferenciación, haciendo que la co-expresión no indique un evento temprano de neogénesis [25].

Existe un gran número de factores que controlan la neogénesis del epitelio ductal entre ellos están algunos factores de crecimiento (TGF alfa o beta, EGF, NGF, y VEGF), factores inflamatorios (IL-6 y TNF alfa), varias hormonas como GLP1 y factores de regeneración (INGAP) [25].

#### **D.1.5.1.1. Proteínas REG (INGAP)**

Existen varias subfamilias de proteínas REG, entre ellas encontramos a RegI que fue descubierta durante la regeneración de islotes de rata que fueron sometidas a una pancreatometomía, razón por la que se le dio el nombre de proteína de regeneración. Se ha reportado la presencia de Reg I durante la proliferación de islotes, de tejido acinar, y en procesos de regeneración, pero está ausente durante un estado fisiológico normal [26].

Reg II, solo ha sido reportado en ratones y en hámster, sin embargo presenta una homología del 76% y del 63% con Reg I $\alpha$  y Reg I $\beta$  de humano. La expresión de Reg II se restringe al tejido acinar de páncreas sano, aunque también se expresa en islotes hiperplásicos [26].

Reg III, es la tercera subclase de la familia Reg, se conocen varios tipos; Reg III $\alpha$ , Reg III $\beta$ , Reg III $\gamma$ , y Reg III $\delta$ . En el ratón, Reg III $\delta$  ha sido detectado en células exocrinas y células endocrinas [27]. Reg III muestra una secuencia de aminoácidos que guardan una homología del 72% con el Péptido INGAP-rp, y una homología del 77% en una secuencia de cDNA lo cual sugiere que INGAP es un ortólogo de Reg III $\delta$  [28].

Se ha demostrado que INGAP participa en la regeneración de células beta en varios modelos animales de diabetes inducida por estreptozotocina o modelos de daño pancreático por ligación del ducto [29].

Pittenger *et al.* reportaron la presencia de INGAP en células acinares y células endocrinas del islote en roedores, después de haber sido sometidos a un daño pancreático ocasionado por la envoltura de celofán [30]. Otro estudio realizado en crías de hámster alimentadas con una dieta rica en sacarosa durante la gestación reveló un incremento en la masa de células beta y un mayor número de células positivas a PDX-1 e INGAP. Estas células presentaban una elevada tasa de proliferación, pero no eran positivas a insulina, glucagon o somatostatina, por lo que se concluyó que se trataban de precursores de células endocrinas [31].

#### **D.1.5.2. Proliferación**

La expansión rápida de la masa de las células beta ocurre en el periodo tardío de la gestación, la actividad mitótica se restringe a un número limitado de células beta ( $\leq 10\%$ ) que pueden entrar en el ciclo celular [32]. La tasa de proliferación celular ( $10\%$ ) fue calculada a partir de los índices mitóticos observados en las células beta. Es decir en el páncreas fetal donde el número de células beta incrementa con una tasa de  $\sim 100\%$  por día, la división de las células beta no puede ser más del  $10\text{-}20\%$  del total del crecimiento. El  $80\%$  restante ha sido atribuido al proceso de neogénesis [33].

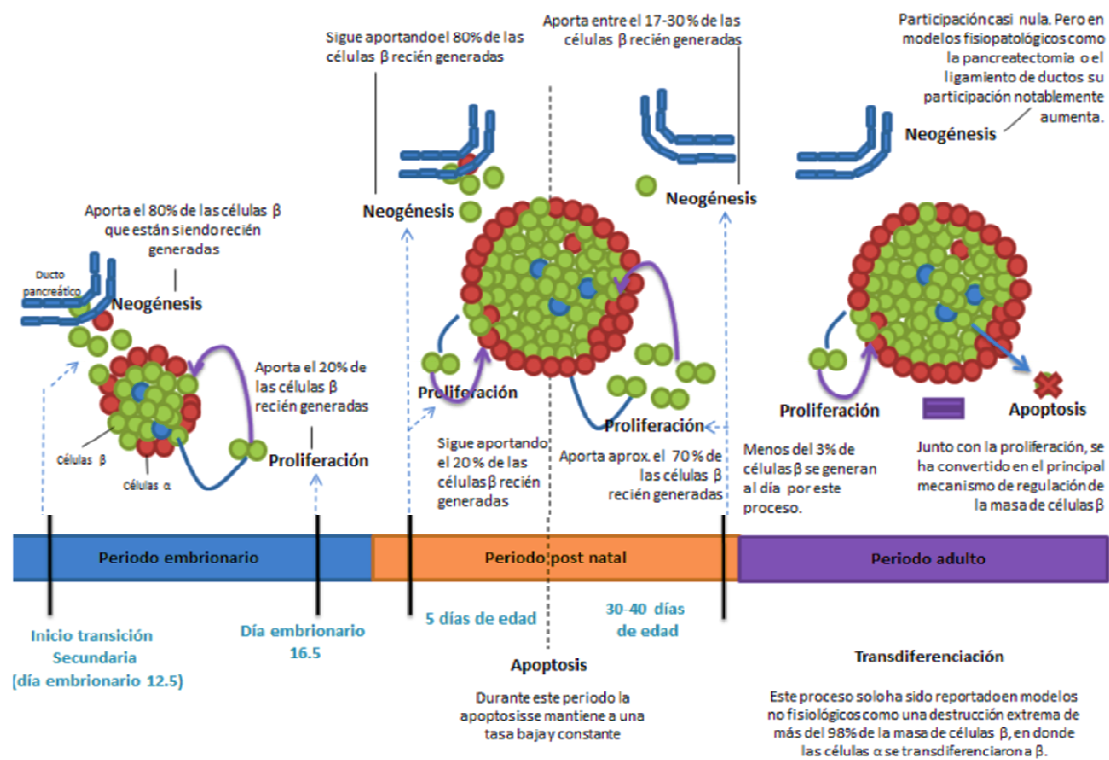
La proliferación declina en la etapa postnatal, Finegood *et al.* reportan en ratas de entre 30 a 100 días de edad, que la proliferación de las células beta disminuye desde  $\sim 20\%$  (por día) en las crías hasta  $\sim 10\%$  (por día) en jóvenes, para finalmente mantenerse en  $\sim 2\%$  en la etapa adulta con un promedio de replicación de  $1\text{-}4\%$  de células beta (por día) [34]. De manera similar Montanya *et al.*, reportaron una disminución en la proliferación al  $0.8\%$  (por día), en ratas de un año de edad, que posteriormente mostraron un promedio de proliferación estable del  $0.2\%$  [20].

Teta *et al.*, demostraron que las células beta de ratones de un año de edad poseen una tasa de proliferación muy baja, con una evidencia mínima de recambio de 1 en  $\sim 1400$  células adultas por día ( $< 1\%$ ) [35]. En otro estudio, Stolovich-Rain *et al.*, encontraron que en ratones jóvenes (5 semanas de edad) hubo una replicación en el  $2.5\%$  de las células beta, a diferencia de las células de ratones viejos que alcanzan un tasa de replicación de apenas el  $0.2\%$ . La tasa de replicación de células beta en un modelo de ablación, usando la toxina diftérica, alcanza el  $7.5\%$  en ratones jóvenes, y

un 1% en ratones viejos [36], lo que sugiere la existencia de una capacidad intrínseca de replicación que se mantiene en la vejez [37].

### D.1.5.3. Apoptosis

La apoptosis de las células beta o muerte celular programada, se produce en tasas muy bajas durante la embriogénesis. Scaglia et.al., reportaron una tasa basal de apoptosis de 1.54% durante el día P2 y P9 que se repetía al día P20. Sin embargo también reportó un incremento significativo en la tasa de apoptosis (3.64 %) entre el día P13 y P17 [21]. La disminución y el incremento en la apoptosis, presentes en diferentes etapas del desarrollo, sugieren que la apoptosis es un mecanismo importante para la remodelación del islote pancreático y el mantenimiento de la masa de las células beta.



**Figura 6.** Dinámica de los procesos que regulan la masa de las células beta [20,21,34,35].

### **D.1.6. Las células beta**

Las células beta son el tipo celular predominante dentro del islote pancreático en los mamíferos. Su función principal es la de secretar insulina en respuesta a nutrientes, hormonas y estímulos nerviosos, para mantener los niveles de glucosa en plasma. De acuerdo con la arquitectura anatómica de los islotes será como las células beta modulen la función de las demás poblaciones celulares, a través de interacciones paracrin/autocrin [38].

#### **D.1.6.1. La función de las células beta.**

Las células beta tienen la capacidad de producir y almacenar grandes cantidades de insulina. Dentro de las células beta, la insulina se sintetiza por medio de una serie de moléculas de una sola cadena, incluyendo la preproinsulina, la proinsulina y varios productos de corte intermedios. Dentro del Golgi, la pro-insulina es cortada por las prohormonas convertasas (PC1 y PC2) para posteriormente convertirse en insulina madura. [3].

La insulina activa será almacenada en los gránulos secretores (5-10.000 por célula), cada gránulo contiene 300.000 o más moléculas de insulina. La liberación o exocitosis de la insulina se encuentra altamente regulada, lo que permite la salida de aproximadamente el 2 % de insulina por hora bajo una concentración máxima de glucosa [39]. La regulación de la secreción de insulina es importante no solo para prevenir la hiperglicemia, sino también para evitar una hipoglicemia letal que podría acompañar una sobre-secreción de insulina.

#### **D.1.6.2. Secreción de insulina.**

Las células beta responden a varios nutrientes presentes en la circulación como la glucosa, otros monosacáridos, aminoácidos, y ácidos grasos. Tanto en roedores como en humanos la secreción de insulina inducida por glucosa es de mayor intensidad que la estimulada por proteínas o grasa. Se ha reportado que la ingestión oral de 75 g de glucosa provoca una liberación de insulina de 250 a 300 pmol/L en 30 minutos partiendo de una basal de 20 a 30 pmol/L, a diferencia de la administración de una

cantidad similar de grasa o de proteína que solo incrementa los niveles de insulina entre 50-60 pmol/L [40].

La secreción de insulina es bifásica, poco después de que la célula beta recibe el estímulo de la glucosa hay un primer pico de secreción de insulina, seguido de una disminución en la secreción. Una segunda fase sostenida de secreción de insulina sigue a este decremento, la cual puede continuar durante horas hasta que alcance la euglicemia [41].

La glucosa ingresa a la célula beta por medio del transportador de glucosa 2 (GLUT 2), el cual se expresa de manera constitutiva en las células beta. Se trata del primer sensor de glucosa y es el único transportador de glucosa en las células beta. GLUT2 se expresa también en el hígado, y en menores cantidades en las células renales e intestinales, a diferencia de GLUT4 el cual se expresa en las células del músculo y del tejido adiposo. La translocación de GLUT2 hacia la membrana plasmática es independiente de la acción de la insulina, y el transporte de la proteína muestra una baja afinidad por su sustrato, lo cual asegura el flujo de glucosa [42].

Luego del ingreso de la glucosa hacia la célula beta, ésta se fosforilará por acción de la glucocinasa, un subtipo de hexocinasa. A diferencia de las otras hexocinasas, la glucocinasa presenta una afinidad relativamente baja para la glucosa, su  $K_m$  es de 6 mmol/L. La glucocinasa no es inhibida por su producto, lo cual le permite continuar con su actividad a pesar de las altas cargas de glucosa [42]. Una vez fosforilada la glucosa es metabolizada mediante la vía glicolítica hasta la producción de piruvato, éste será oxidado a través del ciclo de Krebs para producir ATP. El incremento en la relación ATP/ADP, de manera secuencial lleva al cierre de los canales de potasio dependientes de ATP, la despolarización de la membrana plasmática, la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje, el flujo de calcio y la activación de la exocitosis de los gránulos de insulina. Algunos de los productos derivados de este proceso pueden actuar como señales para la secreción de insulina en los que incluyen el NADPH, malonil-CoA y glutamato [42].

Aunque el incremento en las concentraciones intracelulares de calcio es la primera señal que dispara la exocitosis de insulina estimulada por la glucosa, hay otras señales celulares activadas por la glucosa que también juegan un papel en este proceso; tales como AMPc, GMPc, inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG) [43].

La secreción de insulina es un proceso que involucra la fusión de los gránulos de insulina con la membrana plasmática y la exocitosis del contenido del gránulo. La secreción de insulina muestra un patrón bifásico de secreción. En el caso de los humanos, cuando la concentración de glucosa en el plasma es de ~7 mM, la primera fase de secreción de insulina alcanza 1.4 nmol/min y termina ~10 minutos. La segunda fase alcanza una concentración de ~0.4 nmol/min [44]. En el caso de los ratones el patrón bifásico de la secreción es menos marcado que en las ratas o en los humanos debido a que poseen una concentración basal de insulina más alta (8-9 mmol/L vs. 4-5 mmol/L en ratas o humanos) [45]

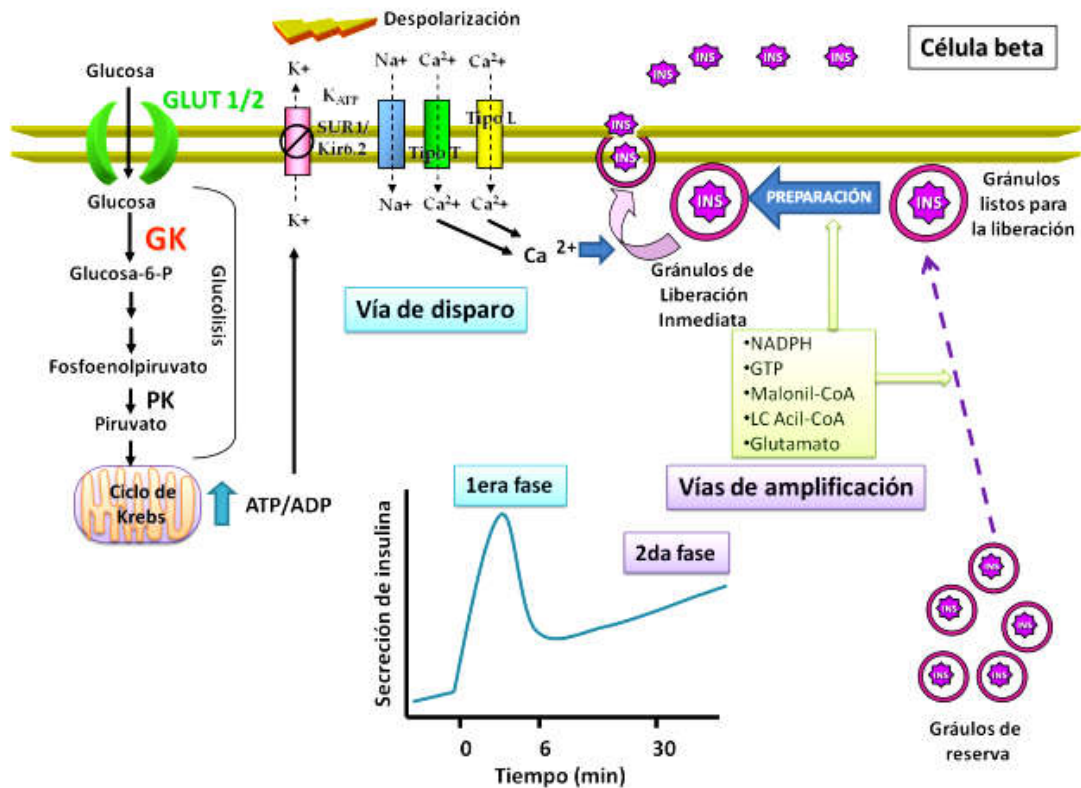


Figura 7. Secreción de insulina. Lazo de la Vega, et al., 2011.

Una fracción de gránulos de insulina (1%), denominados como poza de liberación rápida (RRP) son los que contribuyen a la liberación inmediata de insulina desencadenada por la glucosa. Los gránulos restantes (99 %) pertenecen a la poza de reserva. Cuando la poza de liberación rápida se agota, será restituida por los gránulos

de reserva. Los gránulos de liberación inmediata son los responsables de la primera fase de secreción de insulina [42].

En el punto más bajo de la secreción, situado entre las dos fases, los gránulos de liberación lenta se convierten en gránulos de liberación inmediata, antes de translocarse hacia la membrana plasmática. Se trata de un proceso dependiente de ATP que se denomina preparación o “priming” [42].

Se considera que la secreción de insulina y la exocitosis de los gránulos de liberación rápida podrían ocurrir aun en ausencia de nutrientes, mientras que la segunda fase de secreción y la restitución de la poza de liberación rápida son estrictamente dependientes de productos metabólicos. La primera fase de secreción de insulina llega a tardar alrededor de 10 minutos, y la restitución de la poza de liberación rápida ocurre en ~1 segundo [42].

#### **D.1.7. Cito-arquitectura de los islotes pancreáticos.**

##### **D.1.7.1. En roedores**

Para el caso de ratones de laboratorio (*Mus musculus*) y ratas (*Rattus norvegicus*), la morfología de sus islotes ha sido bien definida. Se trata de estructuras con un núcleo central de células beta que representan el 60 al 80% del total de células del islote pancreático, se encuentran rodeadas por otro tipo de células endocrinas que incluyen las células alfa (15-20 % de las células del islote), células delta (<10 % de células), células PP (<1 % de células) y las células épsilon (<1 % de células). Las células alfa están presentes en muchas de las secciones del islote y forman una capa continua que rodea el núcleo de células beta [46]. Sin embargo un análisis tridimensional mostró que las células alfa están localizadas en la periferia del islote, pero no envuelven todo el núcleo de células beta, de modo que las células beta quedan expuestas en la capa externa del islote, similar a la disposición celular en los islotes de humanos [16].

Estudios realizados en islotes de ratones que se encuentran en diferentes estados fisiológicos; como la diabetes, embarazo y obesidad, revelan un alto grado de plasticidad. En el caso de islotes de ratones diabéticos *db/db* que tienen mutado el gen de la leptina, muestran una organización de células alfa similar a la de los humanos [47]. Islotes de ratones gestantes mantienen una distribución similar al encontrado en

ratones normales, excepto por la aparición de una población menor de células alfa en el centro del islote, especialmente en los islotes pequeños [16,47].

La distribución de los islotes en el páncreas difiere, algunos estudios sugieren que hay un número mayor de islotes en la cola del páncreas comparado con los existentes en la cabeza [48]. Sin embargo otros estudios sostienen que la distribución es similar en las diferentes regiones del páncreas en un ratón adulto [46].

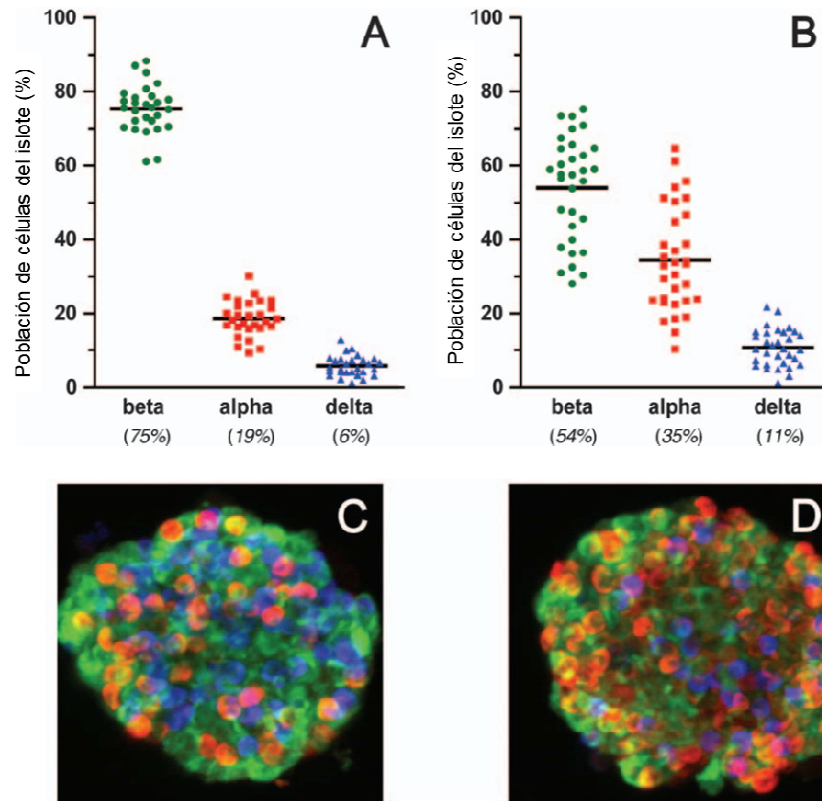
#### **D.1.7.2. En humanos**

Los islotes de los humanos poseen una menor cantidad de células beta y mayor cantidad de células alfa, comparados con los islotes de los roedores. Las células alfa, beta y delta están distribuidas aleatoriamente por todo el islote. Los islotes de humanos adultos están constituidos por aproximadamente el 50 % de células beta, un 40 % de células alfa, el 10 % de células delta y pequeñas cantidades de células PP [49].

Estudios sobre la estructura de los islotes durante el desarrollo de los humanos sugiere que la organización de las células endocrinas en edad embrionaria es similar a la de un ratón adulto [50]. Entre la semana 12-14 de gestación, las células endócrinas están agrupadas con las células beta al centro y las células alfa hacia la periferia. Sin embargo a la semana 18 de gestación la capa de células alfa y delta se disocian y se distribuyen en el todo el islote [50].

En humanos obesos, el número de células beta incrementa para compensar el incremento en la demanda de insulina [51]. En pacientes con diabetes tipo 2 hay una reducción en el número de células beta debido a un incremento en la apoptosis; sin embargo la morfología del islote no difiere de manera significativa entre pacientes diabéticos y sujetos no diabéticos [52]. En el caso de los pacientes con diabetes tipo 1, hay una disminución drástica en la masa de las células beta, dando islotes con el 50-70 % de células alfa [53].





**Figura 8.** Citoarquitectura de los islotes pancreáticos. *Figura Modificada de Brissova, et. al., 2005 [54].* Población y disposición de células endocrinas en el islote de ratón, mayor cantidad de células beta (A, C); Población y disposición de células endocrinas en el islote de humano, menor proporción de células beta y mayor cantidad de células alfa hacia el centro del islote (B, D).

#### D.1.8. Maduración de las células beta en roedores

En el periodo neonatal, las células beta se caracterizan por una función secretora inmadura y una alta tasa de proliferación. Durante su maduración, las células disminuyen su capacidad replicativa y adquieren una capacidad funcional, particularmente la secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS) [17].

##### D.1.8.1. Maduración de la secreción de insulina

En el periodo fetal y neonatal las células beta inmaduras no responden al estímulo dado por la glucosa, sin embargo son capaces de responder al estímulo dado por otros nutrientes como los aminoácidos [55]. Otra característica reportada para las células beta inmaduras es su incapacidad de bloquear la secreción de insulina de

manera eficiente, aún cuando los niveles de glucosa son bajos, una característica importante de las células beta maduras que les proporciona protección contra la hipoglucemia [17].

La exposición de las células beta inmaduras a la glucosa puede favorecer su maduración. Frenkel y Hellestrom mostraron que islotes de ratas de edad fetal cultivadas por ocho días con una concentración de 11 mM poseen niveles de insulina secretada similar a la de una célula beta adulta [56]. Bliss *et al.*, demostraron que islotes de ratas aislados y perfundidos con glucosa, presentan una GSIS (secreción de insulina estimulada por glucosa) a partir del día P14 (postnatal 14), sin embargo al día P21 la maduración de la secreción de insulina al estímulo de la glucosa aún no ha sido alcanzado [57]. Esto parece estar dado porque existe un gran número de células beta que son generadas durante el primer mes de vida postnatal, cuya inmadurez opaca la secreción robusta de la población madura de células beta [17].

Las células beta inmaduras presentan una disminución en la expresión de diversos genes que están involucrados en el proceso de maduración. Se ha documentado que genes como la piruvato carboxilasa, malato deshidrogenasa, y glicerol fosfato deshidrogenasa 2, presentan una disminución en la expresión de su mRNA al día postnatal 1. Sin embargo éstos alcanzan los niveles de expresión de mRNA de un adulto hasta el día postnatal 28. Sugiriendo que son las lanzaderas mitocondriales las que no están completamente desarrolladas, especialmente el *glicerol-fosfato, malato-aspartato, piruvato-citrato y piruvato-malato*, los que serán las responsables de desencadenar una producción deficiente de ATP y subsecuentemente de insulina [58].

Entre otros genes con baja expresión característicos de células beta inmaduras se encuentran la *insulina, glut 2, PCSK1, y GLP1R*, que sólo alcanzan los niveles de un adulto hasta el día P28 [59].

#### **D.1.8.2. Ventanas críticas en el desarrollo del islote.**

Una ventana crítica se define como un periodo de importantes cambios estructurales y funcionales que ocurren durante el desarrollo normal del órgano, periodo donde la exposición a ciertas alteraciones medioambientales pueden tener consecuencias en la vida adulta del órgano [60]. Se ha encontrado que para el islote la vida fetal y neonatal

representa una “ventana crítica” [61,62] y que estos periodos son importantes para alcanzar un control glucémico eficiente en las etapas adultas.

Se cree que defectos en el desarrollo y maduración de las células beta promueven el desarrollo de enfermedades de tipo metabólico. Se ha reportado también que una falla en la expansión de la masa de las células beta determina la susceptibilidad a desarrollar diabetes en la etapa adulta [33].

Estudios epidemiológicos realizados en diferentes poblaciones [62] indican que el estado nutricional prenatal y postnatal temprano podrían estar influyendo en la susceptibilidad de desarrollar una inadecuada tolerancia a la glucosa, enfermedades cardiovasculares y obesidad.

Varios modelos animales apoyan la hipótesis de que la nutrición prenatal y postnatal afecta permanentemente el metabolismo. En un modelo de restricción en el crecimiento intrauterino (IUGR), se observó que la masa de células beta no muestra diferencias significativas entre las semanas 1-7 de edad, sin embargo a la semana 15 se observa una disminución en la masa de las células beta de un 50% [63]. La malnutrición perinatal también conduce al desarrollo de diabetes tipo 2 en etapas adultas, aparentemente por la incapacidad de adaptación de la masa de las células beta a las demandas metabólicas [64]. En otro modelo de restricción alimentaria materna, se encontró que desde el nacimiento hasta los tres meses de edad, las crías muestran una disminución en la masa de las células beta con una replicación celular incrementada, sin embargo el incremento en la proliferación es insuficiente para restaurar la masa de células beta en la vida adulta [65].

Una nutrición deficiente o alterada, provocada por diferentes tipos de dietas; dietas con restricción calórica o proteica [66–71], dietas altas en grasa o carbohidratos [72,73], o dietas con deficiencia de vitamina A [74], afectan el desarrollo y la maduración del islote pancreático disminuyendo su capacidad de responder a retos metabólicos en etapas tardías de la vida. Aunque los efectos detrimentales sobre el islote provocados por diversas condiciones han sido bien documentados [68,70,71,73,75] pocas son las investigaciones que se han dedicado al estudio de agentes farmacológicos que favorezcan propiedades de maduración del islote [76,77]. La vitamina biotina podría tener efectos que favorezcan el proceso de maduración del islote pancreático.

## D.2. Biotina

Es una vitamina hidrosoluble del complejo B, sintetizada por las plantas y en mayor cantidad por hongos y bacterias. Los mamíferos, las aves, y los humanos no pueden sintetizar biotina *de novo* por lo que es necesario que sea consumida a través de la dieta.

### D.2.1. Estructura

Se trata de una molécula que está compuesta por dos anillos unidos a una cadena de ácido valérico. El primer anillo contiene un grupo ureido (N-CO-N), el cual está involucrado en la unión con la avidina, y el segundo anillo está formado por un grupo tetrahidrotiofeno el cual se une al ácido valérico. Existen ocho estereoisómeros de biotina, el isómero D-biotina es el único biológicamente activo [78].

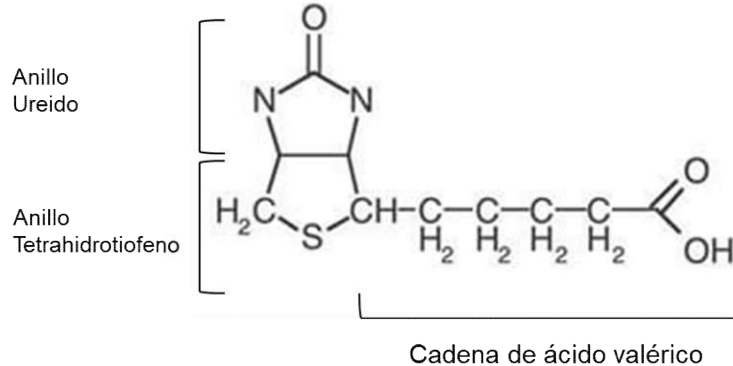


Figura 9. Estructura química de la biotina.

### D.2.2. Ingesta adecuada de biotina

La ingesta adecuada de biotina dada por la *Food and Nutrition Board of Washington* sugiere para los adultos y mujeres embarazadas una dosis de 30 µg/día [79]. Se ha sugerido que durante la lactancia, la ingesta recomendada de biotina para las madres es de 35 µg/día; y para los infantes (0 a 5 meses) de 5 µg/día. Estas recomendaciones estuvieron basadas en dos estudios; uno de ellos encontró que la dosis diaria de 60 µg/día, era suficiente para mantener a adultos con nutrición parenteral libre de síntomas de deficiencia por 6 meses [80], el segundo estudio reportó que dietas diarias de 28 a 42 µg/día no presentaban síntomas de deficiencia de biotina [81].

### **D.2.3. Biodisponibilidad de la biotina**

La biotina está ampliamente distribuida en los alimentos, no obstante sus concentraciones están por debajo de los niveles encontrados para otras vitaminas hidrosolubles [82].

La biotina en la dieta está presente en dos formas; como biotina libre, o unida covalentemente a proteínas a través de un residuo de lisina [83]. La biotina ligada a las proteínas es liberada por la acción hidrolítica de una proteasa conocida como biotinidasa. El mensajero de esta enzima es sintetizado por el páncreas y en menores cantidades por la mucosa intestinal. La biotinidasa está presente en tejidos como el corazón, cerebro, hígado, pulmón, músculo esquelético, riñón, plasma y placenta. También se encuentra en la leche materna (particularmente elevada en el calostro), donde se cree que ayuda en el transporte de biotina hacia la glándula mamaria para la nutrición del infante [84].

Las concentraciones de biotina reportadas en el plasma difieren considerablemente, debido a la dificultad de detectar la biotina unida covalentemente a las proteínas. Sin embargo existe evidencia de que el 81% de biotina se encuentra en su forma libre, el resto se encuentra como; bisnorbiotina y sulfoxido de biotina. La biotina libre se transporta desde el intestino a los tejidos periféricos (hígado, barrera hematoencefálica, y placenta) disuelta en la fase acuosa del plasma [85].

El 12% de la biotina plasmática total se encuentra unido covalentemente a proteínas y alrededor del 7% es de unión reversible [85].

#### **D.2.3.1. Digestión de la biotina contenida en la dieta.**

##### **D.2.3.1.1. Absorción**

La biotina es una vitamina hidrosoluble que está cargada negativamente a pH fisiológico, debido a la presencia de su grupo carboxilo, por lo cual necesita un mecanismo de transporte para atravesar las membranas biológicas. En 1998 Prasad *et al.*, aislaron cDNA de placenta de rata y determinaron que el producto protéico de SMVT1 (transportador multivitamínico 1 dependiente de sodio) era capaz de mediar el transporte de biotina, ácido pantoténico y ácido lipoico en células HeLa [86].

SMVT 1 es una proteína transmembranal compuesta por 634 aminoácidos con un peso molecular de 69 kD, se encuentra localizada en la porción apical de los enterocitos. La constante de afinidad de SMVT1 para el ácido pantoténico y lipoico es

de 1~5  $\mu\text{M}$ , la cual corresponde a la concentración de ácido pantoténico circulante (0.886-4.59  $\mu\text{M}$ ), a diferencia de la constante de afinidad de SMVT1 para la biotina que es de ~15  $\mu\text{M}$ , cuando la concentración de biotina libre en circulación es de ~0.5-2 nM [82]. Esto nos sugiere que la ingesta de biotina puede inhibirse por el ácido pantoténico, o el ácido lipoico.

#### **D.2.3.1.2. Transporte celular**

El transporte de biotina a través de la membrana plasmática se da por medio del transportador SMVT1 [86–88]. Aunque SMVT1 es sin lugar a duda el principal transportador de biotina en los mamíferos, existe evidencia de que el transportador 1 de monocarboxilatos (MCT1) también contribuye en el transporte de biotina en algunos tejidos como las células mononucleares de sangre periférica y los queratinocitos [89,90]. El *Transportador de monocarboxilatos (MCT1)* es un miembro de la familia de transportadores de monocarboxilatos que facilitan la ingesta de biotina con una  $K_m$  tres veces menor a la usada por el SMVT, además de que no es inhibido competitivamente por el ácido pantoténico o lipoico.

#### **D.2.3.1.3. Distribución en tejidos**

Se sabe que existen reservas de biotina en el hígado, donde se han encontrado concentraciones de 800 a 3000 ng/g [78]. La mayoría localizada principalmente en la mitocondria, y el citoplasma, mientras que solo el 0.7% se encuentra en el núcleo [91].

En el caso del feto se ha reportado que la biotina se transporta por medio del transportador multivitamínico de vitaminas (SMVT). Las concentraciones de biotina en el plasma fetal son de 3 a 17 veces más altos que los niveles maternos. En la leche materna los niveles de biotina exceden a la presente en el plasma de la madre en 10 a 100 veces [78].

#### **D.2.3.1.4. Eliminación**

Tanto en los microorganismos como en los mamíferos, el grupo sulfuro del anillo tetrahidrotiofeno puede ser oxidado en biotín sufoxido *d* o/y en sulfonas de biotina. La cadena de ácido valérico puede ser oxidado, probablemente a través de la vía de la beta oxidación, de manera similar a la oxidación de los ácidos grasos, para generar bisnorbiotin y tetranorbiotin [92].

Avances recientes en la evaluación del estatus de la biotina han sido logrados a través de la cuantificación del ácido 3-hidroxiisovalérico (3-HIA), un metabolito intermedio que

se acumula y que es excretado debido a la pérdida de la actividad de la metilcrotonil – CoA carboxilasa durante la deficiencia de biotina [93].

Alteraciones en la excreción urinaria del ácido 3-hidroxiisovalérico puede detectarse en los 15 primeros días posteriores al consumo de dietas deficientes de biotina [94]. A pesar de que la prevalencia de casos de deficiencia de biotina es rara, hay suficiente evidencia que indica la existencia de varios estados fisiológicos y farmacológicos en los cuales las concentraciones de biotina se encuentran comprometidas. Entre ellos están; los errores innatos del metabolismo de la biotina el cual resulta en una deficiencia de biotina funcional o secundaria [95], y la deficiencia de biotinidasa que provoca una absorción ineficiente de biotina en el intestino [96].

Estudios recientes han sugerido una proporción significativa de mujeres que a la mitad o al final del embarazo presentan un balance negativo en las concentraciones de biotina [97] lo cual está apoyado por el incremento en la excreción de ácido 3-hidroxiisovalérico y con la disminución de la excreción de biotina en la orina.

#### **D.2.4. Biotina en la leche humana**

Las concentraciones de biotina en la leche varían sustancialmente dentro de cada población estudiada, y varían significativamente durante las 24 horas del día. Se ha documentado que las concentraciones de biotina incrementan de 5 a 30 veces en el período de transición de calostro a leche madura [98]. En un estudio realizado por Coryell *et.al.*, [99] en mujeres lactantes; en el que se analizaron 48 muestras diarias durante los primeros diez días postparto, se encontró que los niveles de biotina para los primeros cuatro días era de 0.10 µg por 100 ml. y de 85 muestras de leche madura, obtenidas durante los 2 a 10 meses postparto, la concentración de biotina durante los dos y tres meses postparto fue de 0.8 µg por 100 ml. Cuando se incluye una dieta con alimentos ricos en biotina, como el hígado, las concentraciones de biotina en leche al noveno día postparto incrementó de 0.09 a 2.56 µg por 100 ml [99]. Mock *et.al.*, encontraron que las concentraciones de metabolitos inactivos como la bisnorbiotin y la biotin sulfoxido en la leche humana es sustancial, metabolitos que probablemente afectan la cuantificación de biotina y su absorción [100].

La concentración de biotina encontrada en la leche humana está en un rango de 30 a 70 nmol/L, la cual aproximadamente el 95% se encuentra como biotina libre [100]. Sus niveles son de 20 a 50 veces más grandes que los encontrados en el plasma [101]. En la leche humana encontramos biotinidasa, la cual presumiblemente facilita la utilización de biotina por el infante [100].

### **D.2.5. Síntesis por la Microflora intestinal**

Una segunda fuente de biotina es la producida por los organismos de la microflora intestinal. Esta fuente fue detectada debido a que tanto en ratas como en humanos la cantidad total de biotina excretada era mayor a la cantidad consumida en la dieta [82]. Sin embargo, el tratamiento intratecal, en cerdos, con antibióticos o estreptavidina para inhibir el crecimiento microbiano redujo de manera significativa la cantidad de biotina derivada de la flora bacteriana, pero no afectó de manera significativa los niveles de biotina en suero o la cantidad de biotina excretada en la orina, lo cual sugiere que la fuente de biotina de la microflora no contribuye de manera significativa [102].

### **D.2.6. Toxicidad**

Existen pocos estudios sobre la toxicidad de la biotina [103,104]. El DL50 oral para ratas y ratones es de 10 g/kg y 354 mg/g, respectivamente [103]. El DL50 intraperitoneal reportado para ratas es de 29 mg/kg de peso corporal, y el DL50 intravenoso para ratones de 1000 mg/kg [103].

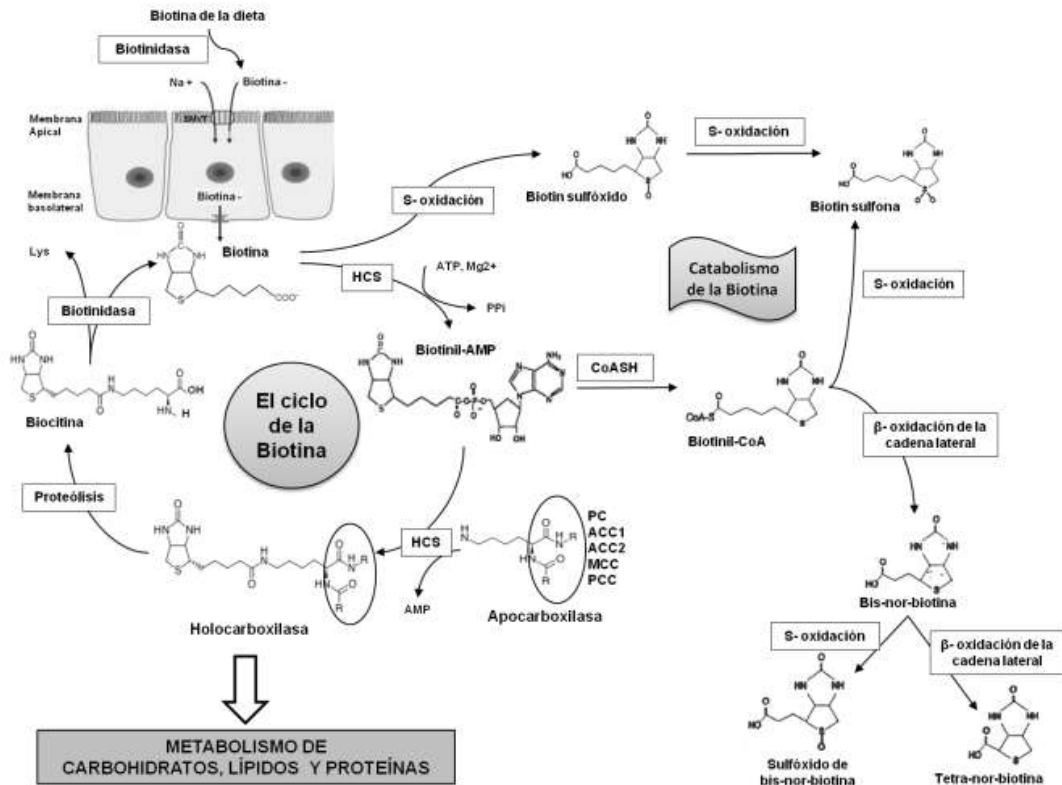
Sawamura *et.al.*, [105], reportaron que la administración de una dieta con un contenido de 800 o 10000 mg de biotina/kg de alimento durante 28 días a ratas Wistar de 3 semanas de edad, provoca una disminución en la ingesta de alimento y en la ganancia de peso. Dado que la rata consume 3960 mg al día, la cantidad de biotina ingerida es este estudio fue de 990 mg/kg, lo cual nos sugiere que estas concentraciones son tóxicas para esta cepa de ratas.

### **D.2.7. Función Bioquímica**

La función de la biotina es actuar como un vector en la transferencia de un grupo carboxilo, entre un donador y un aceptor, durante una reacción de carboxilación. La adición covalente de biotina a estas proteínas es catalizada por ligasas; en los procariotes conocida como proteína BirA (2,3) y en los eucariotas como holocarboxilasa sintetasa (HCS) [106].

Tanto para BirA y HCS, la adición de la biotina ocurre en una reacción dependiente de ATP. La reacción ocurre en dos pasos; en el primero se forma un compuesto intermediario, el biotinil-5-AMP (B-AMP) [107], en el segundo el B-AMP actuará como sustrato para la transferencia de biotina a un residuo de lisina en una región altamente conservada en las apocarboxilasas, y con la liberación de AMP.





**Figura 10.** Transporte y metabolismo de la biotina. *Lazo de la Vega, ML. 2012*

En los mamíferos, la holocarboxilasa sintetasa cataliza el enlace covalente de la biotina al grupo  $\epsilon$ -amino de la lisina de cinco carboxilasas para formar holocarboxilasas activas. Estas enzimas catalizan reacciones claves en la gluconeogénesis, síntesis de ácidos grasos, y en el catabolismo de aminoácidos [78].

#### D.2.7.1. Acetil- CoA carboxilasa

Se han identificado dos; una forma citosólica (acetil- CoA carboxilasa 1 o  $\alpha$ ) y una mitocondrial (acetil- CoA carboxilasa 2 o  $\beta$ ). En las dos carboxilasas, la biotina, cataliza el enlace de bicarbonato a acetil-CoA para formar malonil-CoA, que más tarde será usado como sustrato para la síntesis de ácidos grasos. Aunque las dos formas; ACC1 y ACC2 catalizan la misma reacción, ACC1 controla la síntesis de ácidos grasos en el citosol gracias a la formación de malonil-CoA y ACC2 controla la oxidación de ácidos grasos dentro de la mitocondria gracias a la formación de malonil-CoA cuya producción inhibe el transporte de ácidos grasos en la mitocondria [78].

Las tres carboxilasas restantes dependientes de biotina están localizadas exclusivamente en la mitocondria:

#### D.2.7.2. Piruvato carboxilasa

Está implicada en el proceso de gluconeogénesis ya que cataliza la conversión de piruvato en oxalacetato, paso esencial en la gluconeogénesis.

#### D.2.7.3. Propionil CoA carboxilasa

Está involucrada en el metabolismo de la isoleucina. Cataliza la reacción de carboxilación de propionil CoA (derivado del colesterol, y de ciertos aminoácidos) a metil-malonil CoA.

#### D.2.7.4. $\beta$ -Metilcrotonil-CoA carboxilasa

Cataliza la carboxilación del 3-metilcrotonil-CoA a 3-metilglutaconil-CoA, paso esencial en el metabolismo de la cadena ramificada del aminoácido leucina, resultando en la formación de un esqueleto de carbono desaminado de leucina o acetoacetato.

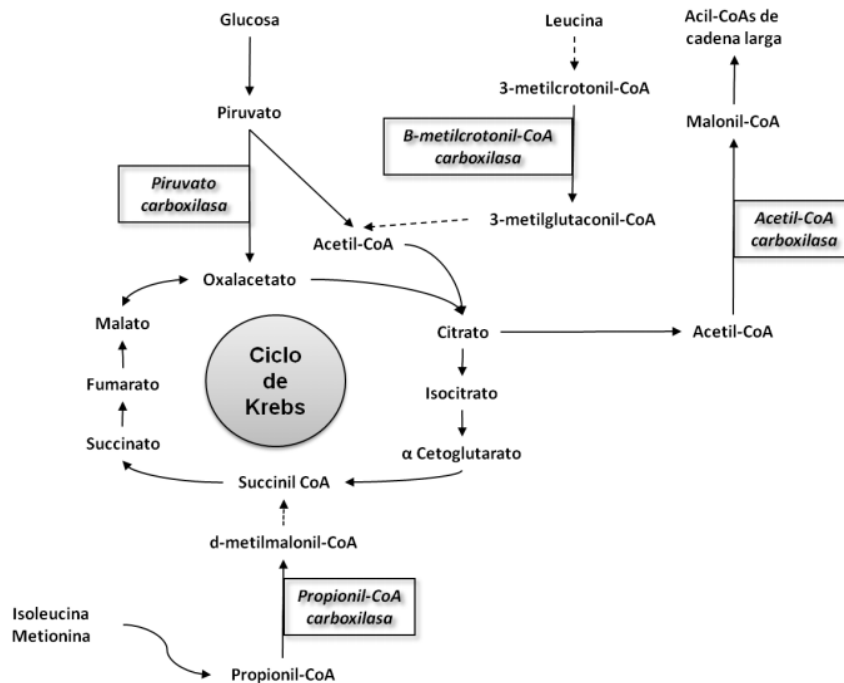


Figura 11. Las carboxilasas y su función en el metabolismo. *Lazo de la Vega, ML. 2012*

## **D.2.8. Efectos de concentraciones farmacológicas de biotina**

Independientemente de su papel como grupo prostético de las carboxilasas, en los últimos años se ha encontrado que concentraciones farmacológicas de biotina son capaces de modificar la expresión de genes relacionados con el metabolismo de la glucosa. Además, se ha observado que posee diversos efectos sobre procesos sistémicos como el desarrollo, la reproducción y el metabolismo [108].

### **D.2.8.1. Efectos farmacológicos de la biotina sobre la expresión de genes**

El primer estudio que evidenció que concentraciones farmacológicas de biotina modificaban la expresión de genes, fue dada por Dakshinamurti *et.al.*, en la década de 1960 [109,110]. Ellos reportaron que ratas diabéticas (con aloxano) y ratas no diabéticas al ser tratadas con una dosis aguda de biotina (1 a 2 mg/Kg) incrementaban la actividad de la glucocinasa hepática. El efecto de la biotina sobre la actividad de la glucocinasa también fue observado por Spence y Kouldeka en cultivo de hepatocitos de rata; quienes observaron que este efecto estaba dado por el incremento en el contenido de GMPc. Más tarde con la aparición de las técnicas de biología molecular [111] se observó que el efecto de la biotina estaba dado a nivel transcripcional. Estudios de microarreglos identificaron varios genes que se ven afectados por las concentraciones farmacológicas de la vitamina. Estudios realizados por Wiedmann, en células mononucleares de sangre periférica humana, encontró que una suplementación con 2.15 mg de biotina por 21 días, incrementa la expresión de 139 genes y disminuye la expresión de 131 genes [112].

La biotina también modifica la expresión de genes a nivel postranscripcional. En los años 80 Stockert *et.al.*, encontraron que la expresión del receptor de las asialoglicoproteínas en células HepG2 era reducido en deficiencia de biotina y que la adición posterior de biotina restauraba la expresión total del receptor, mientras su mensajero no era modificado [113].

La suplementación con biotina modifica también la expresión de genes críticos en la homeostasis de la glucosa. Genes como la glucocinasa hepática [111] y el receptor de insulina [114] aumentan su expresión en respuesta a la suplementación con biotina, mientras que genes gluconeogénicos como PEPCK y glucosa-6-fosfata [111], así como los factores HNF-4alfa y FoxO-1 disminuyen su expresión [115].

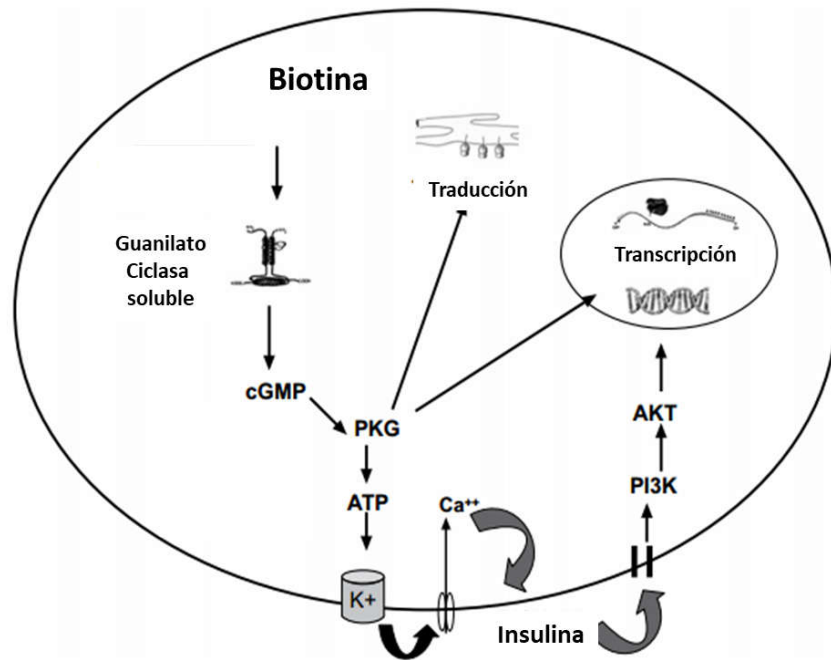
### **D.2.8.2. Efectos de concentraciones farmacológicas de biotina sobre el islote pancreático**

En estudios realizados por nuestro grupo [116] y otros investigadores [117] se ha encontrado que la exposición aguda a dosis farmacológicas de biotina incrementa la secreción de insulina en respuesta a glucosa, así como la expresión del gen de la insulina [118]. También, la biotina incrementa la expresión de la glucocinasa [116], una enzima crítica en la secreción de insulina en respuesta a la glucosa [119], y recientemente se ha descubierto que la biotina es un factor determinante sobre la masa y la regeneración de la célula beta [120]. Otra proteína crítica en el desarrollo del islote pancreático, el factor transcripcional PDX-1 [121], también se incrementan con la suplementación con biotina.

Recientemente [122] encontramos que la administración de una dieta conteniendo concentraciones farmacológicas de biotina administrada en ratones recién destetados incrementó la secreción estática de insulina y la expresión de este gen, así como la expresión del RNAm de factores transcripcionales que son determinantes en el desarrollo del islote y que en la etapa adulta regulan la síntesis y secreción de insulina, como *Foxa2*, *Pdx1* y *Hnf4a*. También incrementó el RNAm de proteínas participan en la secreción de insulina en respuesta a la glucosa: *Glucocinasa*, *Cacna1d* y *acetil-CoA carboxilasa*. En concordancia con estos efectos, los ratones suplementados con biotina mostraron una mejora en la tolerancia a la glucosa y un incremento de insulina en sangre, sin cambios en los niveles basales de glucosa ni en la tolerancia a la insulina.

El análisis morfométrico reveló que la suplementación con biotina incrementó la masa de las células beta por medio de un aumento en el tamaño de los islotes. De forma inesperada, la arquitectura de los islotes se encontró modificada en los ratones suplementados con biotina, observándose un porcentaje más elevado de islotes con células alfa localizadas hacia el centro del islote con respecto a los controles. Los efectos de la suplementación con biotina no se deben a una adaptación del islote a cambios metabólicos, ya que no se encontraron datos de obesidad, hiperglucemia, o resistencia a insulina. Estos resultados indican que concentraciones farmacológicas de biotina tiene efectos sobre el islote mediante cambios en la expresión de genes críticos en el desarrollo y funcionamiento de los islotes pancreáticos [122].

Estudios realizados en nuestro grupo encontraron que el mecanismo por el cual la suplementación incrementa la expresión de la glucocinasa involucra la vía de señalización de GMPc/PKG. En islotes pancreáticos aislados y tratados con 1  $\mu$ M de biotina, se observó que la activación de la guanilato ciclasa soluble y PKG incrementa el contenido de ATP, el cual induce la secreción de insulina a través de los canales sensibles a ATP. La insulina, de manera autocrina, activa la vía PI3K/Akt e incrementa la expresión del mRNA de la Glucocinasa [116].



**Figura 12.** Mecanismo de acción de la biotina en islotes pancreáticos. Figura modificada.  
*Riveron-Negrete L, et al., 2016 [108]*

### D.2.8.3. Efectos de la suplementación con biotina sobre las funciones reproductivas

Se ha reportado que la suplementación con biotina afecta funciones reproductivas. Varios estudios [123,124] han revelado que la suplementación con biotina en la dieta de cerdos (350  $\mu$ g / Kg de dieta) incrementa la actividad reproductiva e induce la fase de estro en comparación con su control (32  $\mu$ g/Kg de dieta) [123]. Efectos positivos de

la suplementación con biotina se observaron también en vacas, donde la suplementación con biotina (0, 10, 20 mg/día) incrementó la producción de leche [125,126]. También hubo menor incidencia de retención de placenta, y endometriosis puerperalis en vacas que recibieron 10 mg de biotina por día.

En gallinas reproductoras (30-33 semanas de edad), la suplementación con biotina administrada en el agua incrementó la producción de huevo y la tasa de fertilidad, pero no modificó el tiempo de incubación o la calidad de sus crías [127]. Una suplementación con biotina de 10 nM, en espermatozoides humanos aumentó la motilidad y prolongó la supervivencia de muestras de semen congeladas, lo que sugiere que la vitamina podría tener beneficios en métodos de reproducción asistida [128]. Por el contrario, ratas recién destetadas y alimentadas con una dieta que contenía el 1% de biotina (10 g de biotina / kg de dieta; 990 mg / kg de peso corporal / día) durante 6 semanas, presentaban recuentos de espermatozoides totales y diámetros de túbulos seminíferos disminuidos en comparación con ratas del grupo control; sin embargo, las ratas suplementadas con biotina mostraban una disminución en la ganancia de peso corporal, disminución en la ingesta de alimentos y en el peso del hígado y riñones, debido a que la cantidad de biotina administrada estaba por arriba del nivel máximo de ingesta tolerable reportado para la vitamina, por lo que es posible que los cambios testiculares sean el resultado de efectos tóxicos sistémicos [105,129].

Otras investigaciones han reportado que el exceso de biotina reduce la fertilidad en el coleóptero *Dermestes maculatus*, moscas y mosquitos [130–132].

En ratas la administración de una dosis aguda de 50-100 mg/dos veces al día durante todo la gestación causa reabsorción de fetos y placenta, así como una disminución en el peso y en el contenido de glucógeno en el útero [133,134]. En ratas a las que se les inyectó 50 mg de biotina se observó atrofia del cuerpo luteo, con infiltración masiva de leucocitos en el lumen vaginal [135]. En contraste, un tratamiento similar no afectó la reproducción o la incidencia de fetos con malformaciones en ratones ICR, lo cual nos indica que los ratones son mas resistentes a elevadas concentraciones de biotina que las ratas [136]. En ratones que recibieron 16,6 mg /kg de peso por día en la dieta durante 9 semanas [137], la suplementación con biotina provocó un incremento en las concentraciones de estradiol en suero, sin cambios en las concentraciones de progesterona al compararlos con los ratones que recibieron la dieta control. En este

mismo trabajo, el análisis histológico encontró una disminución tanto de folículos primarios como los folículos de Graaf [137].

#### **D.2.8.4. Efectos de la suplementación con biotina sobre el desarrollo embrionario**

Si bien se sabe que concentraciones farmacológicas de biotina modifican diversas funciones reproductivas [132], se conoce poco sobre los efectos que podría ejercer sobre el desarrollo embrionario [136]. En pollos, la biotina produjo malformaciones en el ojo en estructuras como la retina y el cristalino [138]. Este efecto fue dependiente de la administración de biotina en etapas tempranas del desarrollo en la etapa Hamburger and Hamilton estadio 14-17. Al nivel celular, este efecto se produjo por una menor apoptosis. En ratones, la administración de concentraciones farmacológicas de biotina no mostró evidencia de producir diferencias significativas con respecto al grupo control en la mortalidad de los fetos o en malformaciones externas como exencefalia, paladar hendido o sindactilia; sin embargo no se abordaron estudios sobre órganos internos.

## E. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se sabe que el desarrollo del islote pancreático inicia en las etapas embrionarias, continúa durante el periodo fetal y que su maduración culmina después del destete.

Varios estudios han demostrado que las etapas de desarrollo y maduración del islote son críticas para su función en etapas posteriores de la vida. En el caso de los roedores se sabe que la maduración del islote se lleva a cabo en la primera semana posterior al destete. En este periodo el islote pasa por un proceso de remodelación morfológica y adquiere además la capacidad de secretar insulina en respuesta a glucosa.

La vitamina biotina podría tener un efecto positivo en el desarrollo y la maduración del islote. Diversos estudios han encontrado que la administración de dosis farmacológicas de biotina incrementa la secreción de insulina basal y estimulada por glucosa, así como el tamaño del islote. Igualmente, se ha reportado que aumenta la expresión del mRNA de genes que participan tanto en el mecanismo de la secreción de insulina, en el desarrollo embrionario del páncreas y en el mantenimiento del fenotipo del islote. Por otro lado, también se ha documentado que la suplementación con biotina modifica la función reproductiva, y puede alterar el proceso de desarrollo embrionario.

Debido a la importancia del periodo de desarrollo y maduración del islote, en el presente trabajo se propuso investigar cuáles son los efectos de la suplementación con biotina en la dieta al ser administrada durante la etapa crítica de desarrollo (gestación y lactancia) y durante la etapa de maduración (primera semana posterior al destete) en ratones sanos sobre la morfología y morfometría del islote, proliferación de las células del islote, neogénesis, apoptosis. Así como la capacidad del islote de secretar insulina en respuesta a glucosa, la homeostasis de la glucosa a través de curvas de tolerancia a la glucosa y concentraciones de glucosa e insulina en suero.

Además debido a los pocos estudios que existen sobre la suplementación con biotina durante la gestación y la lactancia, en este trabajo también se propuso analizar el efecto de la biotina sobre las madres y el desarrollo de las crías al ser administrada durante los periodos de gestación y la lactancia.



## **F. HIPÓTESIS**

Dado que concentraciones farmacológicas de biotina son capaces de aumentar la expresión del mRNA de genes que participan en el desarrollo embrionario del páncreas endocrino, la secreción de insulina y el mantenimiento la masa de las células beta, así como aumentar el tamaño del islote y la secreción de insulina, y que estos eventos acontecen durante la diferenciación y la maduración del islote, es posible que la suplementación con biotina en la dieta aumente estos procesos durante los periodos críticos de desarrollo y maduración.

## **G. OBJETIVO**

Analizar los efectos de la suplementación con biotina en el desarrollo y maduración del páncreas, así como en la homeostasis de la glucosa cuando la vitamina es administrada: 1) durante los estados críticos de desarrollo (gestación y lactancia), 2) durante el periodo de maduración (primera semana post-destete).

## **H. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**I.** Determinar cuál es el efecto de una dieta suplementada con biotina en las madres y las crías al ser administrada durante el periodo de gestación y lactancia analizando:

- 1.** La ganancia de peso y el consumo de alimento de las madres gestantes y lactantes.
- 2.** El número, peso y talla de las crías.

**II.** Determinar cuál es el efecto de la suplementación con biotina sobre el páncreas durante el desarrollo (gestación y lactancia) y la maduración (primera semana post-destete) analizando:

- 1.** El desarrollo morfológico del páncreas cuantificando:
  - Número total de agregados endocrinos por unidad de área de páncreas.

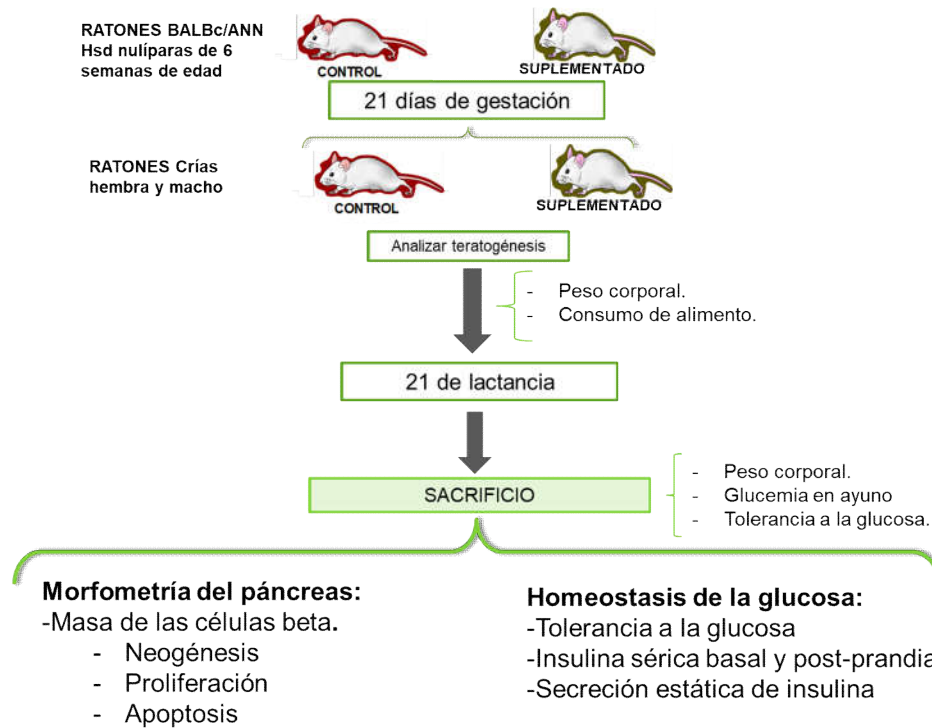
- Composición y distribución de cada tipo celular dentro del islote pancreático.
- Relación área de islotes/área total de páncreas.
- Proporción de células beta que se encuentran en etapa de proliferación celular, neogénesis y apoptosis.

**III.** Determinar cuál es el efecto de una dieta suplementada con biotina sobre la funcionalidad del islote y homeostasis de la glucosa durante desarrollo (gestación y lactancia) y la maduración (primera semana post-destete) analizando:

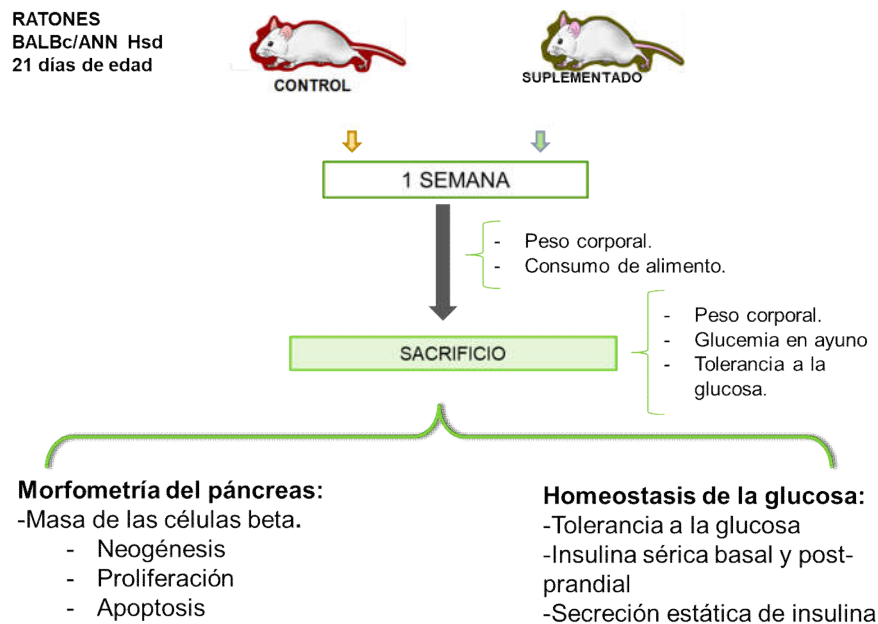
- a. La secreción de la insulina y la masa de las células beta.
- b. La secreción de glucagon y masa de las células alfa.
- c. La tolerancia a la glucosa.

## I. DISEÑO EXPERIMENTAL

### I.1. Efecto de la suplementación con biotina sobre el desarrollo del páncreas al ser administrada durante la gestación y lactancia



### I.2. Efecto de la suplementación con biotina sobre la maduración del páncreas al ser administrada durante la primera semana post-destete



## **J. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **J.1. Modelo animal.**

#### **J.1.1. Grupo experimental de gestación y lactancia.**

Ratonas de la cepa Balbc/AnN Hsd de 6 semanas de edad se dividieron en 2 grupos: uno de ellos se alimentó con una dieta control Harlan Teklad. TD-01362 para el grupo control (con 1,76 mg de biotina/kg alimento) y TD-01363 para el grupo suplementado (con 97,7 mg de biotina/kg de alimento). Dos semanas después se colocaron con el macho, 2 hembras y un macho por jaula, a los tres días fueron retirados los machos. Durante el periodo de gestación se realizaron mediciones de peso corporal, consumo de alimento, curvas de tolerancia a la glucosa y a la insulina, así como el análisis de las concentraciones en sangre de insulina. Al momento del nacimiento se analizó si la suplementación con biotina tuvo efectos teratogénicos sobre las crías. Se llevó un control del peso al nacer y se cuantificó el número de crías por camada. Al final de la lactancia (día 21 de nacimiento) las crías, previa anestesia inhalada con Sevofluorane, se obtuvieron muestras de sangre, se extrajo el páncreas, se pesó y se procesó para los estudios de inmunohistoquímica.

#### **J.1.2. Grupos experimental de la primera semana post-destete.**

Ratonas hembra de la cepa Balbc/Ann Hsd, de 21 días de edad, fueron destetadas y divididas en dos grupos; un grupo control con 0.8 mg de biotina/ Kg de dieta, y un grupo suplementado con 100 mg de biotina/kg de dieta. (2018S Teklad Global 18% Protein Rodent Maintenance Diet, Harlan Teklad). Los animales fueron mantenidos bajo condiciones de 12 horas de luz y oscuridad, con agua y alimento *ad libitum*. Después de una semana de administración de la dieta, los ratones fueron sometidos a un periodo de ayuno de 12 horas y anestesiados vía inhalatoria con Sevofluorane. Se extrajo sangre y el páncreas.

Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con los lineamientos establecidos por el Comité Ético de Experimentación del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

### **J.2. Inmunofluorescencia y análisis morfométricos**

Los páncreas extraídos se fijaron en fomalina amortiguada al 10%, se deshidrataron en una serie de concentraciones crecientes de etanol y xilol (etanol al 50%, 70%, 90%, 96% y 100%, etanol 100% / xilol y xilol puro, una hora en cada uno), se embebieron en

paraplast (Parplast, Sherwood Medical Co.), dos baños de una hora cada uno. Los páncreas se montaron en cassetes de inclusión, se incluyeron en paraplast y se hicieron cortes seriados de 5  $\mu\text{m}$  de grosor. Los cortes fueron montados en laminillas tratadas con Poly-L-lisina (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA).

Las laminillas se desparafinaron y rehidrataron con una serie de xilol-alcohol, en el orden inverso al utilizado en la deshidratación durante 3 minutos para el xilol y 4 minutos para el alcohol. Las laminillas se lavaron en PBS 1X por 5 minutos. Se realizó la recuperación del antígeno en buffer de citratos (pH6) durante 20 minutos a 90 °C (evitando la ebullición). Posteriormente el tejido fue permeabilizado con suero normal de cabra al 3% y tritón X-100 al 0.3% durante 45 minutos. Se incubaron durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos: guinea pig anti-insulina (1:150, Thermo Invitrogen, Rockford IL, USA) y mouse anti-glucagon (1:4500; Sigma, Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA) diluidos en PBS 1X con SNC al 1%. Posteriormente las laminillas fueron lavadas 3 veces con PBS 1X durante 5 minutos, se incubaron por una hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios: donkey anti-guinea pig Alexa fluor 488 conjugado (1:300; Jackson Inmuno Research Laboratories, Baltimore Pike, PA, USA.) and Cy3 donkey anti-mouse conjugate (1:800; Jackson Inmuno Research Laboratories, Baltimore Pike, PA, USA.). Las laminillas se lavaron con PBS 1X, 3 veces por 5 minutos. Los núcleos se tiñeron con DAPI durante 5 minutos, finalmente se cubrieron con un cubreobjetos montados con 40  $\mu\text{l}$  de medio de montaje fluorescente (DAKO, North America Inc., Carpinteria, CA, USA).

Los islotes fueron definidos como clústeres de 4 o más células positivas a insulina. El área de las células beta y alfa fueron fotografiados utilizando un microscopio invertido Olympus 1X70 (Tokyo, Japón) acoplado a una lámpara Media Cibernetics Evolution VF (Georgia, M.D, USA.). El área pancreática total fue fotografiada con un microscopio Olympus BX51-WI DSU acoplada a una cámara Hamamatsu C9100 EM-CCD (Hamamatsu City, Japón). Las áreas fueron cuantificadas usando el software Image J 1.40 (Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD).

### **J.3. Proliferación celular del islote**

La proliferación se cuantificó por inmunofluorescencia usando el marcador de proliferación Ki-67, se utilizó como anticuerpo primario un rabbit-anti-Ki67 (Abcam, Cambridge, MA; USA en una dilución 1:100), y como anticuerpo secundario un donkey anti-rabbit Alexa fluor 594 conjugado (1:300; Jackson Inmuno Research Laboratories, Baltimore Pike, PA, USA.). Para la identificación y el análisis de proliferación las

laminillas llevaban un triple marcaje; Ki67, insulina y DAPI. La cuantificación fue determinada por el número de núcleos positivos a Ki-67 en relación con el número total de núcleos presentes en un islote. Técnica empleada en el grupo experimental de la primera semana postdestete donde se cuantificaron un total de 160 y 228 islotes para el grupo control y suplementado con biotina, respectivamente.

#### **J.4. Neogénesis del islote pancreático**

La neogénesis se determinó por inmunofluorescencia utilizando la proteína relacionada con la neogénesis del islote pancreático (INGAPrP), rabbit-anti INGAPrP (1:300. Santa Cruz, Biotechnology, INC. Santa Cruz, CA, USA). Para la identificación del proceso neogénico las laminillas llevaban un triple marcaje; INGAPrP, insulina y DAPI. El análisis se realizó cuantificando el porcentaje de células inmunopositivas para INGAPrP en relación con el número de células positivas para insulina. Técnica empleada en el grupo experimental de la primera semana postdestete en la que un total de 5730 y 5995 células fueron cuantificados para el grupo control y suplementado, respectivamente.

#### **J.5. Apoptosis del islote pancreático**

El número de células en apoptosis se analizó en cortes de 5  $\mu\text{m}$  de tejido pancreático fijado en laminillas y teñido por inmunofluorescencia con el método de TUNEL. Las laminillas fueron desparafinadas, rehidratadas e incubadas con 20  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de proteasa K (Solon, OH, USA) por 10 minutos, posteriormente se realizó la técnica de TUNEL (*In situ* Cell Dead Detection kit, TMR red; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) de acuerdo al protocolo dado por el proveedor. Los tejidos fueron contrateñidos con DAPI. Técnica empleada en el grupo experimental de la primera semana postdestete, donde para el análisis, se cuantificaron aproximadamente 40 islotes en cada grupo; con un total de 4682 núcleos para el grupo control, y 5008 para el grupo suplementado.

#### **J.6. Aislamiento de islotes pancreáticos**

Cada páncreas antes de su extracción se perfundió con 2 ml de una solución de colagenasa P (Roche, Mannheim, Germany) en una concentración de 1mg/ml, disuelta en una solución balanceada de Hanks (Gibco, Grand Island, NY, USA). Una vez extraídos los páncreas, fueron sometidos a 37 °C durante 10 minutos para su digestión. Los islotes se separaron del tejido acinar por medio de un gradiente de Histopaque-1077 (Sigma, St. Louis MO, USA) al centrifugarlos a 3200 rpm durante 24

minutos. Los islotes fueron incubados toda la noche a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> en medio DMEM libre de biotina (11 mmol/l glucosa, 400 U/ml penicilina, 200 mg/l estreptomicina y 10 % SBF dializado). Posteriormente, en una placa de 24 pozos, se colocó en cada pozo grupos de entre 20 a 30 islotes. Los islotes fueron incubados por 30 minutos en una solución de Hanks con 0.5 % de BSA (p/v) y 3 mM de glucosa. Finalmente los islotes se incubaron por una hora en solución de Hanks con 5.6 mM (baja glucosa) y 15.6 mM (estimuladoras) de glucosa. La insulina secretada se midió usando el kit “Insulin (Rat) Ultrasensitive ELISA” de ALPCO (ALPCO Diagnostics).

#### **J.7. Medición de glucosa en sangre**

Las concentraciones de glucosa en sangre fueron determinadas en muestras de sangre de la cola de los ratones utilizando un sistema portátil de medición de glucosa o glucómetro (Precision QUI, MediSense, Inc., Abbott Laboratories, México, CDMX, México).

#### **J.8. Medición de insulina en plasma**

Al finalizar el periodo de tratamiento, las muestras de sangre fueron extraídas de la vena cava inferior al momento del sacrificio de los animales, se recolectaron en tubos de polipropileno con 5 µl de heparina y 10 µl del inhibidor de proteasas COMPLETE® (Roche). Las muestras fueron centrifugadas dos veces a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El plasma se almacenó a -70 °C hasta el momento de su cuantificación. Las concentraciones de insulina se midieron usando un kit “Insulin (Rat) Ultrasensitive ELISA” de ALPCO (ALPCO Diagnosis), de acuerdo a las especificaciones dadas por el proveedor. La absorbancia se determinó usando el lector de placas Biotek.

#### **J.9. Curva de tolerancia a la glucosa**

Para la curva de tolerancia a la glucosa, se mantuvieron los ratones bajo un ayuno de 12 h, se les inyectó glucosa intraperitoneal (2 g/kg peso). Se midieron las concentraciones de glucosa en sangre de la cola de los ratones con un glucómetro (Precision QID, MediSense, Inc., Abbott Laboratories, México, CDMX, México) antes de la inyección y a los 15, 30, 60 y 120 minutos posteriores a la inyección de glucosa.

#### **J.10. Curva de tolerancia a la insulina**

Las curvas de tolerancia a la insulina se llevaron a cabo en ratones alimentados *ad libitum*. Las concentraciones de glucosa en muestras de sangre de la cola fueron medidas antes de la inyección intraperitoneal (tiempo 0) y a los 15, 30, 60 y 90 minutos posteriores a la inyección de 1 IU/kg de insulina regular humana (Humulin, Laboratorios Eli Lilly). Las concentraciones de glucosa se determinaron usando un glucómetro (Precision QID, MediSense, Inc., Abbott Laboratories, CDMX, México).

#### **J.11. Análisis estadístico**

Los datos representan la media  $\pm$  ES. (Error estándar), la n es el número de muestras evaluadas. El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad (La Jolla, CA, USA). Los datos se analizaron por medio de una prueba de t de Student, una U de Mann-Whitney, o un ANOVA de dos vías. Los valores de  $p$  menores a 0.05 fueron considerados como estadísticamente significativos. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.05$ .



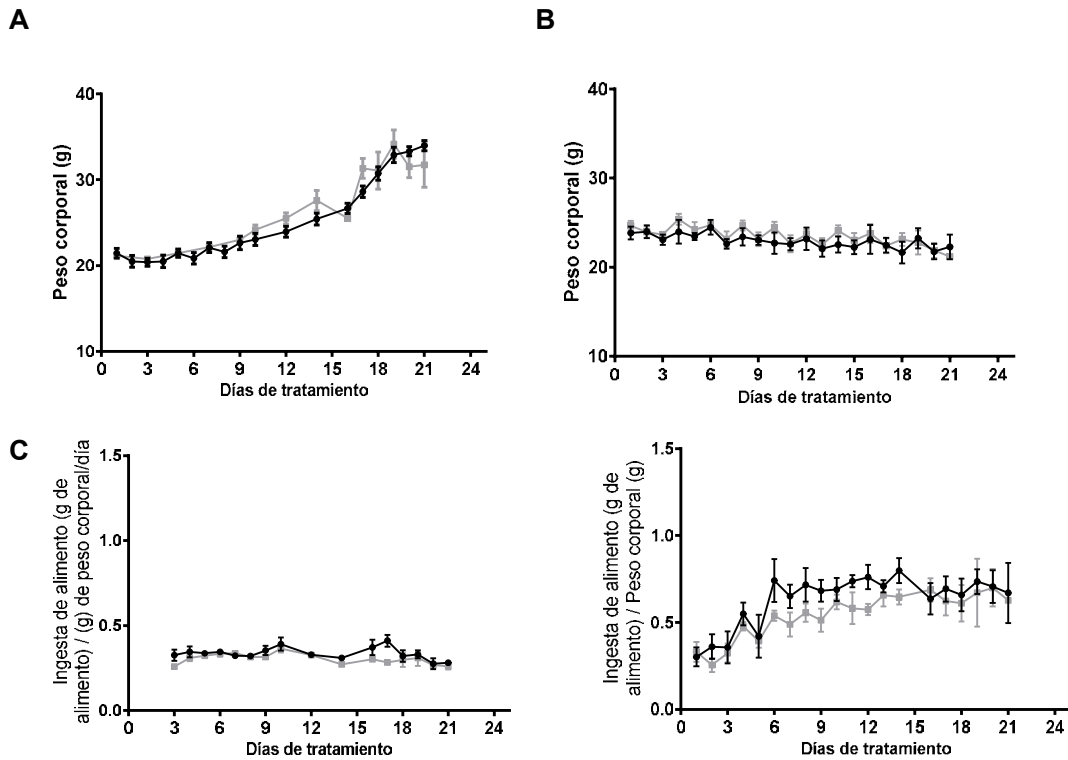
## K. RESULTADOS

### K.1. Efecto de la suplementación con biotina en el modelo de gestación y lactancia

#### K.1.1. Efecto de la suplementación con biotina sobre el peso y consumo de alimento en madres gestantes y lactantes

El peso de los animales fue registrado diariamente a lo largo del periodo de gestación (Figura 13A) y lactancia (Figura 13B). Durante la etapa de gestación tanto el grupo suplementado como el grupo control presentan una ganancia de peso similar, sin mostrar una diferencia estadísticamente significativa. En el periodo de lactancia el peso corporal de los animales se mantuvo estable tanto en el grupo control como para el grupo que recibió la dieta suplementada con biotina. El peso promedio al final de la **gestación** fue para el control:  $33.3 \pm 0.6$  g; y suplementado:  $34.3 \pm 1.0$  g. El peso promedio al final de la **lactancia** fue para el control:  $21.6 \pm 0.7$  g; y suplementado:  $22.6 \pm 0.6$  g.

Al monitorear el consumo de alimento promedio por día ajustado por peso corporal en los periodos de gestación (Figura 13 C) y lactancia (Figura 13 D), se observó que la ingesta de alimento no fue diferente entre el grupo control y suplementado en ninguno de los periodos estudiados. El peso promedio de alimento consumido durante la **gestación** por el grupo control fue de  $0.33 \pm 0.01$  g de alimento/g de peso corporal y para el grupo suplementado fue de  $0.31 \pm 0.01$  g de alimento/g de peso corporal. El peso promedio de alimento consumido durante la **lactancia** por el grupo control =  $0.65 \pm 0.004$  g de alimento/g de peso corporal; grupo suplementado =  $0.56 \pm 0.003$  g de alimento/g de peso corporal.



**Figura 13.** Efecto de la suplementación con biotina sobre el peso corporal de las madres y la ingesta de alimento durante la gestación y la lactancia. **Panel A.** Peso corporal durante gestación; **Panel B.** Peso corporal durante la lactancia; **Panel C.** Ingesta de alimento durante la gestación; **Panel D.** Ingesta de alimento durante la lactancia. Los valores son la media  $\pm$  ES. n: control = 16; suplementado= 16 ratones para cada uno de los grupos. *Círculos negros:* grupo control; *cuadrados grises:* grupo suplementado. La significancia se evaluó mediante un ANOVA (dieta, tiempo).  $P > 0.05$  en comparación con el grupo control.

### K.1.2. Efecto de la suplementación con biotina durante la gestación y la lactancia en el tamaño de la camada, la supervivencia, el género y malformaciones externas

Para evaluar si la suplementación con biotina es capaz de afectar la reproducción y el desarrollo en roedores, se procedió a cuantificar al término de la gestación el tamaño de la camada, la supervivencia, y la cantidad de crías de acuerdo al sexo. De acuerdo a los resultados no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros cuantificados en las crías de madres alimentadas con una dieta control o una dieta suplementada con biotina. Tampoco se observaron malformaciones externas en ninguno de los grupos.

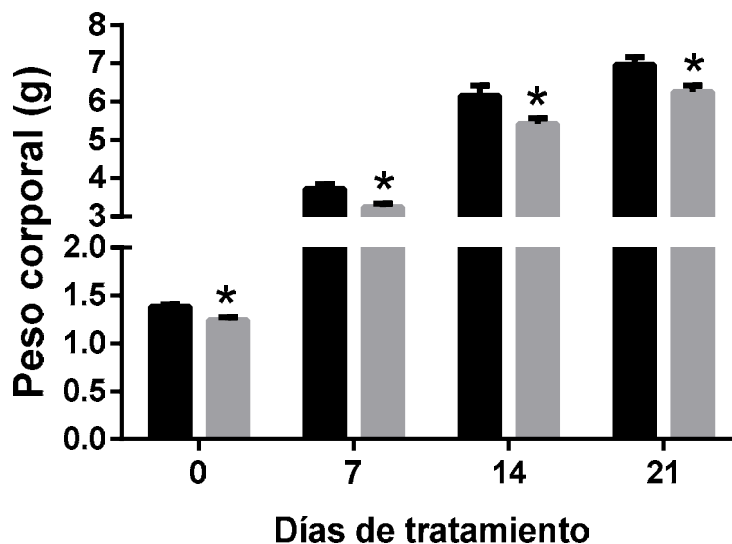
**Tabla 1.** Efecto de la suplementación de biotina durante la gestación y la lactancia en el tamaño de la camada, la supervivencia, el género y las malformaciones externas.

| <b>Dieta</b>              | <b>Control</b> | <b>Suplementada</b> |
|---------------------------|----------------|---------------------|
| Camada al nacimiento      | 5.12±0.48      | 6.11±0.54           |
| Camada al destete         | 4.18±0.47      | 3.94±0.63           |
| Tasa de supervivencia (%) | 85.1±6.94      | 67.7±9.22           |
| Crías machos              | 1.47±0.24      | 1.54±0.27           |
| Crías hembras             | 3.27±0.34      | 3.40±0.50           |
| Malformaciones externas   | Ninguna        | Ninguna             |

Los valores son la media±ES n=16 madres por cada grupo control y suplementado.

### **K.1.3. Efecto de la suplementación con biotina durante la gestación y la lactancia en el peso corporal de las crías.**

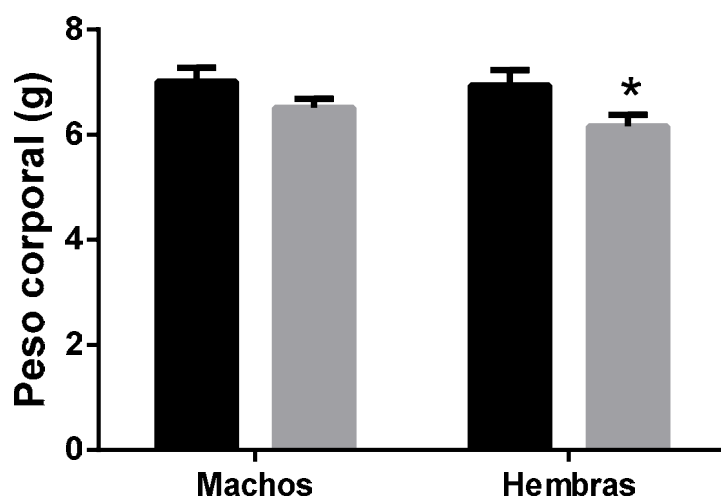
Se ha propuesto que la biotina tiene efectos sobre el desarrollo, y dado que la administración de la dieta suplementada con biotina comprendía las etapas de gestación y lactancia, periodos críticos en el desarrollo y crecimiento de las crías, se realizó un monitoreo del peso corporal de las crías; al nacimiento, día 7, 14 y 21. Durante la lactancia se observó una disminución significativa en el peso corporal (\**P* <0.05), desde el nacimiento, en las crías cuyas madres recibieron una dieta suplementada con biotina (control = 1.38 ± 0.03; suplementada con biotina = 1.24 ± 0.03) y durante los 21 días de lactancia (día 7: control = 3.73 ± 0.13 ; suplementado con biotina = 3.25 ± 0.09; día 14: control = 6.16 ± 0.27; suplementado con biotina = 5.42 ± 0.15; día 21: control = 6.97 ± 0.20; suplementado con biotina = 6.26 ± 0.16).



**Figura 14.** Efecto de la suplementación con biotina durante la gestación y la lactancia en el peso corporal de las crías. El peso corporal de las crías se determinó al nacer, a los 7, 14 y 21 días de edad. Los valores son la media  $\pm$  ES. n: control = 49; suplementado = 56 ratones. *Barras negras:* grupo control; *barras grises:* suplementado con biotina. La significancia se evaluó mediante un ANOVA (dieta, tiempo). \*  $P < 0.05$  en comparación con el grupo control.

#### **K.1.4. Efecto de la suplementación con biotina durante la gestación y la lactancia en el peso corporal de la crías de acuerdo al sexo.**

Debido a que la suplementación con biotina produjo una disminución en el peso de las crías, al día 21 de nacimiento, tiempo en el que se pudo discernir el género de los ratones, la medición del peso corporal reveló que las crías hembras cuyas madres recibieron la dieta suplementada con biotina mostraban una disminución significativa ( $*P < 0.05$ ) en su peso corporal (control =  $6.94 \pm 0.29$ , suplementado con biotina =  $5.83 \pm 0.19$ ), diferencia que no se observó en las crías machos (control =  $7.01 \pm 0.26$ ; suplementado con biotina =  $6.56 \pm 0.21$ ).



**Figura 15.** Efecto de la suplementación con biotina durante la gestación y la lactancia en el peso corporal de las crías hembras y machos al momento del destete. Peso corporal. Los valores son la media  $\pm$  ES. n: Machos: control= 21; suplementado = 21 ratones; Hembras: control = 28; suplementada = 28. Barras negras: grupo control; barras grises: suplementado. La significancia se evaluó mediante un ANOVA (dieta, género). \*  $P < 0.05$  en comparación con el grupo control.

#### **K.1.5. Efecto de la suplementación con biotina durante la gestación y la lactancia sobre el peso del páncreas, hígado, testículo y útero en las crías.**

La suplementación con biotina ocasionó una disminución en el peso corporal de las crías al nacimiento y durante la lactancia, razón por la cual se procedió al final del tratamiento a registrar el peso del páncreas, hígado, testículos y aparato reproductor femenino (útero, cuernos uterinos, ovarios). Datos presentados en la Tabla 2). Debido a las diferencias encontradas entre el peso de las crías hembras y machos cuyas madres recibieron la dieta suplementada con biotina también se evaluó el peso del tejido correspondiente al género: aparato reproductor femenino (útero, cuernos uterinos, ovarios) y testículo. Encontrándose que la suplementación con biotina no modifica el peso de los diferentes órganos. El peso absoluto del útero se redujo en el grupo de las crías suplementadas con respecto a su grupo control; sin embargo, no se encontró diferencias significativas en el peso relativo del útero/peso corporal.

**Tabla 2.** Efecto de la suplementación con biotina durante la gestación y la lactancia en el peso del páncreas, hígado, testículos y útero de las crías.

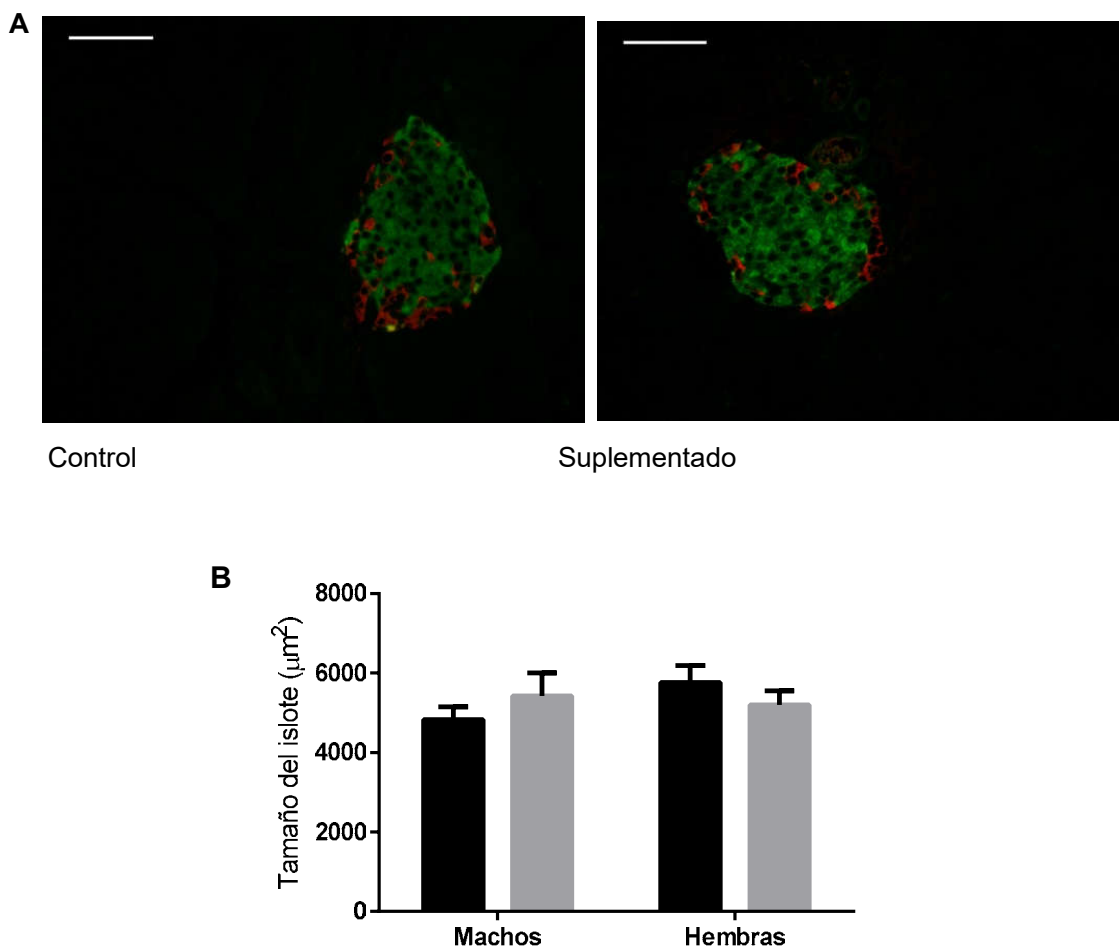
| Dieta                       | Control              |                |                            |           | Suplementada         |                   |                            |           |
|-----------------------------|----------------------|----------------|----------------------------|-----------|----------------------|-------------------|----------------------------|-----------|
|                             | Peso del tejido (mg) |                | mg tejido/mg peso corporal |           | Peso del tejido (mg) |                   | mg tejido/mg peso corporal |           |
|                             | Machos               | Hembras        | Machos                     | Hembras   | Machos               | Hembras           | Machos                     | Hembras   |
| <b>Páncreas</b>             | 71.5±8.82            | 63.5±8.66      | 10.1±0.74                  | 9.52±0.69 | 89.8±3.36            | 69.1±4.07         | 11.5±0.38                  | 9.66±0.24 |
| <b>Hígado</b>               | 300±12               | 343±21.1       | 44.4±0.51                  | 41.3±1.73 | 299±12.4             | 300±15.4          | 46.2±0.98                  | 45.1±0.97 |
| <b>Testículo/<br/>Útero</b> | 42.5±1.36            | <b>20±1.27</b> | 6.32±0.16                  | 2.71±0.11 | 38.8±2.08            | <b>14.4±1.70*</b> | 6.00±0.24                  | 2.40±0.16 |

Los valores representan la media ± ES. n= 9 para cada grupo de crías machos; n= 12 para cada grupo de crías hembras.

### K.1.6. Efecto de la suplementación con biotina durante la gestación y la lactancia en la morfometría de los islotes pancreáticos de las crías

#### K.1.6.1. Área del islote

Debido a que biotina es capaz de incrementar el área promedio del islote al ser administrada en etapas posteriores al destete, se procedió a cuantificar el área de los islotes en cortes de tejido pancreático de crías hembras y machos cuyas madres recibieron la dieta suplementada con biotina durante las etapas de formación y desarrollo del páncreas (gestación y lactancia). Al término de la evaluación no se encontraron diferencias significativas en el área de los islotes medida en  $\mu\text{m}^2$  (Machos: control= 4,827 ± 325; suplementado = 5,431 ± 577; Hembras: control= 5,765 ± 425; suplementado = 5,201 ± 354).

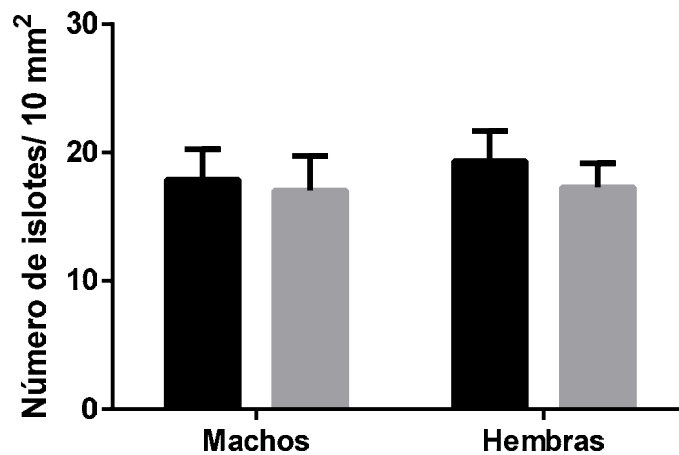


**Figura 16.** Efecto de la suplementación de biotina durante la gestación y la lactancia sobre el tamaño de los islotes. A) Imagen representativa de las inmunofluorescencias de células marcadas con insulina (verde), glucagon (rojo). Barra de escala representa 50  $\mu\text{m}$ . B) Tamaño promedio del islote pancreático ( $\mu\text{m}^2$ )  $\pm$  ES. de crías macho y hembra.  $n = 4$  ratones por grupo. Barras negras: grupo control; barras grises: suplementado con biotina. La significancia se evaluó mediante el análisis de varianza ANOVA (dieta, género)  $P > 0.05$  en comparación con el grupo control.

#### K.1.6.2. Número de islotes por área de páncreas.

Dado que se sabe que la formación de agregados endocrinos sucede en el periodo fetal y culmina en la etapa neonatal, se procedió a evaluar si la suplementación con biotina durante la gestación y la lactancia modificaba el número de islotes por área de páncreas. Al evaluar el número de islotes por área pancreática ( $10 \text{ mm}^2$ ) en los

ratones crías del grupo control y del grupo suplementados con biotina (Figura 17) no se encontró diferencia significativa entre el grupo suplementado con biotina, machos o hembras, en comparación con su respectivo grupo control (Machos: control =  $17.9 \pm 2.38$ ; suplementado =  $17.0 \pm 2.69$ ; Hembras: control =  $19.3 \pm 2.33$ ; suplementado =  $17.3 \pm 1.87$  islotes /  $10 \text{ mm}^2$  de área pancreática). Tampoco se observaron diferencias entre el número de islotes de las crías macho y hembra.



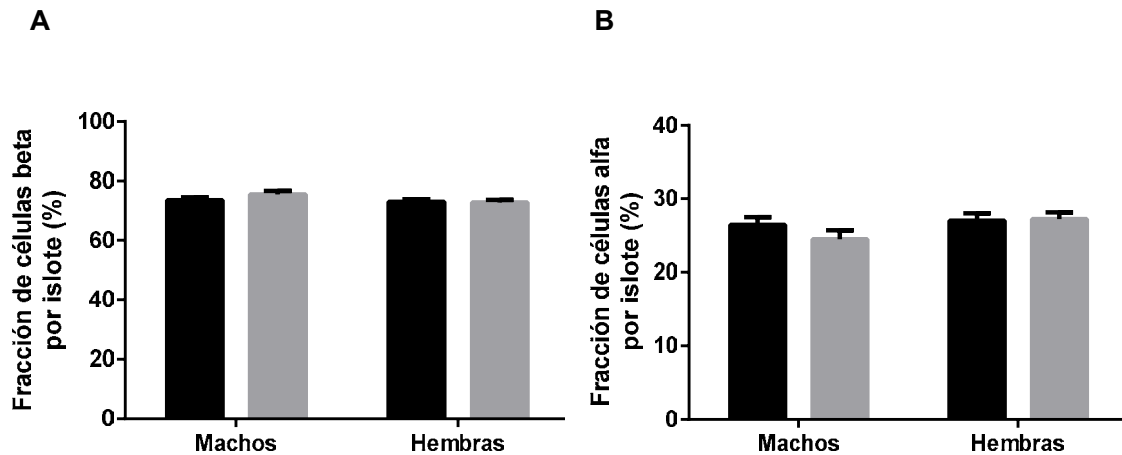
**Figura 17.** Efecto de la suplementación de biotina durante la gestación y la lactancia sobre el número de islotes. Número de islotes por área pancreática total ( $10 \text{ mm}^2$ )  $\pm$  ES. de crías macho y hembra.  $n = 4$  ratones por grupo. Barras negras: grupo control; barras grises: suplementado con biotina. La significancia se evaluó mediante el análisis de varianza ANOVA (dieta, género)  $P > 0.05$  en comparación con el grupo control.

### K.1.6.3. Composición de células alfa y beta por islote

Varios estudios han reportado que los islotes pancreáticos no están completamente desarrollados al momento del nacimiento, y que adquieren su citoarquitectura típica en etapas posteriores a la lactancia [61], razón por la cual nosotros analizamos el efecto de la biotina sobre la composición del islote pancreático. Se cuantificó la proporción del área de células beta y el área de células alfa por islote en crías machos y hembras del grupo de madres control y suplementadas. Los islotes de las crías macho y hembra del grupo control presentaron una proporción similar tanto de células alfa (Figura 18 A) como beta (Figura 18 B). La suplementación con biotina no afectó de



manera significativa la proporción de células beta o alfa en en las crías hembra y macho. La proporción de células beta (Machos: control =  $73.5 \pm 1.04$ ; suplementado =  $75.5 \pm 1.18\%$ ; Hembras: control =  $73.0 \pm 0.96$ ; suplementado =  $72.8 \pm 0.94\%$ ). La proporción de células alfa (Machos: control =  $26.5 \pm 1.04$ ; suplementado =  $24,5 \pm 1,18\%$ ; Hembras: control =  $27 \pm 0,96$ ; suplementado =  $27,2 \pm 0,94\%$ )

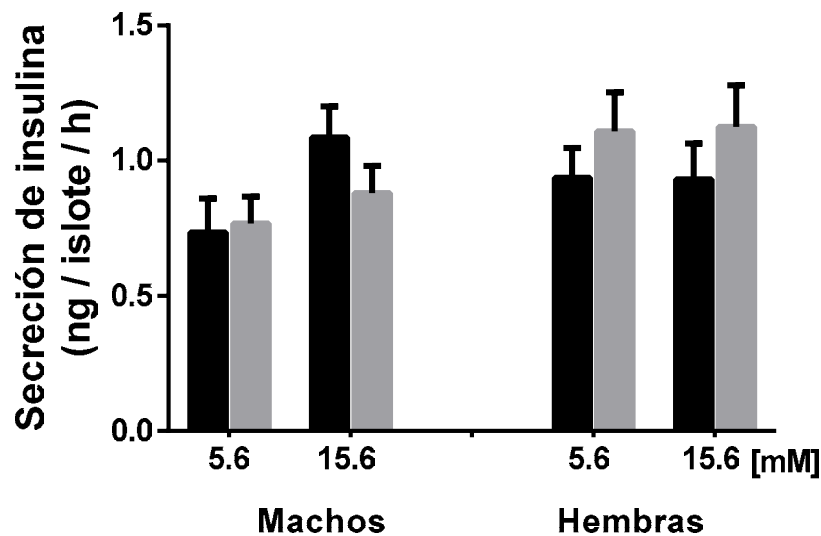


**Figura 18.** Efecto de la suplementación de biotina durante la gestación y la lactancia sobre la proporción de células alfa y beta por islote. Panel A. Porcentaje del área promedio de células positivas a insulina (células  $\beta$ ) por islote. Panel B. Porcentaje del área promedio de células positivas glucagón (células  $\alpha$ ) por islote. Los valores son la media  $\pm$  ES. n = 4 ratones por grupo. Barras negras: grupo control; barras grises: suplementado con biotina. La significancia se evaluó mediante el análisis de varianza ANOVA (dieta, género)  $P > 0.05$  en comparación con el grupo control.

### K.1.7. Efecto de la suplementación con biotina durante el periodo de gestación y lactancia en la secreción de insulina de islotes aislados de las crías

Varios estudios han documentado que los islotes neonatales se encuentran inmaduros funcionalmente además de que no son capaces de responder al estímulo dado por la glucosa y además de que se sabe que la suplementación con biotina es capaz de incrementar la secreción de insulina tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*. Al término del periodo de lactancia investigamos cual era el efecto de la administración de una dieta suplementada con biotina durante el periodo de gestación y lactancia sobre la secreción de insulina en las crías machos y hembra. Como indica la Figura 19, los niveles de secreción de insulina en islotes aislados de ratones crías no presentaron

una diferencia significativa tanto en las concentraciones basales como en las concentraciones estimuladoras de glucosa (5.5 y 15.6 mM, respectivamente). Machos: control =  $0.74 \pm 0.12$  y  $1.09 \pm 0.12$ ; suplementado =  $0.77 \pm 0.10$  y  $0.88 \pm 0.10$  ng de insulina / islote / hora para concentraciones estimuladoras y basales de glucosa, respectivamente. Hembras: control =  $0.94 \pm 0.11$  y  $0.93 \pm 0.13$ ; suplementada =  $1.11 \pm 0.13$  y  $1.14 \pm 0.14$  ng de insulina / islote / hora para concentraciones estimuladoras y basales de glucosa, respectivamente.



**Figura 19.** Efecto de la suplementación con biotina durante la gestación y la lactancia en la secreción de insulina de crías machos y hembras. Secreción de insulina estimulada por glucosa de islotes pancreáticos aislados de crías de madres control y suplementados con biotina. Los datos representan la media  $\pm$  ES. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes. Barras negras: grupo control; barras grises: suplementado con biotina. La significancia fue evaluada mediante un ANOVA de tres vías (tratamiento, sexo, concentraciones de glucosa),  $P > 0.05$  en comparación con el grupo control.

#### **K.1.8. Efecto de la suplementación con biotina durante la etapa de gestación y lactancia sobre las concentraciones de glucosa e insulina séricas en las crías**

La administración de una dieta suplementada con biotina durante la gestación y la lactancia no modifica las concentraciones de glucosa e insulina en sangre de las crías

ya que no se encontró diferencias significativas entre el grupo suplementado con biotina y el grupo control. Tampoco hubo diferencias pendientes del sexo de las crías (Tabla 3).

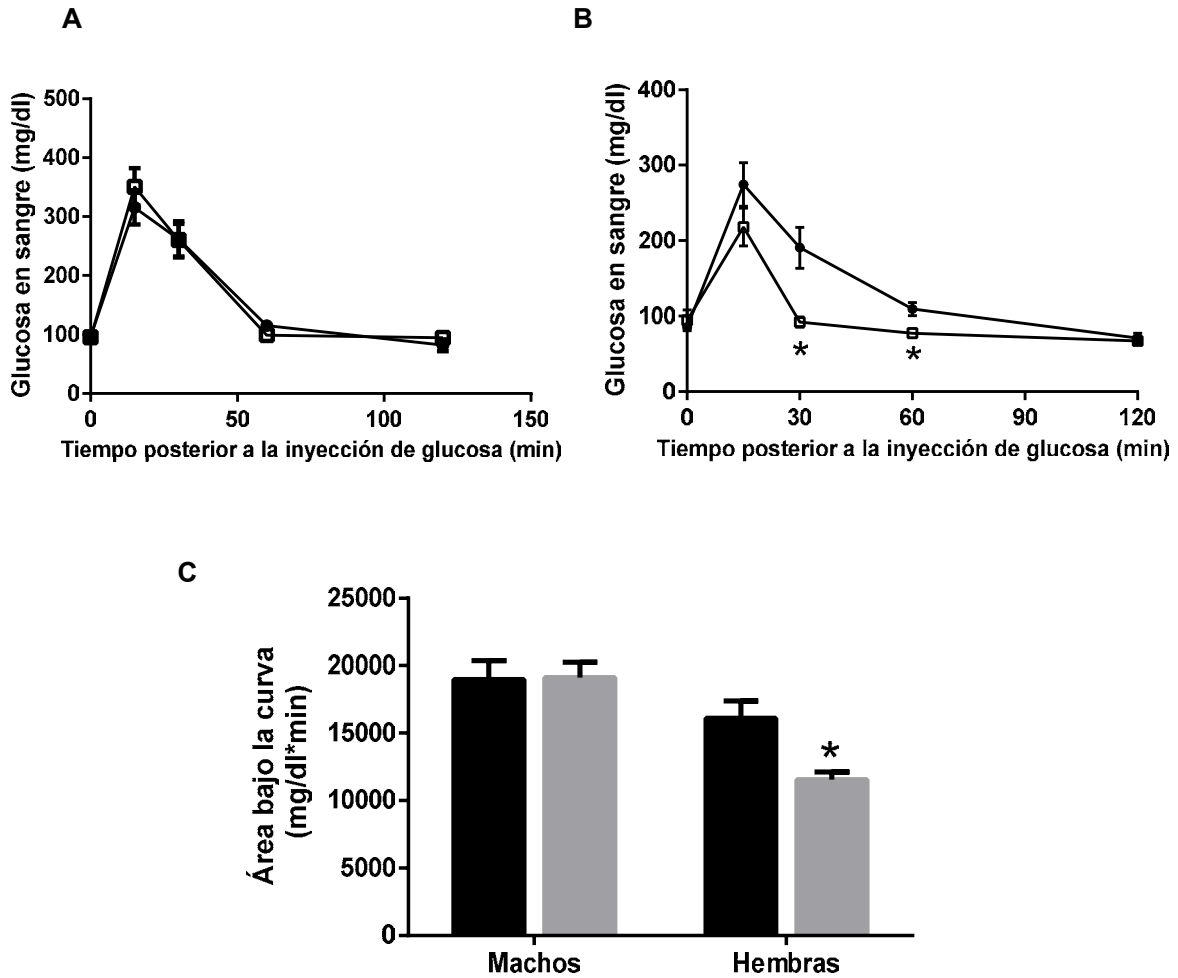
**Tabla 3.** Efecto de la suplementación de biotina durante la gestación y la lactancia en los niveles de glucosa en sangre e insulina en suero de las crías

| Dieta                         | Control    |             | Suplementada |            |
|-------------------------------|------------|-------------|--------------|------------|
|                               | Machos     | Hembras     | Machos       | Hembras    |
| Glucosa en ayuno (mg/dl)      | 90.1±4.56  | 88.56±4.19  | 85.00±3.86   | 79.21±4.83 |
| Glucosa post-prandial (mg/dl) | 120.3±11.2 | 113.67±9.12 | 108.9±10.0   | 101.4±9.34 |
| Insulina en ayuno (ng/ml)     | 0.38± 0.10 | 0.44± 0.06  | 0.41± 0.07   | 0.31± 0.04 |

Los valores representan la media ± ES. n = 12 para cada grupo de crías machos; n = 18 para cada grupo de crías hembras.

### K.1.9. Efecto de la suplementación de biotina durante la gestación y la lactancia sobre la tolerancia a la glucosa en las crías

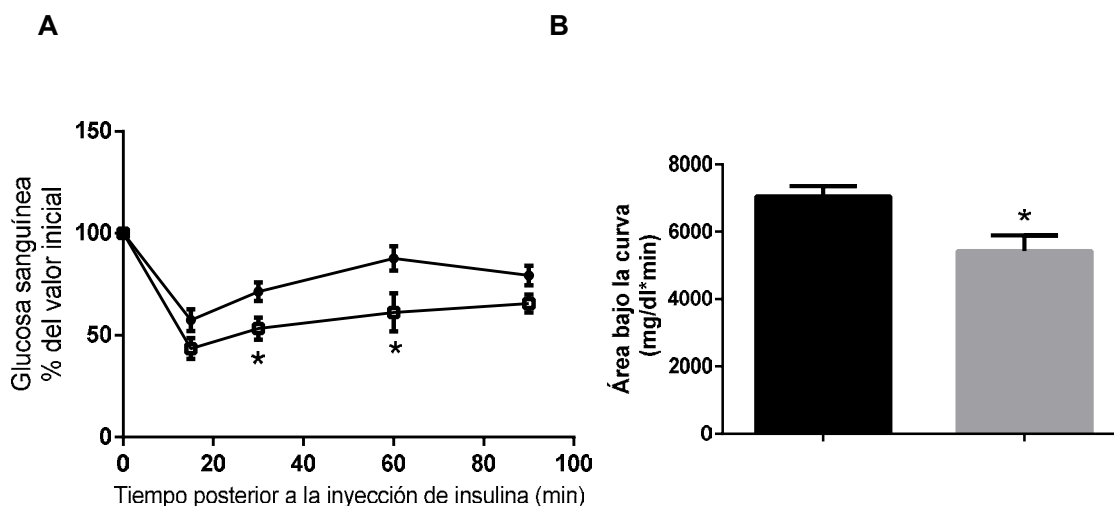
Un estudio reciente realizado por nuestro grupo de trabajo reportó que la suplementación con biotina administrada en las etapas posteriores al destete mejora la tolerancia a la glucosa. Al analizar la curva de tolerancia a la glucosa de las crías hembras de los grupos control y suplementados con biotina se encontró que las concentraciones de glucosa en sangre fueron significativamente menores en los minutos 30 y 60 posteriores a la inyección de glucosa en el grupo suplementado con biotina (Fig. 20 B). El promedio del área bajo la curva en la prueba de tolerancia a la glucosa (Figura 20 C) fue significativamente menor en el grupo suplementado con biotina ( $11,550 \pm 590$  mg / dl / min) con respecto a su control ( $16,109 \pm 1,280$  mg / dl / min),  $*P < 0.05$ . Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas en la tolerancia a la glucosa de las crías macho entre su grupo control y el grupo suplementado con biotina (suplementado =  $19,117 \pm 1,139$  mg / dl / min vs control =  $18,994 \pm 1,392$  mg / dl / min),  $P \leq 0,05$ . (20 A, 20 C).



**Figura 20.** Efecto de la suplementación con biotina durante la gestación y la lactancia sobre la tolerancia a la glucosa en las crías macho y hembra. Concentraciones de glucosa en sangre durante la curva de tolerancia a la glucosa (inyección i.p. de 2 g / kg de peso). Los valores son la media  $\pm$  E.S. Control (círculo negro); suplementado (cuadrado blanco). **Panel A.** Crías macho; n = 8 ratones por grupo. **Panel B.** Crías hembras; n = 6 ratones por grupo. **Panel C.** Área bajo la curva de las curvas de tolerancia a la glucosa de crías macho y hembra. Barras negras: grupo de control; barras grises: suplementado con biotina. La significancia se evaluó mediante el análisis de varianza ANOVA (dieta, género) \* $P < 0.05$  en comparación con el grupo control.

### K.1.10. Efecto de la suplementación con biotina durante la gestación y la lactancia en las crías sobre la tolerancia a la insulina

Los resultados indicaron que las crías hembras cuyas madres recibieron la suplementación con biotina presentaban una mejor tolerancia a la glucosa, sin presentar cambios en la morfología y la secreción del islote pancreático, lo que sugiere que el aumento en la tolerancia a la glucosa podría estar dado por mayor sensibilidad a la insulina, por lo que se realizó una curva de tolerancia esta hormona. La curva de tolerancia a la insulina en crías hembra de los grupos control y suplementados con biotina mostraron una disminución estadísticamente significativa en los minutos 30 y 60 después de la inyección de insulina en el grupo suplementado con biotina (Figura 21 A). El promedio del área bajo la curva para la prueba de tolerancia a la insulina (Figura 21 B) fue significativamente menor en el grupo suplementado con biotina (suplementado =  $7,050 \pm 306$  mg/l / dl / min; control =  $5,423 \pm 470$  mg/l / dl / min),  $*P \leq 0.05$

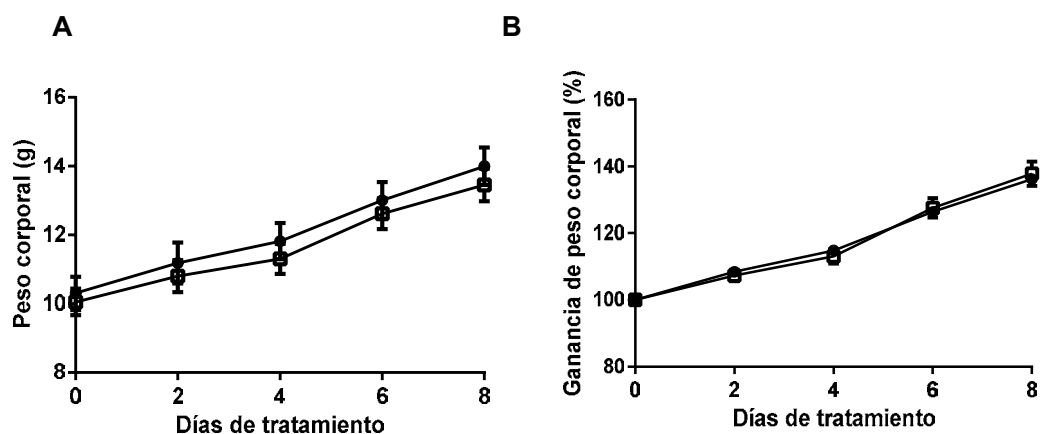


**Figura 21.** Efecto de la suplementación con biotina durante la gestación y la lactancia sobre la tolerancia a la insulina en las crías hembra. Panel A. Concentraciones de glucosa en sangre durante la curva de tolerancia a la insulina (inyección i.p. de 1 UI / kg de peso). Los valores son la media  $\pm$  ES. Hembras: control (círculo negro); suplementado (cuadrado blanco).  $n = 7$  ratones para el grupo control;  $n=5$  para el grupo suplementado. Panel B. Área bajo la curva de la curva de insulina. Barras negras: grupo de control; barras grises: suplementado con biotina. La significancia se evaluó mediante una t-Student.  $*P < 0.05$  en comparación con el grupo control.

## K.2. Efecto de la suplementación con biotina durante la maduración del islote (primera semana después del destete)

### K.2.1. Efecto de la suplementación con biotina sobre el peso corporal

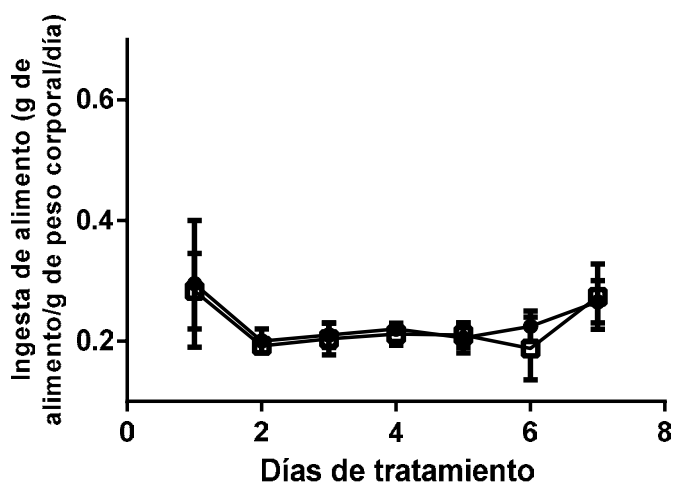
Durante el periodo experimental se registró el peso corporal de los animales. Se encontró que tanto el grupo control como el grupo suplementado presentan una ganancia de peso similar, sin mostrar diferencias significativas al término del tiempo de administración de la dieta (control:  $14.00 \pm 0.55$  g; suplementado:  $13.45 \pm 0.47$  g), (Gráfica 22 A). Los datos se analizaron también calculando la tasa de crecimiento (peso expresado en porcentaje con respecto al peso del día del destete) encontrándose para el grupo control:  $136.13 \pm 1.43$  %; suplementado  $137.82 \pm 3.62$  %. (Gráfica 22 B)



**Figura 22.** Efecto de la suplementación con biotina en el peso corporal. Ratones de tres semanas de edad fueron alimentados con dieta control o suplementada con biotina por una semana. A. Peso corporal; B. Tasa de crecimiento. Una  $n=8$  ratones para el grupo control y una  $n=9$  ratones para el grupo suplementado. Círculos: ratones control; cuadrados: ratones suplementados. Los datos representan la media  $\pm$ ES. La significancia fue medida por un ANOVA (dieta, tiempo).

### K.2.2. Consumo de alimento

El consumo de alimento promedio por día, ajustado al peso por gramo de animal, durante la semana de administración de la dieta suplementada con biotina la cual se esquematiza en la Gráfica 23, no muestra diferencia significativa en el promedio de ingesta de alimento en gramos de alimento por gramos de peso corporal por día: control =  $0.229 \pm 0.014$ ; Suplementado:  $0.223 \pm 0.015$



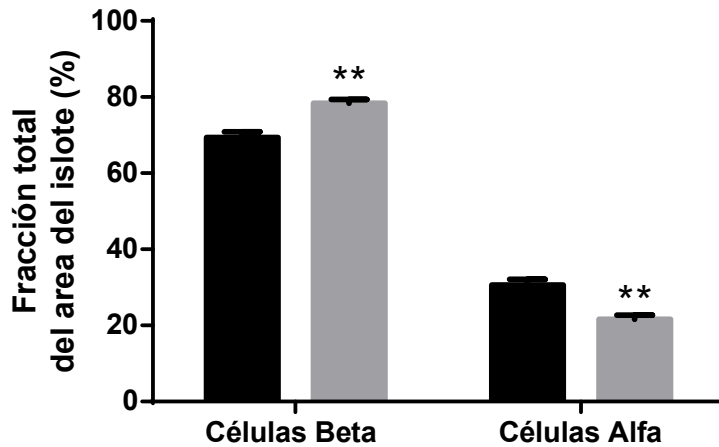
**Figura 23.** Consumo de alimento de ratones control (círculos) y ratones suplementados (cuadrados). Los datos representan la media  $\pm$ ES. Una  $n=8$  ratones para el grupo control y una  $n=9$  ratones para el grupo suplementado. La significancia fue medida por un ANOVA (dieta, tiempo).

### K.2.3. Efecto de la suplementación con biotina en la morfometría del islote pancreático

#### K.2.3.1. Composición de células alfa y beta por islote.

Debido a que se ha documentado que la composición del islote se ve modificado en etapas posteriores al destete, cuantificamos el efecto de la suplementación con biotina una semana posterior al destete en la proporción del área positiva a células beta y alfa

(Gráfica 24). Se observó que la suplementación con biotina en la dieta incrementó significativamente la proporción de células beta por islote (área positiva a insulina por islote: control=  $69.4 \pm 1.49\%$ ; Suplementado=  $78.3 \pm 1.04\%$ ) y disminuye la proporción de células alfa (área positiva a glucagón por islote: control=  $30.7 \pm 1.04\%$ ; suplementado=  $21.7 \pm 1.04$ ).

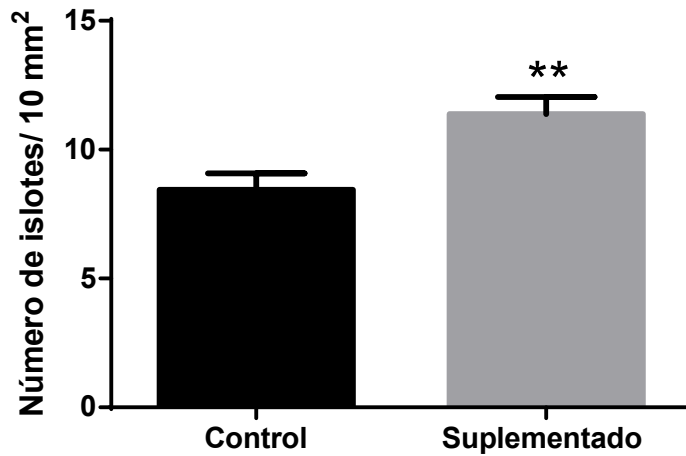


**Figura 24.** Área promedio de células positivas a insulina ( $\beta$ ) y glucagón ( $\alpha$ ). Ratones control (barra negras) y ratones suplementados con biotina (barra grises). Los valores son la media  $\pm$  ES.  $n = 4$  ratones por grupo.  $**P < 0.05$  comparado con el control. Prueba U de Mann-Whitney.

#### K.2.3.2. Número de islotes por área de corte.

Al comparar el número de islotes por área pancreática ( $10 \text{ mm}^2$ ) los resultados revelaron un incremento en el número de islotes en el grupo suplementado con biotina al compararlo con el grupo control (control=  $8.44 \pm 0.64$ ; suplementado=  $11.39 \pm 0.66$  islotes/ $10 \text{ mm}^2$  área pancreática (Gráfica 25). Este efecto no estuvo relacionado con cambios en el área pancreática total debido a que no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos (control=  $16,053 \pm 1,016$ ; Suplementado=  $15,832 \pm 2,070 \text{ mm}^2$ ).



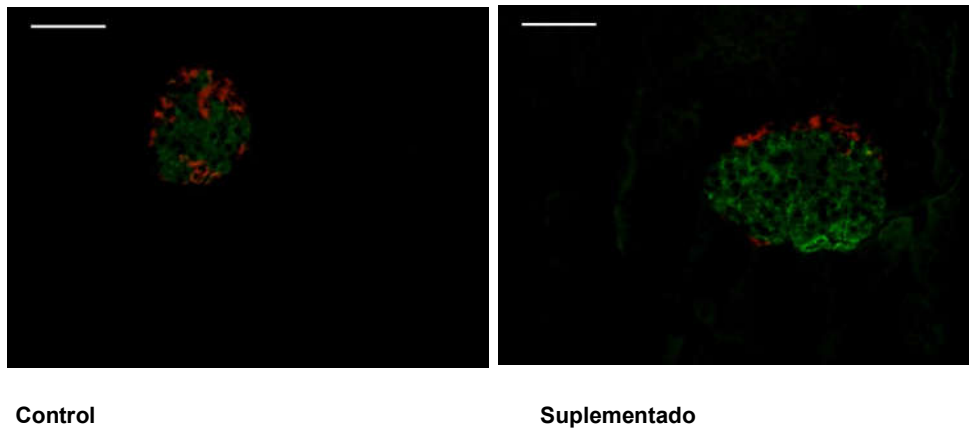


**Figura 25.** Número de islotes por área de páncreas. Ratones control (barra negra) y suplementados con biotina (barra gris). Los valores son la media  $\pm$  ES. n= 4 ratones por grupo. \*\*P<0.05 comparado con el control. Prueba T-student.

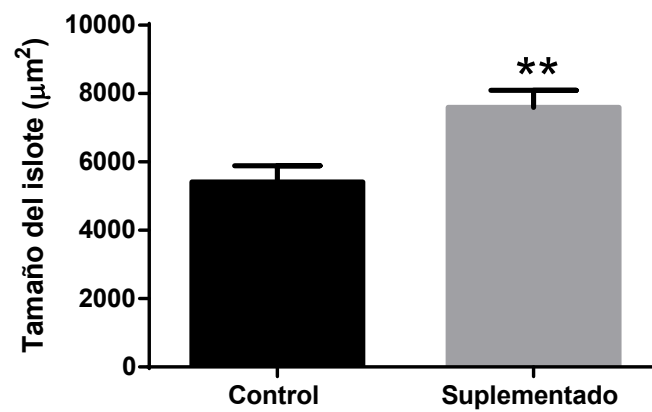
#### K.2.3.3. Área del islote.

El área del islote se cuantificó en cortes de páncreas de ratones de los dos grupos (Gráfica 26). Al comparar los dos grupos se encontró un incremento en el 40 % del área promedio del islote en los ratones que recibieron la dieta suplementada con biotina (control=  $5,415.97 \pm 474 \mu\text{m}^2$ ; suplementado:  $7,593.21 \pm 499 \mu\text{m}^2$ , P<0.05).

A



B



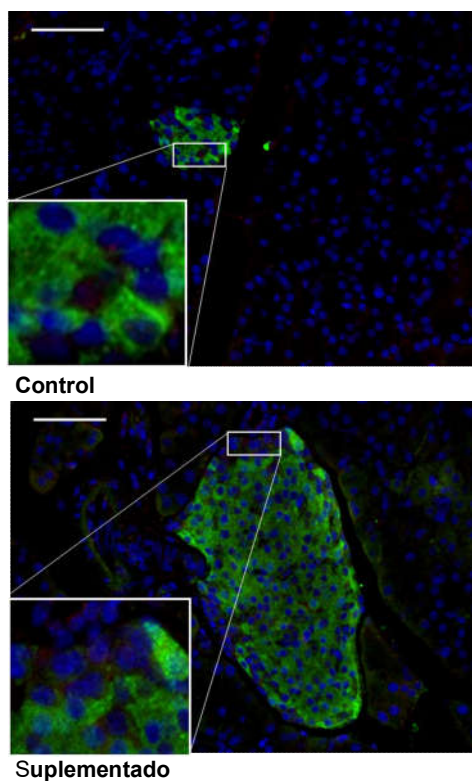
**Figura 26.** Área del islote. A) Imagen representativa de las inmunofluorescencias de células positivas a insulina (verde) y glucagon (rojo). Barra de escala representa 50 μm. B) Ratones control (barra negras) y ratones suplementados con biotina (barra grises). Valores son la media del tamaño promedio del islote (μm<sup>2</sup>) ± ES. *n* = 4 ratones por grupo. \*\**P* < 0.05 comparado con el control. Prueba U de Mann-Whitney.

## K.2.4. Efecto de la suplementación con biotina sobre la proliferación, neogénesis y apoptosis.

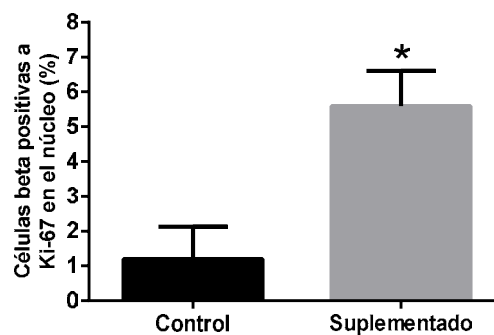
### K.2.4.1. Proliferación del islote.

Para evaluar si el incremento en las células beta y en el área del islote provocado por la suplementación con biotina se debía a un incremento en la proliferación, se decidió realizar un ensayo de inmunofluorescencia para medir la proporción de células teñidas para el antígeno nuclear Ki67 (marcador de proliferación). Nuestros resultados (Gráfica 27) revelaron que una semana de suplementación con biotina incrementó de manera significativa el número de células positivas para Ki67 (control=  $1.20 \pm 0.93$  %; Suplementado  $5.59 \pm 1.01$  %).

A



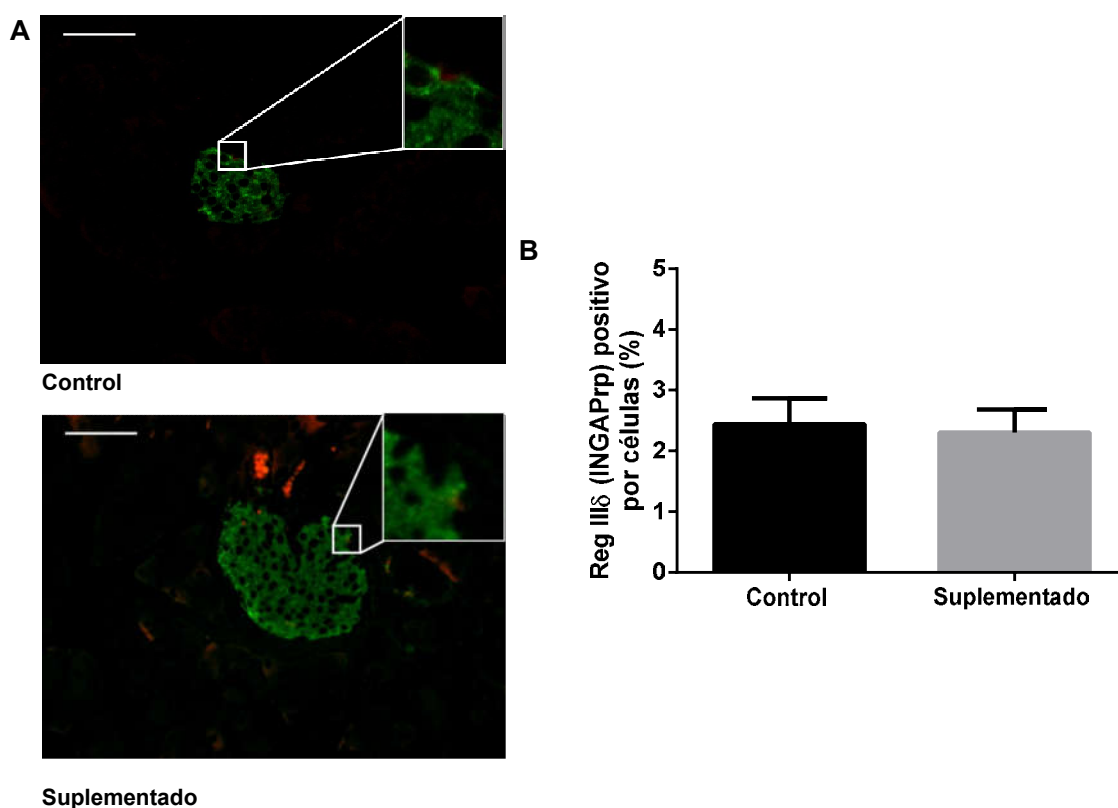
B



**Figura 27.** Efecto de la suplementación en la proliferación del islote. A) Imagen representativa de las inmunofluorescencias de células positivas a insulina (verde), Ki67 (rojo), y DAPI (azul). Barra de escala representa 50  $\mu$ m. B) Porcentaje de células  $\beta$  teñidas para Ki67 en el núcleo. Valores son la media del porcentaje  $\pm$ ES. n=4 ratones por grupo. \* $p \leq 0.01$  comparado con el grupo control. Prueba T-student.

#### K.2.4.2. Neogénesis del islote.

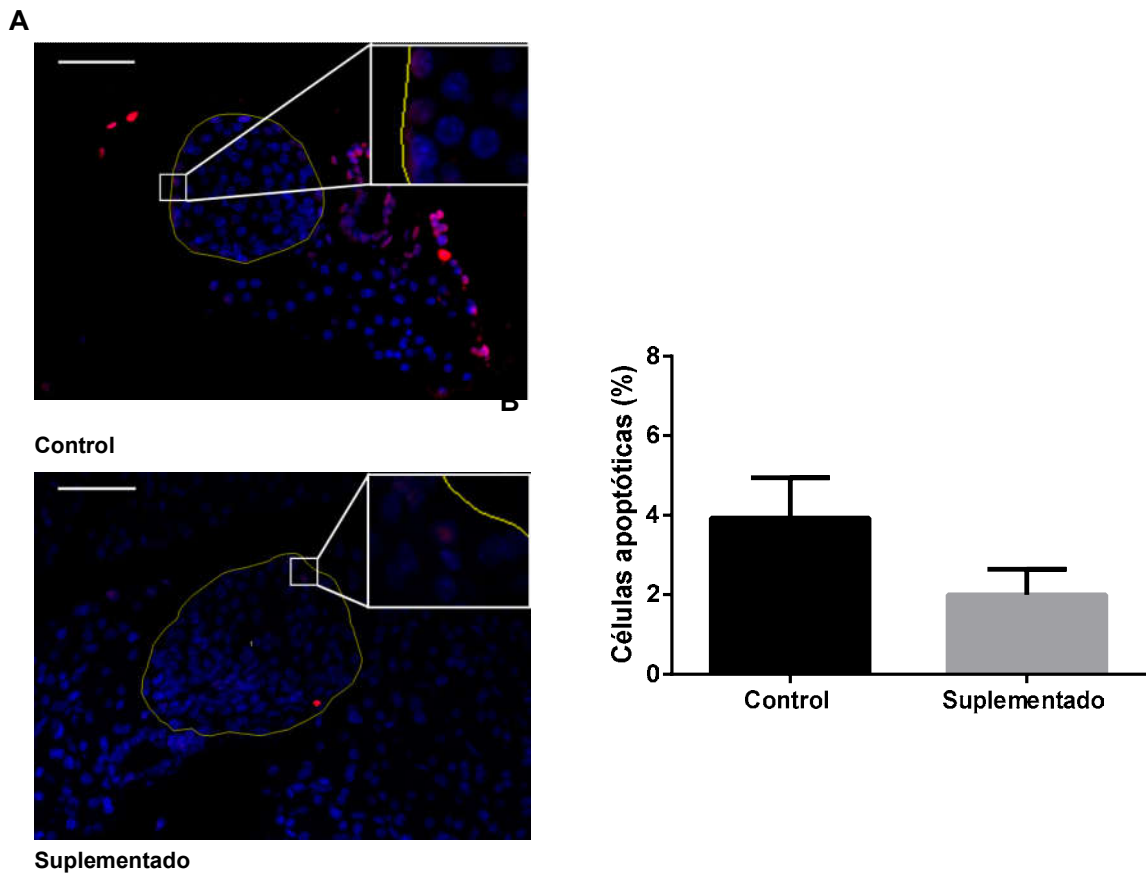
Para analizar la participación de la neogénesis en el aumento de tamaño de los islotes se determinó el porcentaje de células inmunopositivas para la proteína asociada a neogénesis (INGAPrP) en relación con el número de células positivas a insulina por islote (Gráfica 28). No se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo que recibió la dieta suplementada con biotina. ( $2.44 \pm 0.43$  y  $2.30 \pm 0.38$  %; respectivamente,  $p > 0.05$ ).



**Figura 28.** Efecto de la suplementación en la neogénesis del islote. A) Imagen representativa de las inmunofluorescencias de islotes positivos a la proteína asociada a neogénesis (INGAPrP) (rojo) e insulina (verde). Barra de escala representa 50  $\mu$ m. B) Porcentaje de células inmunopositivas para INGAPrP en relación con el número de células insulina positivas. Valores son la media del porcentaje  $\pm$ ES. n=4 ratones por grupo. Significancia evaluada por una prueba T-student,  $p > 0.05$ .

### K.2.4.3. Efecto de la suplementación con biotina sobre la apoptosis del islote

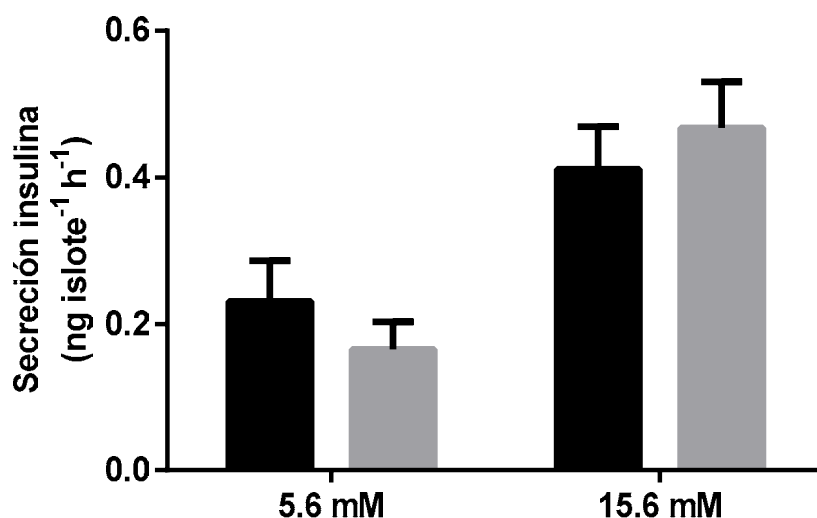
También se analizó si la suplementación con biotina tiene efectos sobre la apoptosis (Gráfica 29). Los estudios revelaron que el porcentaje de núcleos positivos a TUNEL por islote no fue significativamente diferente entre los grupos experimentales (control=  $3.93 \pm 1.01$ ; Suplementado=  $2.00 \pm 0.64$  %).



**Figura 29.** Efecto de la suplementación en la apoptosis del islote. A) Imagen representativa de las inmunofluorescencias de células positivas para TUNEL (rojo) y DAPI (azul). Barra de escala representa 50  $\mu$ m. B) Porcentaje de núcleos positivos a TUNEL por número total de núcleos. Valores son la media del porcentaje  $\pm$ ES. n=4 ratones por grupo. Significancia evaluada por una prueba T-student,  $p > 0.05$ .

### K.2.5. Efectos de la suplementación con biotina sobre la secreción de insulina en islotes aislados

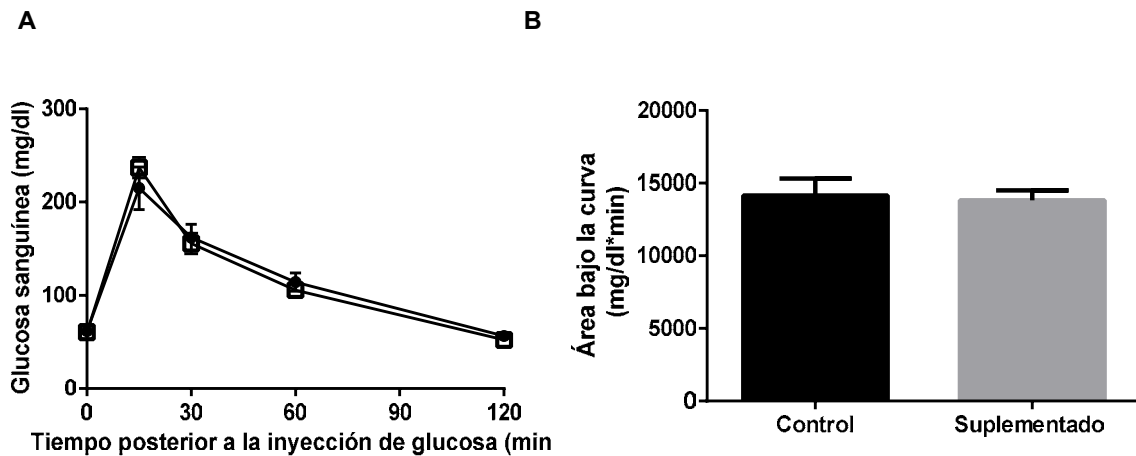
Se determinó el efecto de la suplementación con biotina en la dieta durante una semana posterior al destete sobre la secreción de insulina (Gráfica 30). Se encontró que los niveles de insulina secretada no difieren de manera significativa ni en concentraciones basales ni en las inducidas por glucosa (5.5 y 15.6 mM, respectivamente), entre los islotes aislados de ratones control y suplementados (control=  $0.23 \pm 0.05$  y  $0.41 \pm 0.05$ ; suplementados=  $0.16 \pm 0.03$  y  $0.46 \pm 0.06$  ng de insulina/islote/hora para alta y baja glucosa, respectivamente).



**Figura 30.** Efecto de la suplementación con biotina en la secreción de insulina. Secreción de insulina en respuesta a glucosa de un cultivo de islotes aislados de los grupos control y suplementado al final del tratamiento. Control (barra negra) y suplementados con biotina (barra gris). Los valores representan la media  $\pm$  ES. Los resultados son la media de tres experimentos independientes. Prueba ANOVA de dos vías,  $p > 0.05$ .

### K.2.6. Efecto de la suplementación con biotina sobre las concentraciones de glucosa en sangre y en una curva de tolerancia a glucosa

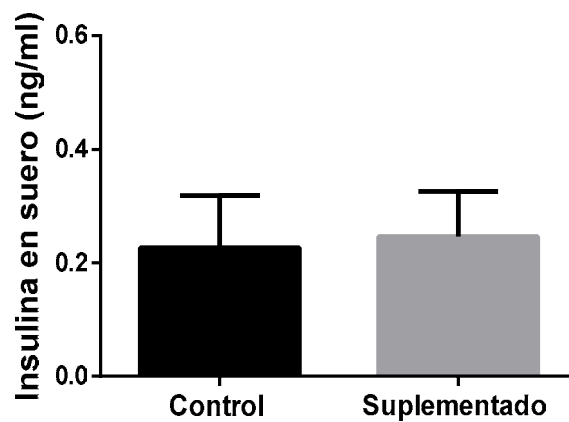
Una semana de suplementación con biotina en la dieta no modificó los niveles de glucosa en sangre (control =  $61.6 \pm 3.07$ ; suplementado =  $60.3 \pm 3.09$  mg/dl). Al realizar una curva de tolerancia a la glucosa (Gráfica 31 A) no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los tiempos. La media del total del área bajo la curva fue de  $14,159 \pm 1,171$  para el control y de  $13,819 \pm 682$  para los suplementados (Gráfica 31 B).



**Figura 31.** Efecto de la suplementación con biotina en una curva de tolerancia a la glucosa A. Concentraciones de glucosa en sangre durante una curva de tolerancia a la glucosa (2 g de glucosa/Kg de peso) de ratones control (negros) y ratones suplementados con biotina (blancos). Los datos representan la media  $\pm$ ES. Una  $n=8$  ratones para el grupo control y una  $n=8$  ratones para el grupo suplementado. Significancia fue medida por un ANOVA. B. La significancia del área bajo la curva fue determinada por una Prueba T-student.  $p>0.05$

### K.2.7. Valores séricos de insulina en condiciones de ayuno

La determinación de los niveles de insulina se realizó en muestras de sangre extraídas el día del sacrificio. Se encontró que la suplementación con biotina no modificó la concentración de insulina en suero (control=  $0.22 \pm 0.09$ ; Suplementado=  $0.24 \pm 0.07$  ng/ml,  $p > 0.05$ ) (Gráfica 32).



**Figura 32.** Concentración de insulina en sangre de ratones. Control (barra negra) y suplementados con biotina (barra gris). Los valores representan la media  $\pm$  ES.  $n=7$  para ambos grupos. Prueba T-student.



## L. DISCUSIÓN.

A pesar de la evidencia de que concentraciones farmacológicas de biotina modifican la reproducción, el desarrollo, la morfología de los islotes pancreáticos y la secreción de insulina [108,139], no existían estudios que investiguen los efectos de la suplementación con biotina en el desarrollo y la maduración de los islotes pancreáticos. En el presente estudio, se reporta que la suplementación con biotina durante la gestación y la lactancia no modifica el desarrollo de los islotes. La crías cuyas madres recibieron una dieta suplementada con biotina no mostraron cambios en el tamaño del islote, la cito-arquitectura, las proporciones de células alfa y beta por islote, la secreción de insulina o los niveles de insulina en suero. Sin embargo, se observó un incremento en la tolerancia a la glucosa, efecto que está ligado con los cambios en la tolerancia a la insulina.

Varios estudios realizados por nuestro grupo [137] y otros [133–135,140] muestran que concentraciones farmacológicas de biotina afectan, la morfología del ovario, el número de folículos primarios, el lumen vaginal o las hormonas sexuales femeninas, lo cual sugiere que la administración de concentraciones farmacológicas de biotina podrían afectar la reproducción en roedores [108,139]. En el presente estudio, la suplementación con biotina durante la gestación y la lactancia no modificó el peso corporal, la tasa de natalidad, el tamaño de la camada, la sobrevivencia o el sexo entre las crías nacidas de madres alimentadas con una dieta control o una dieta suplementada con biotina, lo que indica que la reproducción en ratones no es afectada por concentraciones farmacológicas de biotina. Nuestros resultados concuerdan con las observaciones de Watanabe et al. [136] quienes reportaron en ratones ICR que la administración de una dieta suplementada con biotina a lo largo de la gestación, no modifica la tasa de reproducción, la sobrevivencia de la camada o la presencia de malformaciones en el grupo suplementado con biotina, sin embargo su dieta contenía aproximadamente 10 veces el contenido de la dieta usada en nuestros estudios (1,000 vs 97,7 mg / kg de dieta).

El presente estudio reveló que la suplementación con biotina durante la gestación y la lactancia afecta el peso corporal de manera dependiente del género, dado que se encontró una disminución en el peso de las crías hembra y no de las crías macho. Estos resultados contrastan con varios de nuestros reportes en los cuales se muestra que la administración de la misma dieta después del destete no afecta el peso corporal

de las hembras [137,141] ni la de los machos [142,143]. Tal vez debido a que la dieta fue administrada a través de la madre durante la gestación y la lactancia y no directamente a las crías como en los otros estudios.

En el ratón, la formación de los islotes pancreáticos sucede durante el desarrollo fetal entre e14-e18, un período en el que las células endocrinas se agrupan en pequeños clústeres que abarcan un núcleo central de células beta y una capa externa de células alfa y otras células endocrinas [144–146]. Durante la lactancia, el islote continúa creciendo con una modificación en la proporción de células [21,147–149]. Al momento del destete, los islotes aun no poseen la capacidad de secretar insulina en respuesta a la glucosa, función que se adquiere luego del cambio de dieta durante la lactancia (leche dieta con mayor contenido de grasa) a comida sólida (con mayor contenido de carbohidratos) después del destete [61,73]. La maduración del islote se adquiere una semana después del destete, periodo en el cual adquieren la citoarquitectura típica [61], a través de un incremento en la masa de las células beta [71,150].

Previamente se había reportado que ratones alimentados con una dieta suplementada con biotina durante ocho semanas posteriores al destete aumentaban el tamaño de los islotes y cambiaban la topología de los islotes a través del incremento en el porcentaje de células alfa hacia el núcleo del islote, además la dieta suplementada con biotina incrementó la secreción basal y estimuladora de insulina [122]. En los estudios en el periodo postdestete [141], se encontró que una semana de suplementación con biotina después del destete incrementó el tamaño promedio del islote, el número de islotes por área pancreática, y la proporción de células beta por islote; sin embargo la dieta suplementada con biotina no afectó la secreción de insulina. En contraste, el presente estudio mostró que la dieta suplementada con biotina administrada durante la embriogénesis y antes del destete no afecta ni el tamaño del islote ni la secreción de insulina. Juntos estos datos sugieren que las condiciones fisiológicas posteriores al destete son un paso necesario para los efectos farmacológicos de la biotina en la estructura del islote, mientras que la vitamina produjo sus efectos sobre la secreción de insulina solo después de la maduración completa de la maquinaria de secreción de insulina.

Una semana de suplementación con biotina no modifica los niveles de insulina basal ni la secreción de insulina estimulada por glucosa, estos resultados contrastan con los estudios previos en los cuales encontramos que ocho semanas de suplementación con biotina incrementa la secreción de insulina [122]. Estudios recientes han demostrado

que las células beta pueden dividirse en dos grupos: 1) una población proliferativa y 2) una población de células beta maduras encargadas de la secreción de insulina [151]. Posiblemente la administración de biotina durante la primera semana estimule acciones involucradas en la proliferación y que en etapas posteriores apoye mecanismos involucrados en la secreción de insulina. Otros estudios han encontrado que concentraciones farmacológicas de biotina administradas a ratas adultas incrementa los niveles de insulina en plasma [133,152], la secreción de insulina [153,154]. Serán necesarios más estudios para probar esta hipótesis.

Varios estudios realizados tanto en humanos como en modelos animales han revelado la existencia de efectos en el metabolismo de glucosa que son dependientes del sexo [155–157]. Se ha reportado que las mujeres tienen una mayor sensibilidad a la insulina que los hombres [155,156]. Por otro lado, los hijos de madres obesas tienen mayor probabilidad que las hijas de volverse resistentes a la insulina [157]. En roedores, modelos que tengan efectos adversos sobre la gestación como la fragmentación del sueño [158], la desnutrición [159,160] o dieta alta en grasas [159] provocaron un incremento en la susceptibilidad a la obesidad y el síndrome metabólico en los hijos varones, pero no en las mujeres. Del mismo modo, el dimorfismo sexual sobre la sensibilidad a la insulina también ha sido observado en la progenie de madres que recibieron una dieta baja en proteínas durante la gestación y la lactancia [161].

Nuestros estudios mostraron que una dieta suplementada con biotina durante la gestación y la lactancia tiene efectos de dimorfismo sexual sobre la sensibilidad a la insulina, presumiblemente a través del desarrollo de la maquinaria involucrada en la acción de la hormona. Los estudios en nuestro laboratorio actualmente están investigando las diferencias moleculares relacionadas con este dimorfismo.

Nuestros resultados muestran que la suplementación con biotina tiene un efecto positivo sobre la tolerancia a la insulina lo que apoya la evidencia de que las concentraciones farmacológicas de biotina tienen efectos sobre la sensibilidad a esta hormona [162–164]. Varios estudios con roedores hiperglucémicos machos adultos, han demostrado que la suplementación con biotina mejora la tolerancia a la glucosa y la insulina [162,164], y la expresión de la forma activa del receptor de insulina [152]. Sin embargo, en un estudio anterior realizado por nuestro grupo, con ratones machos normales alimentados con una dieta suplementada con biotina durante 8 semanas después del destete, no se observó una mejor tolerancia a la insulina [122]. De acuerdo con los resultados encontrados, sería de interés comparar los efectos de las

concentraciones farmacológicas de biotina sobre la sensibilidad a la insulina entre ratones de diferente género.

Es importante señalar la relevancia de los estudios analizando los efectos de la suplementación con biotina durante la gestación y la lactancia, ya que diversos estudios han encontrado que en estos periodos incrementa la excreción de biotina y los marcadores del estado metabólico de la biotina [165], así como la existencia de un estado subóptimo de biotina en el 50% de las mujeres [97,166–168]. Estudios en animales han demostrado que la deficiencia de biotina durante la gestación tiene efectos teratogénicos y afecta el desarrollo fetal [140,166,167]. Estas observaciones han llevado a proponer que la ingesta de biotina por encima de las recomendaciones diarias de 30 µg en el embarazo y 35 µg debe de ser aumentada para satisfacer las demandas de biotina [166–168].

Nuestros datos aportan información sobre los efectos de la suplementación de biotina durante el periodo de gestación y lactancia en ratones e indican que una dieta suplementada con biotina 56 veces la cantidad de la dieta control no produjo efectos negativos en las crías de madres suplementadas durante la gestación y la lactancia, y podría tener efectos positivos sobre la sensibilidad a la insulina en las crías hembras. Sin embargo, investigaciones que profundizan los efectos de las concentraciones farmacológicas de biotina sobre diferentes tejidos y sus funciones, así como estudios longitudinales en mujeres que investigan la relación entre el estado materno de biotina y la salud infantil son obligatorios antes de considerar el uso de suplementos de biotina durante la gestación y la lactancia.

A diferencia de la falta de efecto encontrado con la administración de biotina durante la gestación y la lactancia sobre el islote pancreático, la suplementación con biotina durante una semana posterior al destete incrementa el área del islote, el número de islotes y la proporción de células beta por islote, procesos que están relacionados con la proliferación de las células beta. Se ha documentado que después del destete, los islotes incrementan su masa de manera proporcional al peso corporal [20]; sin embargo, el aumento del tamaño del islote pancreático después del destete no se debe a una diferencia en el crecimiento del tamaño del ratón ya que no se observan diferencias en la ganancia de peso entre los dos grupos; control y suplementado.

Una semana posterior al destete, el incremento de 3.6 veces en la proliferación celular y los cambios no significativos observados en apoptosis y neogénesis indican que el

incremento en el área del islote, número de islotes, y proporción de células beta en respuesta a la suplementación con biotina está dada porque se está favoreciendo la proliferación celular. Existe controversia sobre el efecto de la biotina sobre la proliferación celular: algunos estudios han indicado que concentraciones farmacológicas de biotina son capaces de incrementar la proliferación [169,170]. En células Jurkat cultivadas en un medio con concentraciones farmacológicas de biotina muestran un incremento en la proliferación durante las 4 semanas de estudio [169]. En contraste, un estudio en humanos a los que se les administra de 3. 1  $\mu\text{mol}$  de biotina oral por 14 días, muestran una disminución en la proliferación de células mononucleares en sangre periférica [170]. Estudios realizados en el embrión de pollo mostraron que en las malformaciones de retina provocadas por el tratamiento con biotina, la proliferación no estaba involucrada y que el efecto estaba relacionado con la disminución en la apoptosis [138]. Las variaciones en el tipo de células, la concentración y el periodo de investigación pueden ser la causa de las diferencias observadas.

La administración de una dieta suplementada con biotina durante una semana posterior al destete muestra diferencias en la morfología y la morfometría de los islotes con el estudio previo sobre los efectos de la suplementación con biotina [122]. Ocho semanas de una dieta suplementada con biotina incrementó el tamaño del islote debido a un incremento en la proporción de células alfa y beta, pero no en el número de células beta como se observó con una semana de suplementación con biotina. Adicionalmente, el incremento en la distribución de células alfa hacia el núcleo del islote producido por ocho semanas de suplementación con biotina no fue observado en el presente estudio (datos no mostrados). Estudios que analicen los cambios en la morfología de los islotes, realizados en diferentes periodos podrían ayudar a investigar las razones de estas diferencias.

De acuerdo con la falta de efecto de la suplementación con biotina en la secreción de insulina *in vitro* observada una semana posterior al destete, los ratones suplementados con biotina no mostraron diferencias significativas en los niveles de glucosa en sangre, la prueba de tolerancia a la glucosa o las concentraciones séricas de insulina.

La diabetes es un problema de salud mundial importante que afecta a millones de personas [171,172]. La disminución de la masa de células beta está presente tanto en la diabetes tipo 1 como en la diabetes tipo 2 [173]. Agentes que sean capaces de incrementar la proliferación de células beta sin alterar los niveles de glucosa y la

secreción de insulina representan un área importante para el desarrollo de estrategias terapéuticas para el tratamiento de la diabetes. Varios agentes como el ácido gamma-aminobutírico (GABA), la hormona tiroidea, el agonista del receptor GPR119, los activadores de la glucoquinasa [76,77], han sido propuestos como métodos para incrementar la expansión de las células beta pancreáticas. Nuestros estudios indican que la suplementación con biotina es capaz de incrementar la proliferación de células beta sin provocar efectos adversos en los animales [108,139] individuos normales [104] o pacientes con diabetes [174,175] indican que las concentraciones farmacológicas de biotina podría ser considerada como un agente para expandir la población de células beta en estrategias para combatir la diabetes.

## **M. CONCLUSIONES**

1. Nuestros estudios demuestran, por primera vez, que los efectos de la suplementación con biotina en la dieta difieren dependiendo del periodo en la que se administra. Durante la gestación y la lactancia no se producen cambios en el tamaño del islote, número de islotes, y porcentaje de células positivas a insulina. En tanto que estos parámetros se modifican cuando se administra una semana después del destete. Estos datos sugieren que las condiciones fisiológicas de postdestete son un paso requerido para los efectos farmacológicos de la biotina sobre la estructura del islote.

2. Nuestros datos muestran, por primera vez, que la suplementación con biotina durante el desarrollo y la lactancia mejoró la homeostasis de la glucosa mediante cambios en la sensibilidad a la insulina; sorprendentemente, este efecto fue dependiente del género.

## BIBLIOGRAFÍA:

- [1] P. Collombat, J. Hecksher-Sørensen, P. Serup, A. Mansouri, Specifying pancreatic endocrine cell fates., *Mech. Dev.* 123 (2006) 501–12. doi:10.1016/j.mod.2006.05.006.
- [2] F.G. Banting, C.H. Best, Pancreatic extracts. 1922., *J. Lab. Clin. Med.* 115 (1990) 254–72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2405086>.
- [3] G.A. Rutter, T.J. Pullen, D.J. Hodson, A. Martinez-Sanchez, Pancreatic  $\beta$ -cell identity, glucose sensing and the control of insulin secretion, *Biochem. J.* 466 (2015) 203–218. doi:10.1042/BJ20141384.
- [4] P.J. Cowan, S.C. Robson, A.J. d'Apice, Controlling coagulation dysregulation in xenotransplantation, *Curr. Opin. Organ Transplant.* 16 (2011) 214–221. doi:10.1097/MOT.0b013e3283446c65.
- [5] A.L. Márquez-Aguirre, A.A. Canales-Aguirre, E. Padilla-Camberos, H. Esquivel-Solis, N.E. Díaz-Martínez, Development of the endocrine pancreas and novel strategies for  $\beta$ -cell mass restoration and diabetes therapy, *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 48 (2015) 765–776. doi:10.1590/1414-431X20154363.
- [6] H.L. Larsen, A. Grapin-Botton, The molecular and morphogenetic basis of pancreas organogenesis., *Semin. Cell Dev. Biol.* 66 (2017) 51–68. doi:10.1016/j.semcdb.2017.01.005.
- [7] A. Villasenor, D.C. Chong, M. Henkemeyer, O. Cleaver, Epithelial dynamics of pancreatic branching morphogenesis, *Development.* 137 (2010) 4295–4305. doi:10.1242/dev.052993.
- [8] T. Uchida, T. Takada, B.J. Ammori, K. Suda, T. Takahashi, Three-dimensional reconstruction of the ventral and dorsal pancreas: a new insight into anatomy and embryonic development., *J. Hepatobiliary. Pancreat. Surg.* 6 (1999) 176–80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10398906>.
- [9] E.D. Bankaitis, M.E. Bechard, C.V.E. Wright, Feedback control of growth, differentiation, and morphogenesis of pancreatic endocrine progenitors in an epithelial plexus niche., *Genes Dev.* 29 (2015) 2203–16. doi:10.1101/gad.267914.115.
- [10] L.C. Murtaugh, Pancreas and beta-cell development: from the actual to the possible, *Development.* 134 (2006) 427–438. doi:10.1242/dev.02770.
- [11] R.E. Jennings, A.A. Berry, J.P. Strutt, D.T. Gerrard, N.A. Hanley, Human pancreas development, *Development.* 142 (2015) 3126–3137. doi:10.1242/dev.120063.
- [12] A. Bastidas-Ponce, K. Scheibner, H. Lickert, M. Bakhti, Cellular and molecular mechanisms coordinating pancreas development., *Development.* 144 (2017) 2873–2888. doi:10.1242/dev.140756.
- [13] A. Villasenor, D.C. Chong, O. Cleaver, Biphasic Ngn3 expression in the developing pancreas., *Dev. Dyn.* 237 (2008) 3270–9. doi:10.1002/dvdy.21740.
- [14] S. Wang, J. Yan, D.A. Anderson, Y. Xu, M.C. Kanal, Z. Cao, C.V.E. Wright, G. Gu, Neurog3 gene dosage regulates allocation of endocrine and exocrine cell fates in the developing mouse pancreas., *Dev. Biol.* 339 (2010) 26–37. doi:10.1016/j.ydbio.2009.12.009.
- [15] R. Jain, E. Lammert, Cell-cell interactions in the endocrine pancreas., *Diabetes. Obes. Metab.* 11 Suppl 4 (2009) 159–67. doi:10.1111/j.1463-1326.2009.01102.x.
- [16] M. Kharouta, K. Miller, A. Kim, P. Wojcik, G. Kilimnik, A. Dey, D.F. Steiner, M. Hara, No mantle formation in rodent islets -- the prototype of islet revisited., *Diabetes Res. Clin.*

Pract. 85 (2009) 252–7. doi:10.1016/j.diabres.2009.06.021.

- [17] S. Bonner-Weir, C. Aguayo-Mazzucato, G.C. Weir, Dynamic development of the pancreas from birth to adulthood, *Ups. J. Med. Sci.* 121 (2016) 155–158. doi:10.3109/03009734.2016.1154906.
- [18] M. Chintinne, G. Stangé, B. Denys, P. In 't Veld, K. Hellemans, M. Pipeleers-Marichal, Z. Ling, D. Pipeleers, Contribution of postnatally formed small beta cell aggregates to functional beta cell mass in adult rat pancreas., *Diabetologia.* 53 (2010) 2380–8. doi:10.1007/s00125-010-1851-4.
- [19] S. Peng, L. Zhu, M. Chen, M. Zhang, D. Li, Y. Fu, S. Chen, C. Wei, Heterogeneity in mitotic activity and telomere length implies an important role of young islets in the maintenance of islet mass in the adult pancreas., *Endocrinology.* 150 (2009) 3058–66. doi:10.1210/en.2008-1731.
- [20] E. Montanya, V. Nacher, M. Biarnés, J. Soler, Linear correlation between beta-cell mass and body weight throughout the lifespan in Lewis rats: role of beta-cell hyperplasia and hypertrophy., *Diabetes.* 49 (2000) 1341–6.
- [21] L. Scaglia, C.J. Cahill, D.T. Finegood, S. Bonner-Weir, Apoptosis participates in the remodeling of the endocrine pancreas in the neonatal rat., *Endocrinology.* 138 (1997) 1736–41. doi:10.1210/endo.138.4.5069.
- [22] L. Guo, A. Inada, C. Aguayo-Mazzucato, J. Hollister-Lock, Y. Fujitani, G.C. Weir, C.V.E. Wright, A. Sharma, S. Bonner-Weir, PDX1 in Ducts Is Not Required for Postnatal Formation of  $\beta$ -Cells but Is Necessary for Their Subsequent Maturation, *Diabetes.* 62 (2013) 3459–3468. doi:10.2337/db12-1833.
- [23] J.M. Slack, Developmental biology of the pancreas., *Development.* 121 (1995) 1569–80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7600975>.
- [24] S. Bonner-Weir, Regulation of pancreatic beta-cell mass in vivo., *Recent Prog. Horm. Res.* 49 (1994) 91–104. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8146438>.
- [25] M. Paris, C. Tourrel-Cuzin, C. Plachot, A. Ktorza, Review: pancreatic beta-cell neogenesis revisited., *Exp. Diabetes Res.* 5 (2004) 111–21. doi:10.1080/15438600490455079.
- [26] A. Parikh, A.-F. Stephan, E.S. Tzanakakis, Regenerating proteins and their expression, regulation, and signaling, *Biomol. Concepts.* 3 (2012) 57–70. doi:10.1515/bmc.2011.055.
- [27] L.E. Flores, M.E. García, M.I. Borelli, H. Del Zotto, M.E. Alzugaray, B. Maiztegui, J.J. Gagliardino, Expression of islet neogenesis-associated protein in islets of normal hamsters., *J. Endocrinol.* 177 (2003) 243–8.
- [28] K. Sasahara, T. Yamaoka, M. Moritani, K. Yoshimoto, Y. Kuroda, M. Itakura, Molecular cloning and tissue-specific expression of a new member of the regenerating protein family, islet neogenesis-associated protein-related protein., *Biochim. Biophys. Acta.* 1500 (2000) 142–6.
- [29] J. Tam, L. Rosenberg, D. Maysinger, INGAP peptide improves nerve function and enhances regeneration in streptozotocin-induced diabetic C57BL/6 mice., *FASEB J.* 18 (2004) 1767–9. doi:10.1096/fj.04-1894fje.
- [30] G.L. Pittenger, A.I. Vinik, L. Rosenberg, The partial isolation and characterization of ilotropin, a novel islet-specific growth factor., *Adv. Exp. Med. Biol.* 321 (1992) 123-30–2.
- [31] H.C. Barbosa, S. Bordin, G. Anhô, S.J. Persaud, J. Bowe, M.I. Borelli, J.J. Gagliardino, A.C. Boschero, Islet neogenesis-associated protein signaling in neonatal pancreatic rat islets: involvement of the cholinergic pathway., *J. Endocrinol.* 199 (2008) 299–306.



doi:10.1677/JOE-08-0309.

- [32] I. Swenne, U. Eriksson, Diabetes in pregnancy: islet cell proliferation in the fetal rat pancreas., *Diabetologia*. 23 (1982) 525–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6759278>
- [33] L. Bouwens, I. Rooman, Regulation of Pancreatic Beta-Cell Mass, *Physiol. Rev.* 85 (2005) 1255–1270. doi:10.1152/physrev.00025.2004.
- [34] D.T. Finegood, L. Scaglia, S. Bonner-Weir, Dynamics of beta-cell mass in the growing rat pancreas. Estimation with a simple mathematical model., *Diabetes*. 44 (1995) 249–56. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7883109>.
- [35] M. Teta, S.Y. Long, L.M. Wartschow, M.M. Rankin, J. a Kushner, Very slow turnover of beta-cells in aged adult mice., *Diabetes*. 54 (2005) 2557–67. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16123343>.
- [36] M. Stolovitch-Rain, A. Hija, J. Grimsby, B. Glaser, Y. Dor, Pancreatic beta cells in very old mice retain capacity for compensatory proliferation., *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 27407–14. doi:10.1074/jbc.M112.350736.
- [37] F.W. Pagliuca, D.A. Melton, How to make a functional  $\beta$ -cell, *Development*. 140 (2013) 2472–2483. doi:10.1242/dev.093187.
- [38] H. Ishihara, P. Maechler, A. Gjinovci, P.-L. Herrera, C.B. Wollheim, Islet beta-cell secretion determines glucagon release from neighbouring alpha-cells., *Nat. Cell Biol.* 5 (2003) 330–5. doi:10.1038/ncb951.
- [39] P. Rorsman, E. Renström, Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells., *Diabetologia*. 46 (2003) 1029–45. doi:10.1007/s00125-003-1153-1.
- [40] T.W. Chang, A.L. Goldberg, The metabolic fates of amino acids and the formation of glutamine in skeletal muscle., *J. Biol. Chem.* 253 (1978) 3685–93. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/649596>.
- [41] J.C. Henquin, Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation., *Diabetologia*. 52 (2009) 739–51. doi:10.1007/s00125-009-1314-y.
- [42] Z. Fu, E.R. Gilbert, D. Liu, Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes., *Curr. Diabetes Rev.* 9 (2013) 25–53. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22974359> (accessed October 19, 2017).
- [43] J. Gromada, M. Høy, E. Renström, K. Bokvist, L. Eliasson, S. Göpel, P. Rorsman, CaM kinase II-dependent mobilization of secretory granules underlies acetylcholine-induced stimulation of exocytosis in mouse pancreatic B-cells., *J. Physiol.* 518 ( Pt 3) (1999) 745–59. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10420011>.
- [44] S. Kashyap, R. Belfort, A. Gastaldelli, T. Pratipanawatr, R. Berria, W. Pratipanawatr, M. Bajaj, L. Mandarino, R. DeFronzo, K. Cusi, A sustained increase in plasma free fatty acids impairs insulin secretion in nondiabetic subjects genetically predisposed to develop type 2 diabetes., *Diabetes*. 52 (2003) 2461–74.
- [45] A. Salehi, B.G. Fan, M. Ekelund, G. Nordin, I. Lundquist, TPN-evoked dysfunction of islet lysosomal activity mediates impairment of glucose-stimulated insulin release., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 281 (2001) E171-9.
- [46] D.J. Steiner, A. Kim, K. Miller, M. Hara, Pancreatic islet plasticity: interspecies comparison of islet architecture and composition., *Islets*. 2 (n.d.) 135–45. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20657742>.
- [47] A. Kim, K. Miller, J. Jo, G. Kilimnik, P. Wojcik, M. Hara, Islet architecture: A comparative study, *Islets*. 1 (2009) 129–136. doi:10.4161/isl.1.2.9480.

- [48] A.A. Elayat, M.M. el-Naggar, M. Tahir, An immunocytochemical and morphometric study of the rat pancreatic islets., *J. Anat.* 186 ( Pt 3) (1995) 629–37. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7559135>.
- [49] O. Cabrera, D.M. Berman, N.S. Kenyon, C. Ricordi, P.-O. Berggren, A. Caicedo, The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 2334–9. doi:10.1073/pnas.0510790103.
- [50] J. Jeon, M. Correa-Medina, C. Ricordi, H. Edlund, J.A. Diez, Endocrine Cell Clustering During Human Pancreas Development, *J. Histochem. Cytochem.* 57 (2009) 811–824. doi:10.1369/jhc.2009.953307.
- [51] A.E. Butler, J. Janson, S. Bonner-Weir, R. Ritzel, R.A. Rizza, P.C. Butler, Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes., *Diabetes.* 52 (2003) 102–10. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12502499>.
- [52] S. Bonner-Weir, T.D. O'Brien, Islets in type 2 diabetes: in honor of Dr. Robert C. Turner., *Diabetes.* 57 (2008) 2899–904. doi:10.2337/db07-1842.
- [53] T. Hanafusa, A. Miyazaki, J. Miyagawa, S. Tamura, M. Inada, K. Yamada, Y. Shinji, H. Katsura, K. Yamagata, N. Itoh, Examination of islets in the pancreas biopsy specimens from newly diagnosed type 1 (insulin-dependent) diabetic patients., *Diabetologia.* 33 (1990) 105–11.
- [54] M. Brissova, M.J. Fowler, W.E. Nicholson, A. Chu, B. Hirshberg, D.M. Harlan, A.C. Powers, Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy., *J. Histochem. Cytochem.* 53 (2005) 1087–97. doi:10.1369/jhc.5C6684.2005.
- [55] C. Hellerström, I. Swenne, Functional maturation and proliferation of fetal pancreatic beta-cells., *Diabetes.* 40 Suppl 2 (1991) 89–93. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1748274>.
- [56] N. Freinkel, N.J. Lewis, R. Johnson, I. Swenne, A. Bone, C. Hellerström, Differential effects of age versus glycemc stimulation on the maturation of insulin stimulus-secretion coupling during culture of fetal rat islets., *Diabetes.* 33 (1984) 1028–38.
- [57] C.R. Bliss, G.W. Sharp, Glucose-induced insulin release in islets of young rats: time-dependent potentiation and effects of 2-bromostearate., *Am. J. Physiol.* 263 (1992) E890-6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1443122>.
- [58] A. Jermendy, E. Toschi, T. Aye, A. Koh, C. Aguayo-Mazzucato, A. Sharma, G.C. Weir, D. Sgroi, S. Bonner-Weir, Rat neonatal beta cells lack the specialised metabolic phenotype of mature beta cells, *Diabetologia.* 54 (2011) 594–604. doi:10.1007/s00125-010-2036-x.
- [59] C. Aguayo-Mazzucato, A. Koh, I. El Khattabi, W.-C. Li, E. Toschi, A. Jermendy, K. Juhl, K. Mao, G.C. Weir, A. Sharma, S. Bonner-Weir, Mafa expression enhances glucose-responsive insulin secretion in neonatal rat beta cells., *Diabetologia.* 54 (2011) 583–93. doi:10.1007/s00125-010-2026-z.
- [60] A. Lucas, Programming by early nutrition: an experimental approach., *J. Nutr.* 128 (1998) 401S–406S. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9478036>.
- [61] C. Aguayo-Mazzucato, C. Sanchez-Soto, V. Godinez-Puig, G. Gutiérrez-Ospina, M. Hiriart, Restructuring of pancreatic islets and insulin secretion in a postnatal critical window., *PLoS One.* 1 (2006) e35. doi:10.1371/journal.pone.0000035.
- [62] D.A. Leon, Fetal growth and adult disease., *Eur. J. Clin. Nutr.* 52 Suppl 1 (1998) S72-8-82. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9511023>.

- [63] R.A. Simmons, L.J. Templeton, S.J. Gertz, Intrauterine growth retardation leads to the development of type 2 diabetes in the rat., *Diabetes*. 50 (2001) 2279–86. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11574409>
- [64] L.U.C. Bouwens, I. Rooman, Regulation of Pancreatic Beta-Cell Mass, (2005) 1255–1270. doi:10.1152/physrev.00025.2004.
- [65] A. Garofano, P. Czernichow, B. Bréant, Beta-cell mass and proliferation following late fetal and early postnatal malnutrition in the rat., *Diabetologia*. 41 (1998) 1114–20. doi:10.1007/s001250051038.
- [66] V.M. Schwitzgebel, E. Somm, P. Klee, Modeling intrauterine growth retardation in rodents: Impact on pancreas development and glucose homeostasis., *Mol. Cell. Endocrinol.* 304 (2009) 78–83. doi:10.1016/j.mce.2009.02.019.
- [67] A. Garofano, P. Czernichow, B. Bréant, In utero undernutrition impairs rat beta-cell development., *Diabetologia*. 40 (1997) 1231–4. doi:10.1007/s001250050812.
- [68] A. Rodríguez-Trejo, M.G. Ortiz-López, E. Zambrano, M. de L.Á. Granados-Silvestre, C. Méndez, B. Blondeau, B. Bréant, P.W. Nathanielsz, M. Menjivar, Developmental programming of neonatal pancreatic  $\beta$ -cells by a maternal low-protein diet in rats involves a switch from proliferation to differentiation., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 302 (2012) E1431-9. doi:10.1152/ajpendo.00619.2011.
- [69] S. Dahri, A. Snoeck, B. Reusens-Billen, C. Remacle, J.J. Hoet, Islet function in offspring of mothers on low-protein diet during gestation., *Diabetes*. 40 Suppl 2 (1991) 115–20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1748239>.
- [70] J. Petrik, B. Reusens, E. Arany, C. Remacle, C. Coelho, J.J. Hoet, D.J. Hill, A low protein diet alters the balance of islet cell replication and apoptosis in the fetal and neonatal rat and is associated with a reduced pancreatic expression of insulin-like growth factor-II., *Endocrinology*. 140 (1999) 4861–73. doi:10.1210/endo.140.10.7042.
- [71] A. Garofano, P. Czernichow, B. Bréant, Effect of ageing on beta-cell mass and function in rats malnourished during the perinatal period., *Diabetologia*. 42 (1999) 711–8. doi:10.1007/s001250051219.
- [72] R.H. Jones, S.E. Ozanne, Fetal programming of glucose-insulin metabolism., *Mol. Cell. Endocrinol.* 297 (2009) 4–9. doi:10.1016/j.mce.2008.06.020.
- [73] C. Jacovetti, S.J. Matkovich, A. Rodriguez-Trejo, C. Guay, R. Regazzi, Postnatal  $\beta$ -cell maturation is associated with islet-specific microRNA changes induced by nutrient shifts at weaning., *Nat. Commun.* 6 (2015) 8084. doi:10.1038/ncomms9084.
- [74] K.A. Matthews, W.B. Rhoten, H.K. Driscoll, B.S. Chertow, Vitamin A deficiency impairs fetal islet development and causes subsequent glucose intolerance in adult rats., *J. Nutr.* 134 (2004) 1958–63. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15284383>
- [75] O. Dumortier, B. Blondeau, B. Duvillié, B. Reusens, B. Bréant, C. Remacle, Different mechanisms operating during different critical time-windows reduce rat fetal beta cell mass due to a maternal low-protein or low-energy diet, *Diabetologia*. 50 (2007) 2495–2503. doi:10.1007/s00125-007-0811-0.
- [76] Q. Li, Z.-C. Lai, Recent progress in studies of factors that elicit pancreatic  $\beta$ -cell expansion., *Protein Cell*. 6 (2015) 81–7. doi:10.1007/s13238-014-0123-3.
- [77] A.R. Cox, C.J. Lam, M.M. Rankin, J.S. Rios, J. Chavez, C.W. Bonnyman, K.B. King, R.A. Wells, D. Anthony, J.X. Tu, J.J. Kim, C. Li, J.A. Kushner, Incretin Therapies Do Not Expand  $\beta$ -Cell Mass or Alter Pancreatic Histology in Young Male Mice, *Endocrinology*. 158 (2017) 1701–1714. doi:10.1210/en.2017-00027.

- [78] R.J. McMahon, Biotin in metabolism and molecular biology., *Annu. Rev. Nutr.* 22 (2002) 221–39. doi:10.1146/annurev.nutr.22.121101.112819.
- [79] Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline, National Academies Press, Washington, D.C., 1998. doi:10.17226/6015.
- [80] S.M. Innis, D.B. Allardyce, Possible biotin deficiency in adults receiving long-term total parenteral nutrition., *Am. J. Clin. Nutr.* 37 (1983) 185–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6401910>.
- [81] A.A. Yates, S.A. Schlicker, C.W. Sutor, Dietary Reference Intakes: the new basis for recommendations for calcium and related nutrients, B vitamins, and choline., *J. Am. Diet. Assoc.* 98 (1998) 699–706. doi:10.1016/S0002-8223(98)00160-6.
- [82] G.F. Combs, *The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health*, Elsevier Academic Press, 2008.
- [83] C.G. Staggs, W.M. Sealey, B.J. McCabe, A.M. Teague, D.M. Mock, Determination of the biotin content of select foods using accurate and sensitive HPLC/avidin binding., *J. Food Compos. Anal.* 17 (2004) 767–776. doi:10.1016/j.jfca.2003.09.015.
- [84] D.B. McCormick, Z. Zhang, Cellular assimilation of water-soluble vitamins in the mammal: riboflavin, B6, biotin, and C., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 202 (1993) 265–70. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8437980> (accessed October 19, 2017).
- [85] D.M. Mock, M.I. Malik, Distribution of biotin in human plasma: most of the biotin is not bound to protein., *Am. J. Clin. Nutr.* 56 (1992) 427–32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1636621>.
- [86] P.D. Prasad, H. Wang, R. Kekuda, T. Fujita, Y.J. Fei, L.D. Devoe, F.H. Leibach, V. Ganapathy, Cloning and functional expression of a cDNA encoding a mammalian sodium-dependent vitamin transporter mediating the uptake of pantothenate, biotin, and lipoate., *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 7501–6.
- [87] P.D. Prasad, S. Ramamoorthy, F.H. Leibach, V. Ganapathy, Characterization of a sodium-dependent vitamin transporter mediating the uptake of pantothenate, biotin and lipoate in human placental choriocarcinoma cells., *Placenta.* 18 (1997) 527–33.
- [88] P.D. Prasad, H. Wang, W. Huang, Y.J. Fei, F.H. Leibach, L.D. Devoe, V. Ganapathy, Molecular and functional characterization of the intestinal Na<sup>+</sup>-dependent multivitamin transporter., *Arch. Biochem. Biophys.* 366 (1999) 95–106. doi:10.1006/abbi.1999.1213.
- [89] R.L. Daberkow, B.R. White, R.A. Cederberg, J.B. Griffin, J. Zemleni, Monocarboxylate transporter 1 mediates biotin uptake in human peripheral blood mononuclear cells., *J. Nutr.* 133 (2003) 2703–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12949353>
- [90] F. Grafe, W. Wohlrab, R.H. Neubert, M. Brandsch, Transport of biotin in human keratinocytes., *J. Invest. Dermatol.* 120 (2003) 428–33. doi:10.1046/j.1523-1747.2003.12058.x.
- [91] J. Zemleni, Uptake, localization, and noncarboxylase roles of biotin., *Annu. Rev. Nutr.* 25 (2005) 175–96. doi:10.1146/annurev.nutr.25.121304.131724.
- [92] J. Zemleni, D.B. McCormick, D.M. Mock, Identification of biotin sulfone, bisnorbiotin methyl ketone, and tetranorbiotin-I-sulfoxide in human urine., *Am. J. Clin. Nutr.* 65 (1997) 508–11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9022537>
- [93] J. Zemleni, D.M. Mock, Uptake and metabolism of biotin by human peripheral blood mononuclear cells., *Am. J. Physiol.* 275 (1998) C382-8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9688592>.

- [94] N.I. Mock, D.M. Mock, Biotin deficiency in rats: disturbances of leucine metabolism are detectable early., *J. Nutr.* 122 (1992) 1493–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1619476>
- [95] K.M. Gibson, M.J. Bennett, E.W. Naylor, D.H. Morton, 3-Methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase deficiency in Amish/Mennonite adults identified by detection of increased acylcarnitines in blood spots of their children., *J. Pediatr.* 132 (1998) 519–23.
- [96] D.T. Forman, D.D. Bankson, W.E. Highsmith, Neonatal screening for biotinidase deficiency., *Ann. Clin. Lab. Sci.* 22 (n.d.) 144–54.
- [97] D.M. Mock, D.D. Stadler, S.L. Stratton, N.I. Mock, Biotin status assessed longitudinally in pregnant women., *J. Nutr.* 127 (1997) 710–6.
- [98] D.M. Mock, N.I. Mock, J.A. Dankle, Secretory patterns of biotin in human milk., *J. Nutr.* 122 (1992) 546–52. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1542012>
- [99] M.N. CORYELL, M.E. HARRIS, Human milk studies; nicotinic acid, pantothenic acid and biotin contents of colostrum and mature human milk., *Am. J. Dis. Child.* 70 (1945) 150–61. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21004402>.
- [100] D.M. Mock, N.I. Mock, S.L. Stratton, Concentrations of biotin metabolites in human milk., *J. Pediatr.* 131 (1997) 456–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9329428>
- [101] D.M. Mock, N.I. Mock, S.E. Langbehn, Biotin in human milk: methods, location, and chemical form., *J. Nutr.* 122 (1992) 535–45. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1542011>.
- [102] J.S. Kopinski, J. Leibholz, R.J. Love, Biotin studies in pigs. 5. The post-ileal absorption of biotin., *Br. J. Nutr.* 62 (1989) 781–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2605167>.
- [103] B.P. Klein, *Handbook of Vitamins: Nutritional, Biochemical, and Clinical Aspects*, *J. Pharm. Sci.* 74 (1985) 1024–1025. doi:10.1002/jps.2600740933.
- [104] M.Z. Fiume, Cosmetic Ingredient Review Expert Panel, Final report on the safety assessment of biotin., *Int. J. Toxicol.* 20 Suppl 4 (2001) 1–12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11800048>
- [105] H. Sawamura, T. Fukuwatari, K. Shibata, Effects of excess biotin administration on the growth and urinary excretion of water-soluble vitamins in young rats., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71 (2007) 2977–84. doi:10.1271/bbb.70381.
- [106] H.G. Wood, R.E. Barden, Biotin enzymes., *Annu. Rev. Biochem.* 46 (1977) 385–413. doi:10.1146/annurev.bi.46.070177.002125.
- [107] J.J. Cazzulo, T.K. Sundaram, S.N. Dilks, H.L. Kornberg, Synthesis of pyruvate carboxylase from its apoenzyme and (+)-biotin in *Bacillus stearothermophilus*. Purification and properties of the apoenzyme and the holoenzyme synthetase., *Biochem. J.* 122 (1971) 653–61.
- [108] L. Riveron-Negrete, C. Fernandez-Mejia, Pharmacological Effects of Biotin in Animals., *Mini Rev. Med. Chem.* 17 (2017) 529–540. doi:10.2174/1389557516666160923132611.
- [109] K. Dakshinamurti, C. Cheah-Tan, Biotin-mediated synthesis of hepatic glucokinase in the rat., *Arch. Biochem. Biophys.* 127 (1968) 17–21.
- [110] K. Dakshinamurti, S. Litvak, Biotin and protein synthesis in rat liver., *J. Biol. Chem.* 245 (1970) 5600–5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5472359>
- [111] J. Chauhan, K. Dakshinamurti, Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats., *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 10035–8.

- [112] S. Wiedmann, R. Rodriguez-Melendez, D. Ortega-Cuellar, J. Zempleni, Clusters of biotin-responsive genes in human peripheral blood mononuclear cells., *J. Nutr. Biochem.* 15 (2004) 433–9. doi:10.1016/j.jnutbio.2004.02.005.
- [113] J.C. Collins, E. Paietta, R. Green, A.G. Morell, R.J. Stockert, Biotin-dependent expression of the asialoglycoprotein receptor in HepG2., *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 11280–3. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2457019>
- [114] L. a De La Vega, R.J. Stockert, Regulation of the insulin and asialoglycoprotein receptors via cGMP-dependent protein kinase., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279 (2000) C2037–42. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11078721>.
- [115] Y. Sugita, H. Shirakawa, R. Sugimoto, Y. Furukawa, M. Komai, Effect of biotin treatment on hepatic gene expression in streptozotocin-induced diabetic rats., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72 (2008) 1290–8. doi:10.1271/bbb.70781.
- [116] A. Vilches-Flores, A.R. Tovar, A. Marin-Hernandez, A. Rojas-Ochoa, C. Fernandez-Mejia, Biotin increases glucokinase expression via soluble guanylate cyclase/protein kinase G, adenosine triphosphate production and autocrine action of insulin in pancreatic rat islets., *J. Nutr. Biochem.* 21 (2010) 606–12. doi:10.1016/j.jnutbio.2009.03.009.
- [117] H. Sone, M. Ito, K. Sugiyama, M. Ohneda, M. Maebashi, Y. Furukawa, Biotin enhances glucose-stimulated insulin secretion in the isolated perfused pancreas of the rat., *J. Nutr. Biochem.* 10 (1999) 237–43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15539296>.
- [118] G. Romero-Navarro, G. Cabrera-Valladares, M.S. German, F.M. Matschinsky, A. Velazquez, J. Wang, C. Fernandez-Mejia, Biotin regulation of pancreatic glucokinase and insulin in primary cultured rat islets and in biotin-deficient rats., *Endocrinology.* 140 (1999) 4595–600. doi:10.1210/endo.140.10.7084.
- [119] F.M. Matschinsky, Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm., *Diabetes.* 45 (1996) 223–41. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8549869>.
- [120] S. Porat, N. Weinberg-Corem, S. Tornovsky-Babaey, R. Schyr-Ben-Haroush, A. Hija, M. Stolovich-Rain, D. Dadon, Z. Granot, V. Ben-Hur, P. White, C.A. Girard, R. Karni, K.H. Kaestner, F.M. Ashcroft, M.A. Magnuson, A. Saada, J. Grimsby, B. Glaser, Y. Dor, Control of pancreatic  $\beta$  cell regeneration by glucose metabolism., *Cell Metab.* 13 (2011) 440–449. doi:10.1016/j.cmet.2011.02.012.
- [121] H. Yoshikawa, Y. Tajiri, Y. Sako, T. Hashimoto, F. Umeda, H. Nawata, Effects of biotin on glucotoxicity or lipotoxicity in rat pancreatic islets., *Metabolism.* 51 (2002) 163–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11833042>.
- [122] M.L. Lazo de la Vega-Monroy, E. Larrieta, M.S. German, a Baez-Saldana, C. Fernandez-Mejia, Effects of biotin supplementation in the diet on insulin secretion, islet gene expression, glucose homeostasis and beta-cell proportion., *J. Nutr. Biochem.* 24 (2013) 169–77. doi:10.1016/j.jnutbio.2012.03.020.
- [123] P.H. Simmins, P.H. Brooks, Supplementary biotin for sows: effect on reproductive characteristics., *Vet. Rec.* 112 (1983) 425–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6868304> (accessed October 19, 2017).
- [124] P.H. Brooks, D.A. Smith, V.C. Irwin, Biotin-supplementation of diets; the incidence of foot lesions, and the reproductive performance of sows., *Vet. Rec.* 101 (1977) 46–50. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/888322>.
- [125] C.A. Zimmerly, W.P. Weiss, Effects of Supplemental Dietary Biotin on Performance of Holstein Cows During Early Lactation, *J. Dairy Sci.* 84 (2001) 498–506. doi:10.3168/jds.S0022-0302(01)74500-6.

- [126] S. Kinal, J. Twardoń, M. Bednarski, J. Preś, R. Bodarski, M. Słupczyńska, M. Ochota, G.J. Dejneka, The influence of administration of biotin and zinc chelate (Zn-methionine) to cows in the first and second trimester of lactation on their health and productivity., *Pol. J. Vet. Sci.* 14 (2011) 103–10. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21528719>
- [127] H. Daryabari, A. Akhlaghi, M.J. Zamiri, G.R. Mianji, Z.A. Pirsaraei, H. Deldar, A.N. Eghbalian, Reproductive performance and oviductal expression of avidin and avidin-related protein-2 in young and old broiler breeder hens orally exposed to supplementary biotin., *Poult. Sci.* 93 (2014) 2289–95. doi:10.3382/ps.2013-03862.
- [128] G. Kalthur, S.R. Salian, F. Keyvanifard, S. Sreedharan, J.S. Thomas, P. Kumar, S.K. Adiga, Supplementation of biotin to sperm preparation medium increases the motility and longevity in cryopreserved human spermatozoa, *J. Assist. Reprod. Genet.* 29 (2012) 631–635. doi:10.1007/s10815-012-9760-8.
- [129] H. Sawamura, C. Ikeda, R. Shimada, Y. Yoshii, T. Watanabe, Dietary intake of high-dose biotin inhibits spermatogenesis in young rats, *Congenit. Anom. (Kyoto)*. 55 (2015) 31–36. doi:10.1111/cga.12070.
- [130] E. Cohen, H.Z. Levinson, Disrupted fertility of the hidebeetle *Dermestes maculatus* (Deg.) due to dietary overdosage of biotin., *Experientia*. 24 (1968) 367–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5705194>.
- [131] C.A. Benschoter, Effect of dietary biotin on reproduction of the house fly., *J. Econ. Entomol.* 60 (1967) 1326–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6054440>
- [132] M.K. Pillai, B. V Medhukar, Effect of biotin on the fertility of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* (L.), *Naturwissenschaften*. 56 (1969) 218–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5360109>.
- [133] P.K. Paul, P.N. Duttagupta, The effect of an acute dose of biotin at the pre-implantation stage and its relation with female sex steroids in the rat., *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. 21 (1975) 89–101. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1171166>
- [134] P.K. Paul, P.N. Duttagupta, The effect of an acute dose of biotin at a post-implantation stage and its relation with female sex steroids in the rat., *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. 22 (1976) 181–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/966075>
- [135] P.K. Paul, P.N. Duttagupta, H.C. Agarwal, Effects of an acute dose of biotin on the reproductive organs of the female rat., *Curr. Sci.* 42 (1973) 206–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4807697>.
- [136] T. Watanabe, Morphological and biochemical effects of excessive amounts of biotin on embryonic development in mice., *Experientia*. 52 (1996) 149–54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8608817>.
- [137] A. Báez-Saldaña, I. Camacho-Arroyo, J.J. Espinosa-Aguirre, T. Neri-Gómez, A. Rojas-Ochoa, C. Guerra-Araiza, E. Larrieta, P. Vital, G. Díaz, R. Chavira, C. Fernandez-Mejia, Biotin deficiency and biotin excess: effects on the female reproductive system., *Steroids*. 74 (2009) 863–9. doi:10.1016/j.steroids.2009.06.004.
- [138] A.I. Valenciano, R. Mayordomo, E.J. de La Rosa, F. Hallböök, Biotin decreases retinal apoptosis and induces eye malformations in the early chick embryo., *Neuroreport*. 13 (2002) 297–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11930126>
- [139] C. Fernandez-Mejia, M.-L. Lazo-de-la-Vega-Monroy, Biological Effects of Pharmacological Concentrations of Biotin, *J. Evid. Based. Complementary Altern. Med.* 16 (2011) 40–48. doi:10.1177/1533210110392947.
- [140] T. Watanabe, Y. Nagai, A. Taniguchi, S. Ebara, S. Kimura, T. Fukui, Effects of biotin deficiency on embryonic development in mice., *Nutrition*. 25 (2009) 78–84.

doi:10.1016/j.nut.2008.06.031.

- [141] W. Tixi-Verdugo, J. Contreras-Ramos, G. Sicilia-Argumedo, M.S. German, C. Fernandez-Mejia, Effects of Biotin Supplementation During the First Week Postweaning Increases Pancreatic Islet Area, Beta-Cell Proportion, Islets Number, and Beta-Cell Proliferation, *J. Med. Food.* (2017) jmf.2017.0077. doi:10.1089/jmf.2017.0077.
- [142] E. Larrieta, M.L.L. de la Vega-Monroy, P. Vital, A. Aguilera, M.S. German, M. El Hafidi, C. Fernandez-Mejia, Effects of biotin deficiency on pancreatic islet morphology, insulin sensitivity and glucose homeostasis., *J. Nutr. Biochem.* 23 (2012) 392–9. doi:10.1016/j.jnutbio.2011.01.003.
- [143] A. Aguilera-Méndez, C. Fernández-Mejía, The hypotriglyceridemic effect of biotin supplementation involves increased levels of cGMP and AMPK activation, *BioFactors.* 38 (2012) 387–394. doi:10.1002/biof.1034.
- [144] P. a Seymour, M. Sander, Historical perspective: beginnings of the beta-cell: current perspectives in beta-cell development., *Diabetes.* 60 (2011) 364–76. doi:10.2337/db10-1068.
- [145] J.F. Habener, D.M. Kemp, M.K. Thomas, Minireview: transcriptional regulation in pancreatic development., *Endocrinology.* 146 (2005) 1025–34. doi:10.1210/en.2004-1576.
- [146] V.M. Schwitzgebel, D.W. Scheel, J.R. Connors, J. Kalamaras, J.E. Lee, D.J. Anderson, L. Sussel, J.D. Johnson, M.S. German, Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas., *Development.* 127 (2000) 3533–42.
- [147] S. Georgia, A. Bhushan,  $\beta$  cell replication is the primary mechanism for maintaining postnatal  $\beta$  cell mass, 114 (2004) 963–968. doi:10.1172/JC1200422098.The.
- [148] J. Jo, G. Kilimnik, A. Kim, C. Guo, V. Periwai, M. Hara, Formation of pancreatic islets involves coordinated expansion of small islets and fission of large interconnected islet-like structures., *Biophys. J.* 101 (2011) 565–74. doi:10.1016/j.bpj.2011.06.042.
- [149] K. Miller, A. Kim, G. Kilimnik, J. Jo, U. Moka, V. Periwai, M. Hara, Islet Formation during the Neonatal Development in Mice, *PLoS One.* 4 (2009) e7739. doi:10.1371/journal.pone.0007739.
- [150] E. HEINZE, J. STEINKE, Glucose Metabolism of Isolated Pancreatic Islets: Difference Between Fetal, Newborn and Adult Rats, *Endocrinology.* 88 (1971) 1259–1263. doi:10.1210/endo-88-5-1259.
- [151] E. Bader, A. Migliorini, M. Gegg, N. Moruzzi, J. Gerdes, S.S. Roscioni, M. Bakhti, E. Brandl, M. Irmeler, J. Beckers, M. Aichler, A. Feuchtinger, C. Leitzinger, H. Zischka, R. Wang-Sattler, M. Jastroch, M. Tschöp, F. Machicao, H. Staiger, H.-U. Häring, H. Chmelova, J.A. Chouinard, N. Oskolkov, O. Korsgren, S. Speier, H. Lickert, Identification of proliferative and mature  $\beta$ -cells in the islets of Langerhans, *Nature.* 535 (2016) 430–434. doi:10.1038/nature18624.
- [152] K. Sahin, M. Tuzcu, C. Orhan, N. Sahin, O. Kucuk, I.H. Ozercan, V. Juturu, J.R. Komorowski, Anti-diabetic activity of chromium picolinate and biotin in rats with type 2 diabetes induced by high-fat diet and streptozotocin., *Br. J. Nutr.* 110 (2013) 197–205. doi:10.1017/S0007114512004850.
- [153] A. Vilches-Flores, A.R. Tovar, A. Marin-Hernandez, A. Rojas-Ochoa, C. Fernandez-Mejia, Biotin increases glucokinase expression via soluble guanylate cyclase/protein kinase G, adenosine triphosphate production and autocrine action of insulin in pancreatic rat islets., *J. Nutr. Biochem.* 21 (2010) 606–12. doi:10.1016/j.jnutbio.2009.03.009.
- [154] H. Sone, M. Ito, K. Sugiyama, M. Ohneda, M. Maebashi, Y. Furukawa, Biotin enhances



- glucose-stimulated insulin secretion in the isolated perfused pancreas of the rat., *J. Nutr. Biochem.* 10 (1999) 237–43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15539296> (accessed October 19, 2017).
- [155] O. Varlamov, C.L. Bethea, C.T. Roberts, Sex-Specific Differences in Lipid and Glucose Metabolism, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 5 (2015) 241. doi:10.3389/fendo.2014.00241.
- [156] Y. Macotela, J. Boucher, T.T. Tran, C.R. Kahn, Sex and Depot Differences in Adipocyte Insulin Sensitivity and Glucose Metabolism, *Diabetes*. 58 (2009) 803–812. doi:10.2337/db08-1054.
- [157] G. Mingrone, M. Manco, M.E. Valera Mora, C. Guidone, A. Iaconelli, D. Gniuli, L. Leccesi, C. Chiellini, G. Ghirlanda, Influence of Maternal Obesity on Insulin Sensitivity and Secretion in Offspring, *Diabetes Care*. 31 (2008) 1872–1876. doi:10.2337/dc08-0432.
- [158] A. Khalyfa, A. Carreras, I. Almendros, F. Hakim, D. Gozal, Sex dimorphism in late gestational sleep fragmentation and metabolic dysfunction in offspring mice., *Sleep*. 38 (2015) 545–57. doi:10.5665/sleep.4568.
- [159] K.A. Pennington, J.L. Harper, A.N. Sigafos, L.M. Beffa, S.M. Carleton, C.L. Phillips, L.C. Schulz, Effect of food restriction and leptin supplementation on fetal programming in mice., *Endocrinology*. 153 (2012) 4556–67. doi:10.1210/en.2012-1119.
- [160] S.P. Ford, B.W. Hess, M.M. Schwowe, M.J. Nijland, J.S. Gilbert, K.A. Vonnahme, W.J. Means, H. Han, P.W. Nathanielsz, Maternal undernutrition during early to mid-gestation in the ewe results in altered growth, adiposity, and glucose tolerance in male offspring., *J. Anim. Sci.* 85 (2007) 1285–94. doi:10.2527/jas.2005-624.
- [161] M.C. Sugden, M.J. Holness, Gender-specific programming of insulin secretion and action., *J. Endocrinol.* 175 (2002) 757–67. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12475386>.
- [162] A. Reddi, B. DeAngelis, O. Frank, N. Lasker, H. Baker, Biotin supplementation improves glucose and insulin tolerances in genetically diabetic KK mice., *Life Sci.* 42 (1988) 1323–30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3280936>.
- [163] Y. Sasaki, H. Sone, S. Kamiyama, M. Shimizu, H. Shirakawa, Y. Kagawa, M. Komai, Y. Furukawa, Administration of biotin prevents the development of insulin resistance in the skeletal muscles of Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats., *Food Funct.* 3 (2012) 414–9. doi:10.1039/c2fo10175k.
- [164] H. Zhang, K. Osada, M. Maebashi, M. Ito, M. Komai, Y. Furukawa, A high biotin diet improves the impaired glucose tolerance of long-term spontaneously hyperglycemic rats with non-insulin-dependent diabetes mellitus., *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. 42 (1996) 517–26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9089478>.
- [165] D.M. Mock, Adequate intake of biotin in pregnancy: why bother?, *J. Nutr.* 144 (2014) 1885–6. doi:10.3945/jn.114.203356.
- [166] D.M. Mock, J.G. Quirk, N.I. Mock, Marginal biotin deficiency during normal pregnancy., *Am. J. Clin. Nutr.* 75 (2002) 295–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11815321>.
- [167] D.M. Mock, Marginal biotin deficiency is common in normal human pregnancy and is highly teratogenic in mice., *J. Nutr.* 139 (2009) 154–7. doi:10.3945/jn.108.095273.
- [168] C.A. Perry, A.A. West, A. Gayle, L.K. Lucas, J. Yan, X. Jiang, O. Malysheva, M.A. Caudill, Pregnancy and lactation alter biomarkers of biotin metabolism in women consuming a controlled diet., *J. Nutr.* 144 (2014) 1977–84. doi:10.3945/jn.114.194472.

- [169] S.E.R.H. Crisp, J.B. Griffin, B.R. White, C.F. Toombs, G. Camporeale, H.M. Said, J. Zempleni, Biotin supply affects rates of cell proliferation, biotinylation of carboxylases and histones, and expression of the gene encoding the sodium-dependent multivitamin transporter in JAr choriocarcinoma cells., *Eur. J. Nutr.* 43 (2004) 23–31. doi:10.1007/s00394-004-0435-9.
- [170] J. Zempleni, R.M. Helm, D.M. Mock, In vivo biotin supplementation at a pharmacologic dose decreases proliferation rates of human peripheral blood mononuclear cells and cytokine release., *J. Nutr.* 131 (2001) 1479–84. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11340103>.
- [171] D.R. Whiting, L. Guariguata, C. Weil, J. Shaw, IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 94 (2011) 311–321. doi:10.1016/j.diabres.2011.10.029.
- [172] M. Shomali, Diabetes treatment in 2025: can scientific advances keep pace with prevalence?, *Ther. Adv. Endocrinol. Metab.* 3 (2012) 163–73. doi:10.1177/2042018812465639.
- [173] A.M. Ackermann, M. Gannon, Molecular regulation of pancreatic  $\beta$ -cell mass development, maintenance, and expansion, *J. Mol. Endocrinol.* 38 (2007) 193–206. doi:10.1677/JME-06-0053.
- [174] M. MAEBASHI, Y. MAKINO, Y. FURUKAWA, K. OHINATA, S. KIMURA, T. SATO, Therapeutic Evaluation of the Effect of Biotin on Hyperglycemia in Patients with Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus., *J. Clin. Biochem. Nutr.* 14 (1993) 211–218. doi:10.3164/jcbrn.14.211.
- [175] D. Koutsikos, C. Fourtounas, A. Kapetanaki, B. Agroyannis, H. Tzanatos, G. Rammos, I. Kopelias, B. Bosiolis, O. Bovoleti, M. Darema, G. Sallum, Oral glucose tolerance test after high-dose i.v. biotin administration in normogluceemic hemodialysis patients., *Ren. Fail.* 18 (1996) 131–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8820510>.

## Effects of Biotin Supplementation During the First Week Postweaning Increases Pancreatic Islet Area, Beta-Cell Proportion, Islets Number, and Beta-Cell Proliferation

Wilma Tixi-Verdugo,<sup>1</sup> Juan Contreras-Ramos,<sup>1</sup> Gloria Sicilia-Argumedo,<sup>1</sup> Michael S. German,<sup>2</sup> and Cristina Fernandez-Mejia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Nutritional Genetics Unit, Biomedical Research Institute, National Autonomous University of Mexico/Pediatrics National Institute, Mexico City, Mexico.

<sup>2</sup>Diabetes Center/Center of Regeneration Medicine and Stem Cell Research, University of California San Francisco, San Francisco, California, USA.

**ABSTRACT** During maturation, pancreatic islets achieve their full capacity to secrete insulin in response to glucose, undergo morphological changes in which alpha-cells decrease and beta-cell mass increases, and they acquire the normal alpha- and beta-cell proportion changes that are important for islet functions later in life. In rodents, the first week of postweaning is critical for islet maturation. Multiple studies have documented the detrimental effects of several conditions on pancreatic maturation; however, few studies have addressed the use of pharmacological agents to enhance islet maturation. Biotin might have a potential action on islet maturation. Pharmacological concentrations of biotin have been found to modify islet morphology and function. In a previous study, we found that mice fed a biotin-supplemented diet for 8 weeks after weaning showed an increase in basal and glucose stimulated insulin secretion, enlarged islet size, and modified islet structure. In the present study, we investigated the effect of biotin on maturation features during the first week postweaning. Female BALB/cAnN Hsd mice were fed a control or a biotin-supplemented diet for 1 week after weaning. Compared with the control, biotin-supplemented mice showed an increase in pancreatic islet number and area in addition to an augmented proportion of beta-cells in the islet. These effects were related to an increase in beta-cell proliferation. No differences were found in insulin secretion, blood glucose concentrations, or serum insulin levels. These results indicate that biotin supplementation is capable of affecting beta-cell proliferation and might be a therapeutic agent for establishing strategies for regenerative medicine.

**KEYWORDS:** • *beta-cell proliferation* • *biotin* • *insulin secretion* • *islet-maturation*

### INTRODUCTION

PANCREATIC ISLET DEVELOPMENT and maturation are critical for islet function later in life.<sup>1</sup> Human epidemiologic and experimental animal studies have shown a link between poor fetal and neonatal growth and increased risk of developing type-2 diabetes.<sup>2–5</sup> Altered nutrition such as calorie and protein-restricted diets,<sup>4–10</sup> high-carbohydrate and high-fat diets,<sup>3,11</sup> or vitamin A-deficient diets<sup>12</sup> impair islet development and maturity, thus affecting their capacity to respond to metabolic challenges later in life.

Islet maturation culminates after weaning, a period which represents a metabolic challenge due to the nutritional switch from a milk diet to omnivorous food intake. During this period, islets achieved the full capacity to secrete insulin

in response to glucose,<sup>5,13–15</sup> decrease alpha-cells and increase beta-cell mass, and acquire the normal alpha- and beta-cell distribution and proportion.<sup>13</sup> In rodents, the maturation period takes place during the first week of nutrient shifts at weaning.<sup>13–15</sup> Although the detrimental effects of several conditions on pancreatic maturation, such low-protein, low-energy, or high-fat diets, have been documented,<sup>6,7,9–11</sup> few investigators have studied pharmacological agents directed at enhancing maturation features.<sup>16,17</sup> The vitamin biotin might have potential positive effects on this process.

Biotin participates in intermediary metabolism as a covalently bound coenzyme of carboxylases. At pharmacological concentrations, which are about 30 to 700 times greater than its daily requirement (30 µg), biotin modifies different biological functions such as glucose and lipid metabolism,<sup>18,19</sup> cell proliferation,<sup>20</sup> tissue morphology,<sup>21,22</sup> apoptosis, and development.<sup>23</sup>

Several studies have found that pharmacological concentrations of biotin increase glucose-induced insulin secretion *in vitro*<sup>24–27</sup> and *in vivo*.<sup>21</sup>

Manuscript received 31 May 2017. Revision accepted 14 August 2017.

Address correspondence to: Cristina Fernandez-Mejia, PhD, Unidad de Genética de la Nutrición, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México/Instituto Nacional de Pediatría, Av. del Iman #1, 4th floor, Mexico City CP 04530, Mexico, E-mail: crisfern@biomedicas.unam.mx

Furthermore, eight weeks of biotin supplementation after weaning augmented the pancreatic proportion of beta-cells by enlarging islet size and modifying islet morphology, increasing the percentage of alpha-cells in the islet core.<sup>21</sup> In this study, we investigated biotin's effects during the first week postweaning on islet morphology and morphometry, islet-cell proliferation, neogenesis, and apoptosis, in addition to glucose-induced insulin secretion in isolated islets. Glucose tolerance, blood glucose, and serum insulin concentrations were also determined.

## MATERIALS AND METHODS

### *Animal model and experimental design*

Animal handling and procedures were performed according to the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Academy of Sciences, Washington, DC, USA, 1996). All procedures were approved by the Ethics Committee for Experimentation of the Biomedical Research Institute of the National Autonomous University of Mexico.

At weaning, 21-day-old female BALBc/ANN Hsd mice were randomly assigned to groups that were fed either a control or biotin-supplemented diet (0.8 versus 100 mg of biotin/kg diet, Teklad Global 18% protein rodent diet [sterilizable] Cat. No. T.20185.15. Harlan, Teklad, Madison, WI, USA). Mice were kept under conditions of 12-h light/dark cycles with water and food *ad libitum*, except when fasting conditions were required. Mice and diet were weighed daily. After 1 week of diet administration, the mice were deprived of food for 12 h and anesthetized with Sevovane<sup>®</sup> (Sevoflurane; Abbott Laboratories, Mexico City, Mexico). The pancreas and blood were obtained after mice were sacrificed and processed as described below.

### *Immunofluorescence and morphometric analysis*

Immunohistochemistry and morphometric analysis on pancreas sections were performed as previously reported.<sup>28</sup> In brief, consecutive 5  $\mu\text{m}$ -thick sections were cut and mounted on a glass slide. Sections were deparaffinized, rehydrated, permeabilized with 0.3% Triton X-100 (Sigma, St. Louis, MO, USA), and subsequently incubated overnight with guinea pig anti-porcine insulin antibody (1:150; Thermo Invitrogen, Rockford, IL, USA) and mouse anti-glucagon antibody (1:4500; Sigma). Sections were incubated then for 1 h with a secondary donkey anti-guinea pig Alexa fluor 488 conjugate (1:300; Jakson Immuno Research Laboratories, Baltimore Pike, PA, USA) and Cy3 donkey anti-mouse conjugate (1:800; Jakson Immuno Research Laboratories). Nuclei were stained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI; Sigma). After incubation, the sections were washed with phosphate-buffered saline and mounted onto a cover slip with fluorescent mounting medium (DAKO; North America, Inc., Carpinteria, CA, USA). Islets were defined as four or more clusters of insulin-positive cells. Areas of islets, beta- and alpha-cells, and total pancreatic sections were quantified using an Olympus inverted 1X70 microscope (Tokyo, Japan) at

40 $\times$  with an attached Media Cibernetics Evolution VF (Georgia, MD, USA). Total pancreatic sections were assessed with Olympus BX51-WI DSU at 4 $\times$  using an attached Hamamatsu C9100 camera EM-CCD (Hamamatsu City, Japan). Images were taken with identical configurations. All image analyses were done with Image J 1.40 software (Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA).

### *Islet cell proliferation*

Islet-cell proliferation was assessed by immunofluorescence using anti-Ki67 (Abcam, Cambridge, MA, USA) coimmunostained with insulin and DAPI as described above. Quantification of Ki67 and Ki67 insulin positive costaining was assessed.  $\beta$ -cell proliferation was measured by quantifying the number of Ki67-positive nuclei in relationship to the number of total nuclei. A total of 160 and 228 islets were counted for the control and the biotin-supplemented group, respectively.

### *Islet neogenesis*

Islet neogenesis was determined by immunofluorescence using islet neogenesis-associated protein-related protein (INGAPrP) also known as Reg III $\delta$ , a 98 amino acid mouse protein that belongs to the Reg family.<sup>29-31</sup> Pancreatic sections were coimmunostained with insulin, DAPI, and INGAPrP (1:300; Santa Cruz, Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA). The percentage of immunopositive cells to INGAPrP in relationship to the number of insulin-positive cells was calculated. A total of 5730 and 5995 cells were counted for the control and the biotin-supplemented group, respectively.

### *Islet apoptosis*

The number of apoptotic cells was analyzed on the 5  $\mu\text{m}$  pancreas sections slides that had been stained for immunofluorescence. Slides were deparaffinized, rehydrated, and incubated with 20  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  proteinase K (Solon, OH, USA) for 10 min followed by TUNEL (In situ Cell Dead Detection kit, TMR red; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instruction. Pancreatic sections were counterstained with DAPI. Approximately 40 islets were assessed in each group with a total of 4682 and 5008 nuclei counted for the control and the supplemented group, respectively.

### *Glucose-stimulated insulin secretion*

Pancreases were perfused, dissected, and digested by collagenase P (Roche Diagnostics) and diluted in Hanks' Balanced Salt solution (Gibco, Grand Island, NY, USA) at 1 mg/mL. Islets were separated from exocrine tissue by a Histopaque-1077 (Sigma) gradient and handpicked as reported previously.<sup>32</sup> Islets were cultured overnight in biotin-free DMEM (11 mM glucose, 400 U/mL penicillin, 200 mg/L streptomycin, and 10% dialyzed FBS; Gibco) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. Glucose-induced insulin secretion analysis from 20 to 30 pair-sized islets was

performed as previously reported.<sup>21</sup> Insulin in the different media was measured using an ultrasensitive rat insulin EIA ELISA kit (ALPCO Diagnostics, Windham, NH, USA).

#### Blood glucose concentration measurements

Blood glucose concentrations were determined from tail vein blood samples using a portable glucose meter (Precision QID; MediSense, Inc., Abbott Laboratories).

#### Glucose tolerance tests

Intraperitoneal glucose tolerance tests were performed as previously described.<sup>21</sup> To calculate the area under the curves, we used the software GraphPad (La Jolla, CA, USA).

#### Serum insulin concentration measurements

Blood samples were collected and treated, and serum was obtained as described previously.<sup>21</sup> Insulin concentrations were measured with the ultrasensitive rat insulin EIA ELISA kit (ALPCO Diagnostics). All measurements were performed in triplicate.

#### Statistical analysis

All data are presented as the mean  $\pm$  SEM; *n* denotes the number of evaluated subjects. Statistical analysis was performed using GraphPad. The data were analyzed by Student's *t*-test, Mann-Whitney *U* test, or two-way analysis of variance (ANOVA).  $P \leq .05$  was considered statistically significant. \* $P \leq .05$ ; \*\* $P \leq .005$ .

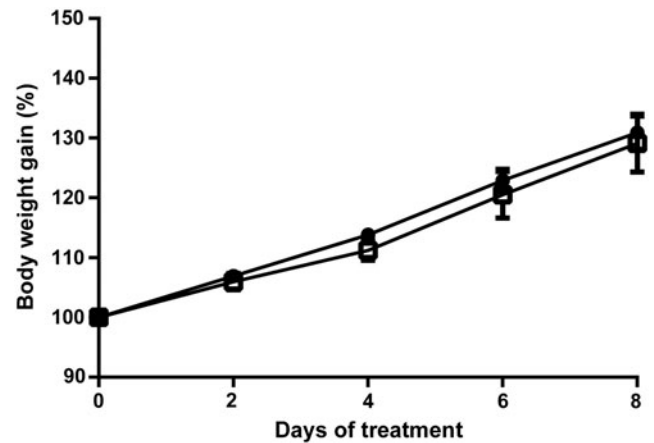
## RESULTS

#### Effect of biotin supplementation on body weight and food consumption

During the experimental period, we determined daily mouse body weight (Fig. 1). Mice in the biotin-control group and biotin-supplemented group showed a steady weight gain during the experimental period, which was not significantly different between the groups. The amount of food intake/body weight over the period was not significantly different between the groups (average food intake: control =  $0.229 \pm 0.014$ ; biotin-supplemented =  $0.223 \pm 0.015$  g of food/g of body weight/day).

#### Effect of biotin supplementation on islet morphometry and morphology

**Beta- and alpha-cell islet composition.** As it has been documented after weaning, islet cell composition is modified,<sup>13</sup> and we quantified the effects of 1 week of biotin supplementation postweaning on the islet proportion of beta- and alpha-cell areas (Fig. 2A). Biotin supplementation significantly increased beta-cell proportion (control =  $69.4 \pm 1.49$ ; biotin-supplemented =  $78.3\% \pm 1.04\%$ ;  $P < .005$ ) and decreased alpha-cell (control =  $30.7 \pm 1$ ; biotin-supplemented =  $21.7\% \pm 1.04\%$ ,  $P < .05$ ).



**FIG. 1.** Effect of biotin supplementation on body weight. Three-week-old mice were fed a control or a biotin-supplemented diet for 1 week. Body weight was measured every day. Values are the mean  $\pm$  SEM. *n*: Control = 8; supplemented = 9 mice. *Circles*: control group; *squares*: biotin-supplemented. Significance was assessed by the two-factor repeated measurements ANOVA (diet, time). SEM, standard error of the mean.

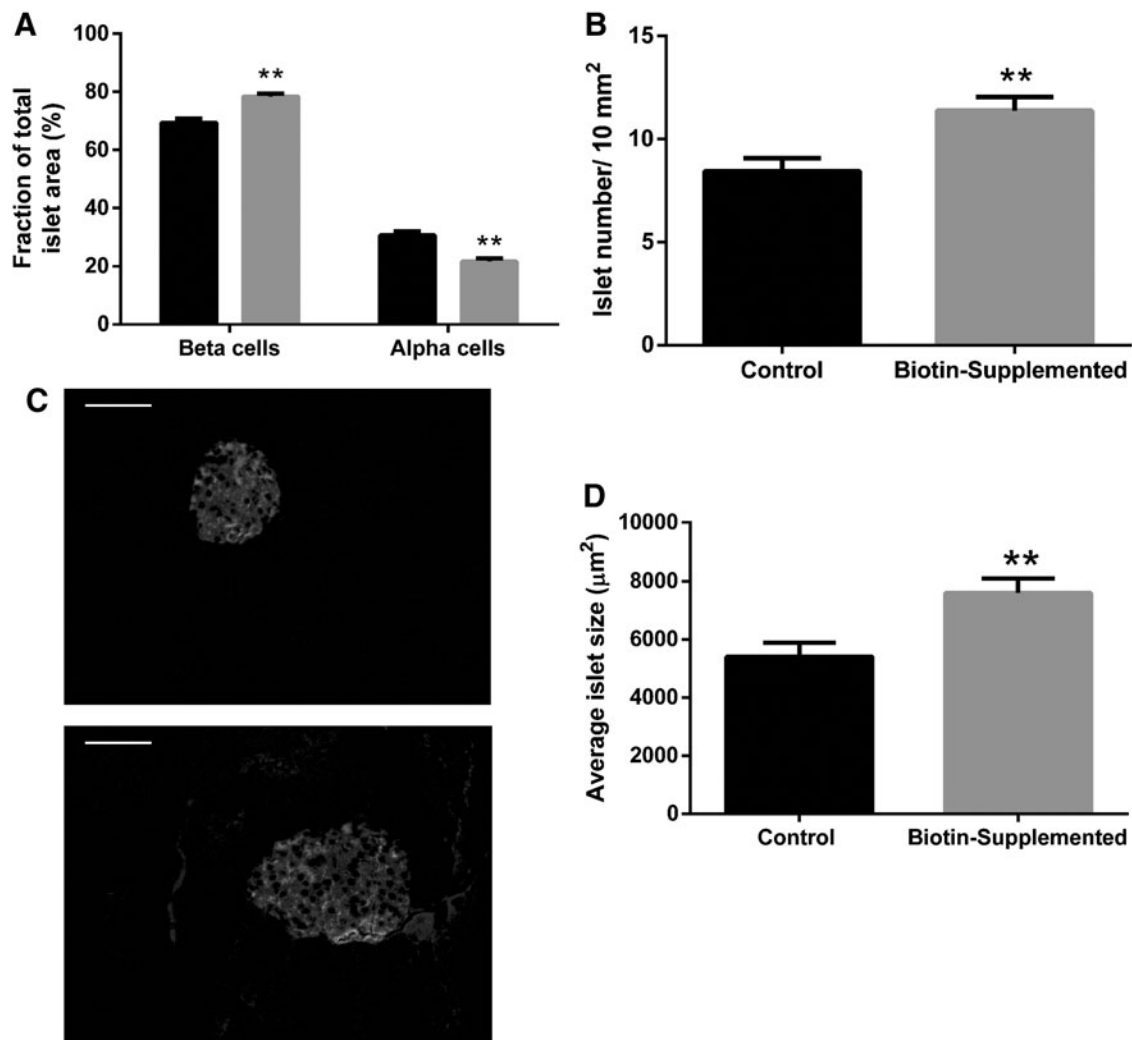
**Number of islets.** We compared the number of islets per pancreatic area ( $10 \text{ mm}^2$ ), and our results (Fig. 2B) revealed that the number of islets increased in the biotin-supplemented group when compared with the control group (control =  $8.44 \pm 0.64$ ; biotin-supplemented =  $11.4 \pm 0.66$  islets/ $10 \text{ mm}^2$  pancreatic area;  $P < .005$ ). This effect is not related to changes in total pancreatic area since no significant differences were observed between the groups (control =  $16,053 \pm 1016$ ; biotin-supplemented =  $15,832 \pm 2070 \text{ mm}^2$ ).

**Islet area.** The islets' areas were assessed in pancreatic sections from the control and supplemented mice (Fig. 2C, D). Compared with the control mice, a significant increase in 40% was observed in the supplemented mice (control =  $5415 \pm 474$ ; biotin-supplemented =  $7593 \pm 499 \mu\text{m}^2$ ;  $P < .005$ ).

#### Effect of biotin supplementation on islet cell proliferation, neogenesis, and apoptosis

**Islet proliferation.** To evaluate whether the increased beta-cell and islet areas produced by biotin supplementation were due to increased proliferation, we used immunofluorescence to assess the proportion of cells stained for the nuclear antigen Ki67 (Fig. 3A). Our results revealed that 1 week of biotin supplementation caused a significant increase in Ki67 positive beta-cells (control =  $1.20 \pm 0.93$ ; biotin-supplemented =  $5.59 \pm 1.01$ ;  $P < .05$ ).

**Islet neogenesis.** We determined the percentage of immunopositive cells to islet neogenesis-associated protein<sup>29</sup> in relationship to the number of insulin-positive cells (Fig. 3B). No significant differences were observed between the control mice and the biotin-supplemented group ( $2.44\% \pm 0.43\%$  and  $2.30\% \pm 0.38\%$ ; respectively,  $P > .05$ ).



**FIG. 2.** Effect of biotin supplementation on islet morphometry and morphology. Morphometry from pancreatic sections of control and biotin-supplemented mice. (A) Mean proportions of alpha- and beta-area for islet area. Significance was assessed by Mann–Whitney *U* test.  $**P \leq .005$  compared with the control group. (B) Islet number per pancreatic area ( $10 \text{ mm}^2$ ). Significance was assessed by Student's *t*-test.  $**P \leq .005$  compared with the control group. (C) Immunofluorescence images of pancreatic islets from control (C, upper panel) and biotin-supplemented (C, bottom panel) mice pancreas sections stained for insulin and glucagon. Scale bar represents  $50 \mu\text{m}$ . (D) Average islet size ( $\mu\text{m}^2$ )  $\pm$  SEM. Significance was assessed by Mann–Whitney *U* test. Values are mean  $\pm$  SEM.  $n = 4$  mice per group.  $**P \leq .005$  compared with the control group.

*Effect of biotin supplementation on islet cell apoptosis.* Next, experiments were carried out to determine the effects of biotin on cell apoptosis (Fig. 3C). The percentage of TUNEL-positive nuclei per total islet nuclei was not significantly different between the groups (control  $3.93\% \pm 1.01\%$ ; biotin-supplemented  $2.00\% \pm 0.64\%$ ;  $P > .05$ ).

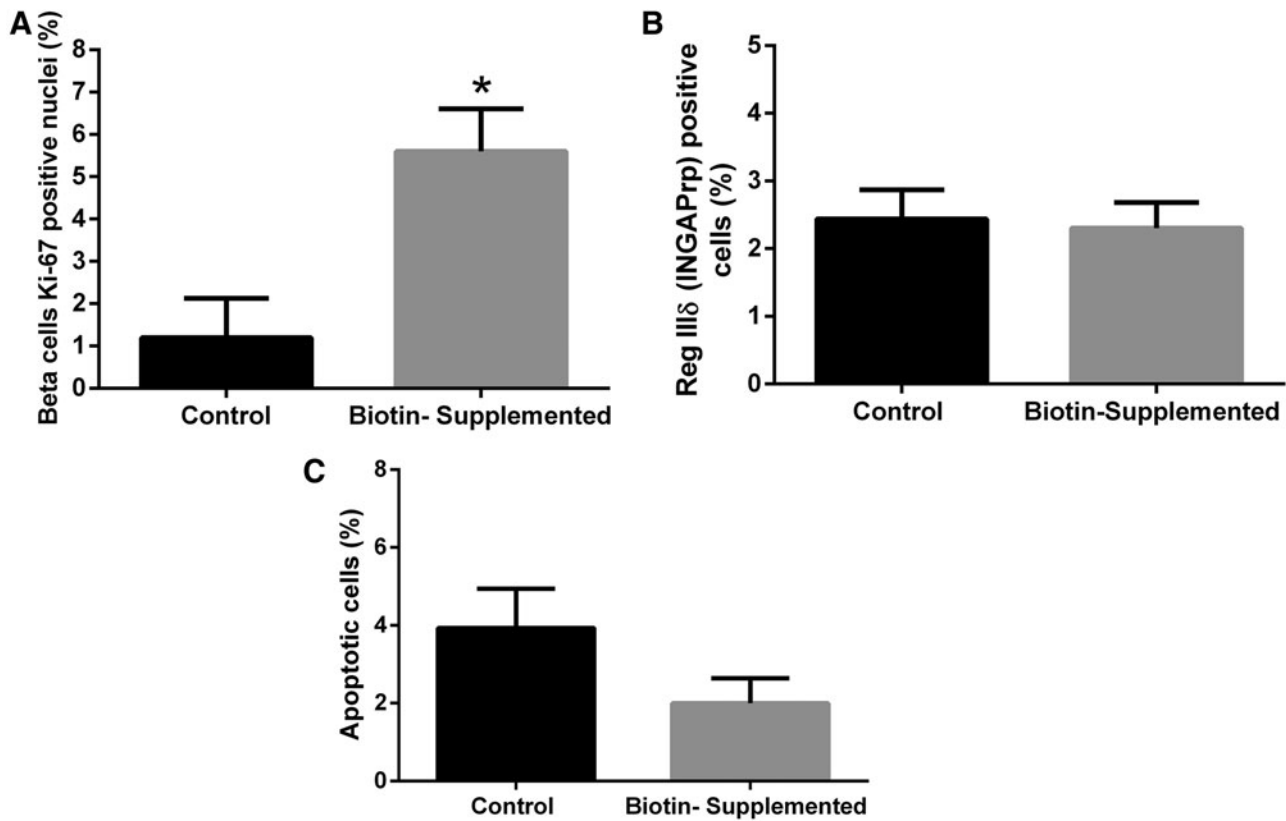
*Effect of biotin supplementation on insulin secretion from isolated islets*

We determined the effects of 1 week of a biotin-supplemented diet on glucose-stimulated insulin release. As depicted in Figure 4, insulin secretion levels did not differ significantly at both the basal and high glucose concentrations (5.5 and 15.6 mM, respectively) in islets isolated from

control and biotin-supplemented mice (control =  $0.23 \pm 0.05$  and  $0.41 \pm 0.05$ ; biotin-supplemented =  $0.16 \pm 0.03$  and  $0.46 \pm 0.06$  ng of insulin/islet/h for high and low glucose concentrations, respectively).

*Effect of biotin supplementation on blood glucose concentrations and glucose tolerance test*

One week of biotin supplementation in the diet did not modify fasting blood glucose levels (control =  $61.6 \pm 3.07$ ; biotin-supplemented =  $60.3 \pm 3.09$  mg/dL). Additional experiments were carried out to determine glucose tolerance. No significant differences were found between the biotin-supplemented and the control group (Fig. 5). The mean total area under the curve was  $14,159 \pm 1171$  for the control and  $13,819 \pm 682$  for the biotin-supplemented mice.



**FIG. 3.** Effect of biotin supplementation on islet cell proliferation, neogenesis, and apoptosis. **(A)** Percentage of beta-cells staining for antigen Ki67 in the nuclei. Values are mean percentages  $\pm$  SEM.  $n=4$  mice per group. Significance was assessed by Student's  $t$ -test.  $*P \leq .05$  compared with the control group. **(B)** Percentage of immunopositive cells to INGAPrP, in relationship to the number of insulin-positive cells. Values are mean percentages  $\pm$  SEM.  $n=4$  mice per group. Significance was assessed by Student's  $t$ -test. **(C)** Percent of TUNEL-positive nuclei per total nuclei number. Values are mean percentages  $\pm$  SEM.  $n=4$  mice per group. Significance was assessed by Student's  $t$ -test. INGAPrP, islet neogenesis-associated protein-related protein.

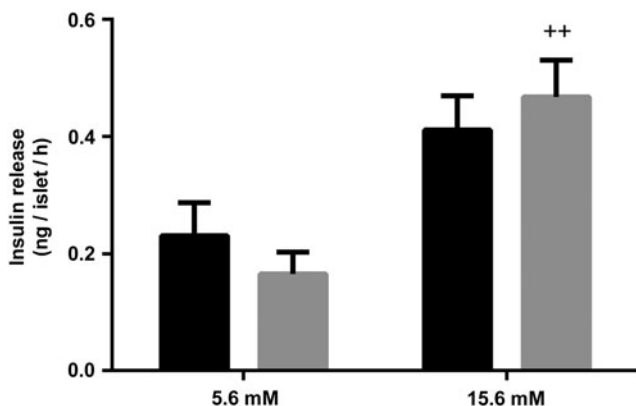
#### Effect of biotin supplementation on serum insulin concentrations

The effects of biotin supplementation on fasting serum insulin levels were analyzed. No differences were observed between the groups (control =  $0.22 \pm 0.09$ ; biotin-supplemented =  $0.24 \pm 0.07$  ng/mL;  $P > .05$ ).

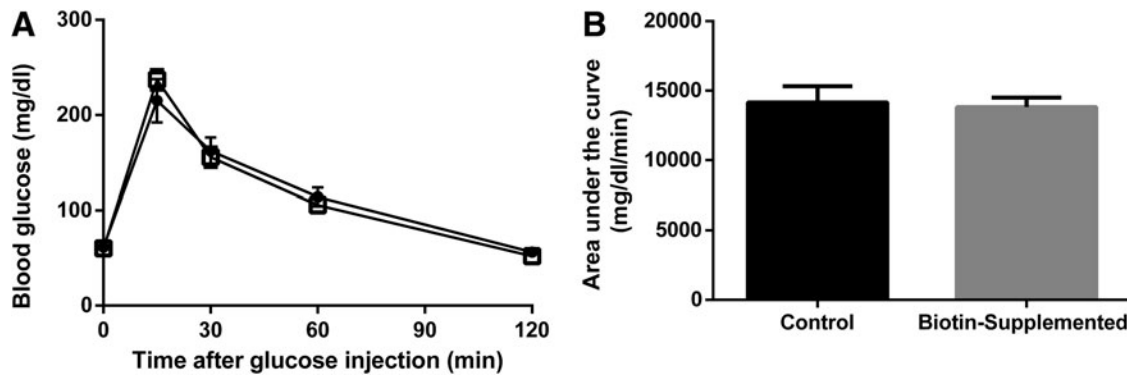
## DISCUSSION

Pancreatic islet maturation is critical for its function later in life.<sup>6,9-11</sup> In rodents, islet maturation is attained the week after weaning, a period in which they acquire the normal alpha- and beta-cell proportion<sup>13</sup> and increase in beta-cell mass.<sup>7,14</sup> In this study using mice, we have shown that biotin supplementation during this period increased islet area, islet number, and the proportion of beta-cells in the islet, and that these changes were related to increased beta-cell proliferation.

After weaning, normal islets expand their mass in proportion to an individual's body weight.<sup>33</sup> Our results demonstrated that biotin-supplementation 1 week after weaning increased islet area and that this effect was not related to mouse growth since weight gain was not different between the control and the supplemented groups; this finding was



**FIG. 4.** Effect of biotin supplementation on insulin secretion. Glucose-induced insulin release from cultured pancreatic islets isolated from control (black) or biotin-supplemented mice (gray). Data represent mean  $\pm$  SEM. Results are the mean of three independent experiments. Significance was assessed by two-way ANOVA.  $^{++}P \leq .005$  compared with basal secretion (5.6 mM glucose). ANOVA, analysis of variance.



**FIG. 5.** Effect of biotin supplementation on glucose tolerance test. (A) Blood glucose concentrations during glucose tolerance test (i.p. injection of 2 g/kg of glucose). Data represent mean  $\pm$  SEM. Results are the mean  $\pm$  SEM of  $n = 8$  mice per group. Significance of glucose tolerance test was assessed by the two-factor repeated measurements ANOVA. (B) Significance of the area under the curve was determined by Student's *t*-test.

constant throughout the present and all of our previous studies.<sup>21,34</sup>

The 3.6-fold increase in cell proliferation observed in our studies in conjunction with no significant changes in apoptosis or islet neogenesis indicate that the enhanced islet area and number and proportion of beta-cells in response to biotin supplementation is induced by cell proliferation. Some studies have indicated that pharmacological biotin concentrations are capable of increasing proliferation; this information, however, remains controversial. In JAr choriocarcinoma cells, biotin supply increased proliferation rates.<sup>20</sup> Jurkat-cells cultured in medium containing a pharmacological concentration of biotin showed a transient increase in proliferation rates during the course of the 4 week study.<sup>35</sup> In contrast, healthy humans receiving oral biotin (3.1  $\mu$ mol) for 14 days showed a decrease in mitogen-stimulated peripheral blood mononuclear cell proliferation.<sup>36</sup> Studies in early embryonic chick eyes cultured with biotin (eye local concentration  $1 \times 10^{-5}$  M) between Hamburger and Hamilton stages 14–17 affected retinal and lens structures development; these effects were not related to proliferation but to apoptosis.<sup>23</sup> The difference in cell types, concentrations, and length of treatments might account for the observed differences.

There are several islet morphology and morphometric differences between our prior studies and the present study concerning the effects of biotin-supplementation.<sup>21</sup> Eight weeks of a biotin-supplemented diet augmented islet size by increasing the proportion of alpha- and beta-cells, but not islet or beta-cell numbers as observed with 1 week of biotin supplementation. In addition, the increased alpha-cell distribution in the islet core produced by 8 weeks of biotin supplementation was not observed in the present report (data not shown). Time-course studies analyzing islet morphology changes at different periods may unravel the reasons for these differences.

One week of biotin supplementation did not affect basal and glucose-induced insulin secretion; these results contrast with our previous studies, in which we found that 8 weeks of biotin supplemented diet increased basal and glucose-induced insulin secretion.<sup>21</sup> Recent studies have demon-

strated that beta-cells can be divided into two populations: (1) a proliferation-competent population and (2) mature beta-cells, which attain glucose-induced insulin secretion.<sup>37</sup> It might be possible that biotin supplementation during the first week after weaning stimulate actions involved in proliferation and that later may produce its effects on mechanisms involved in insulin secretion. In support of this view, other studies have found that pharmacological concentrations of biotin administered to adult rats increased plasma insulin levels,<sup>38,39</sup> and insulin secretion.<sup>24–27</sup> Further studies will be required to test this hypothesis.

In agreement with the lack of effect of biotin supplementation on insulin secretion *in vitro* observed in the present study, the biotin-supplemented mice did not show significant differences in blood glucose levels, glucose tolerance test, or serum insulin concentrations.

Diabetes is a major worldwide health problem that affects millions of people.<sup>40,41</sup> Decreased beta-cell mass is present in both type-1 and type-2 diabetes.<sup>42</sup> Agents capable of increasing the beta-cell proliferation without negatively affecting glucose-induced insulin secretion represent an important area for the development of therapeutic strategies for diabetes treatment. Several agents such as gamma-aminobutyric acid, thyroid hormone, the agonist for GPR119 receptor, and glucokinase activators<sup>16,17</sup> have been proposed as different methods to increase pancreatic beta-cell expansion. Our present studies showing that biotin supplementation is capable of increasing beta-cell proliferation in conjunction with the lack of adverse effects of biotin administration observed in animals,<sup>18,19</sup> normal individuals,<sup>43</sup> or patients with diabetes<sup>44,45</sup> indicate that pharmacological concentrations of biotin might be considered as an agent to expand beta-cell population in strategies to fight diabetes.

In conclusion, our data show for the first time that biotin supplementation during islet maturation increased pancreatic islet number and area and also augmented the proportion of islet beta-cells. These effects were related to an increase in beta-cell proliferation. These results might lead to new strategies for increasing the mass of functional beta-cells to treat diabetes.



## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to: Dr. Miguel Tapia from the Unidad de Microscopía, and Dr. Georgina Díaz from the Unidad de Modelos Biológicos, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM); Dr. Rodolfo Rodríguez-Jurado from Departamento de Patología, Dr. Rosa María Viguera-Villaseñor of Laboratorio Biología de la Reproducción, and M en C Gerardo Barragán-Mejía of Laboratorio Neurociencias, for histology facilities; and Everardo Ruiz-Mora, Karina Pastén Hidalgo, Stephany Romero Suárez, Laura Victoria Osorio Marín, Gustavo Adolfo Rojas Olave, and Karen Méndez Coronado for technical support. This work was supported by funds from Dirección General de Asuntos del Personal Académico (PAPIIT IN210714) and UC-Mexus (EBC/433/CFM) and the National Institutes of Health Grant P30 DK63720 (to M.S.G.). Wilma Tixi-Verdugo is a PhD student from the Doctorado en Ciencias Bioquímicas at Universidad Nacional Autónoma de México UNAM, and has a scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT (CVU/scholar: 378371). Juan Contreras-Ramos was a Biology student at the Benemérita Universidad Autónoma de Puebla and has a scholarship from from PAPIIT (IN210714), Dirección General de Asuntos del Personal Académico.

## AUTHOR DISCLOSURE STATEMENT

No competing financial interests exist.

## REFERENCES

- Hellerstrom C, Swenne I: Functional maturation and proliferation of fetal pancreatic beta-cells. *Diabetes* 1991;40 Suppl 2:89–93.
- Barker DJ: The Wellcome Foundation Lecture, 1994. The fetal origins of adult disease. *Proc Biol Sci* 1995;262:37–43.
- Jones RH, Ozanne SE: Fetal programming of glucose-insulin metabolism. *Mol Cell Endocrinol* 2009;297:4–9.
- Schwitzgebel VM, Somme E, Klee P: Modeling intrauterine growth retardation in rodents: Impact on pancreas development and glucose homeostasis. *Mol Cell Endocrinol* 2009;304:78–83.
- Garofano A, Czernichow P, Breant B: In utero undernutrition impairs rat beta-cell development. *Diabetologia* 1997;40:1231–1234.
- Rodríguez-Trejo A, Ortiz-Lopez MG, Zambrano E, *et al.*: Developmental programming of neonatal pancreatic beta-cells by a maternal low-protein diet in rats involves a switch from proliferation to differentiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012;302:E1431–E1439.
- Garofano A, Czernichow P, Breant B: Effect of ageing on beta-cell mass and function in rats malnourished during the perinatal period. *Diabetologia* 1999;42:711–718.
- Dahri S, Snoeck A, Reusens-Billen B, Remacle C, Hoet JJ: Islet function in offspring of mothers on low-protein diet during gestation. *Diabetes* 1991;40 Suppl 2:115–120.
- Petrik J, Reusens B, Arany E, *et al.*: A low protein diet alters the balance of islet cell replication and apoptosis in the fetal and neonatal rat and is associated with a reduced pancreatic expression of insulin-like growth factor-II. *Endocrinology* 1999;140:4861–4873.
- Dumortier O, Blondeau B, Duville B, Reusens B, Breant B, Remacle C: Different mechanisms operating during different critical time-windows reduce rat fetal beta cell mass due to a maternal low-protein or low-energy diet. *Diabetologia* 2007;50:2495–2503.
- Jacovetti C, Matkovich SJ, Rodríguez-Trejo A, Guay C, Regazzi R: Postnatal beta-cell maturation is associated with islet-specific microRNA changes induced by nutrient shifts at weaning. *Nat Commun* 2015;6:8084.
- Matthews KA, Rhoten WB, Driscoll HK, Chertow BS: Vitamin A deficiency impairs fetal islet development and causes subsequent glucose intolerance in adult rats. *J Nutr* 2004;134:1958–1963.
- Aguayo-Mazzucato C, Sanchez-Soto C, Godinez-Puig V, Gutierrez-Ospina G, Hiriart M: Restructuring of pancreatic islets and insulin secretion in a postnatal critical window. *PLoS One* 2006;1:e35.
- Heinze E, Steinke J: Glucose metabolism of isolated pancreatic islets: Difference between fetal, newborn and adult rats. *Endocrinology* 1971;88:1259–1263.
- Scaglia L, Cahill CJ, Finegood DT, Bonner-Weir S: Apoptosis participates in the remodeling of the endocrine pancreas in the neonatal rat. *Endocrinology* 1997;138:1736–1741.
- Li Q, Lai ZC: Recent progress in studies of factors that elicit pancreatic beta-cell expansion. *Protein Cell* 2015;6:81–87.
- Cox AR, Lam CJ, Rankin MM, *et al.*: Incretin therapies do not expand beta-cell mass or alter pancreatic histology in young male mice. *Endocrinology* 2017;158:1701–1714.
- Fernandez-Mejia C, Lazo-de-la-Vega-Monroy M-L: Biological effects of pharmacological concentrations of biotin. *J Evid Based Complementary Altern Med* 2011;16:40–48.
- Riveron-Negrete L, Fernandez-Mejia C: Pharmacological effects of biotin in animals. *Mini Rev Med Chem* 2017;17:529–540.
- Crisp SE, Griffin JB, White BR, *et al.*: Biotin supply affects rates of cell proliferation, biotinylation of carboxylases and histones, and expression of the gene encoding the sodium-dependent multivitamin transporter in Jar choriocarcinoma cells. *Eur J Nutr* 2004;43:23–31.
- Lazo de la Vega-Monroy ML, Larrieta E, German MS, Baez-Saldana A, Fernandez-Mejia C: Effects of biotin supplementation in the diet on insulin secretion, islet gene expression, glucose homeostasis and beta-cell proportion. *J Nutr Biochem* 2013;24:169–177.
- Riveron-Negrete L, Sicilia-Argumedo G, Alvarez-Delgado C, Coballase-Urrutia E, Alcantar-Fernandez J, Fernandez-Mejia C: Dietary biotin supplementation modifies hepatic morphology without changes in liver toxicity markers. *Biomed Res Int* 2016;2016:7276463.
- Valenciano AI, Mayordomo R, de La Rosa EJ, Hallbook F: Biotin decreases retinal apoptosis and induces eye malformations in the early chick embryo. *Neuroreport* 2002;13:297–299.
- Sone H, Ito M, Sugiyama K, Ohneda M, Maebashi M, Furukawa Y: Biotin enhances glucose-stimulated insulin secretion in the isolated perfused pancreas of the rat. *J Nutr Biochem* 1999;10:237–243.
- Sone H, Ito M, Shimizu M, Sasaki Y, Komai M, Furukawa Y: Characteristics of the biotin enhancement of glucose-induced

- insulin release in pancreatic islets of the rat. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000;64:550–554.
26. Romero-Navarro G, Cabrera-Valladares G, German MS, *et al.*: Biotin regulation of pancreatic glucokinase and insulin in primary cultured rat islets and in biotin-deficient rats. *Endocrinology* 1999;140:4595–4600.
  27. Vilches-Flores A, Tovar AR, Marin-Hernandez A, Rojas-Ochoa A, Fernandez-Mejia C: Biotin increases glucokinase expression via soluble guanylate cyclase/protein kinase G, adenosine triphosphate production and autocrine action of insulin in pancreatic rat islets. *J Nutr Biochem* 2010;21:606–612.
  28. Larrieta E, Vega-Monroy ML, Vital P, *et al.*: Effects of biotin deficiency on pancreatic islet morphology, insulin sensitivity and glucose homeostasis. *J Nutr Biochem* 2012;23:392–399.
  29. Koya V, Lu S, Sun YP, *et al.*: Reversal of streptozotocin-induced diabetes in mice by cellular transduction with recombinant pancreatic transcription factor pancreatic duodenal homeobox-1: A novel protein transduction domain-based therapy. *Diabetes* 2008;57:757–769.
  30. Pittenger GL, Taylor-Fishwick DA, Johns RH, Burcus N, Kosuri S, Vinik AI: Intramuscular injection of islet neogenesis-associated protein peptide stimulates pancreatic islet neogenesis in healthy dogs. *Pancreas* 2007;34:103–111.
  31. Gagliardino JJ, Del Zotto H, Massa L, Flores LE, Borelli MI: Pancreatic duodenal homeobox-1 and islet neogenesis-associated protein: A possible combined marker of activatable pancreatic cell precursors. *J Endocrinol* 2003;177:249–259.
  32. Papadimitriou A, King AJ, Jones PM, Persaud SJ: Anti-apoptotic effects of arachidonic acid and prostaglandin E2 in pancreatic beta-cells. *Cell Physiol Biochem* 2007;20:607–616.
  33. Montanya E, Nacher V, Biarnes M, Soler J: Linear correlation between beta-cell mass and body weight throughout the lifespan in Lewis rats: Role of beta-cell hyperplasia and hypertrophy. *Diabetes* 2000;49:1341–1346.
  34. Baez-Saldana A, Camacho-Arroyo I, Espinosa-Aguirre JJ, *et al.*: Biotin deficiency and biotin excess: Effects on the female reproductive system. *Steroids* 2009;74:863–869.
  35. Manthey KC, Griffin JB, Zempleni J: Biotin supply affects expression of biotin transporters, biotinylation of carboxylases and metabolism of interleukin-2 in Jurkat cells. *J Nutr* 2002;132:887–892.
  36. Zempleni J, Helm RM, Mock DM: In vivo biotin supplementation at a pharmacologic dose decreases proliferation rates of human peripheral blood mononuclear cells and cytokine release. *J Nutr* 2001;131:1479–1484.
  37. Bader E, Migliorini A, Gegg M, *et al.*: Identification of proliferative and mature beta-cells in the islets of Langerhans. *Nature* 2016;535:430–434.
  38. Sugita Y, Shirakawa H, Sugimoto R, Furukawa Y, Komai M: Effect of biotin treatment on hepatic gene expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 2008;72:1290–1298.
  39. Sahin K, Tuzcu M, Orhan C, *et al.*: Anti-diabetic activity of chromium picolinate and biotin in rats with type 2 diabetes induced by high-fat diet and streptozotocin. *Br J Nutr* 2013;110:197–205.
  40. Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J: IDF diabetes atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 2011;94:311–321.
  41. Shomali M: Diabetes treatment in 2025: Can scientific advances keep pace with prevalence? *Ther Adv Endocrinol Metab* 2012;3:163–173.
  42. Ackermann AM, Gannon M: Molecular regulation of pancreatic beta-cell mass development, maintenance, and expansion. *J Mol Endocrinol* 2007;38:193–206.
  43. Fiume MZ: Final report on the safety assessment of biotin. *Int J Toxicol* 2001;20 Suppl 4:1–12.
  44. Maebashi M, Makino Y, Furukawa Y, Ohinata K, Kimura S, Sato T: Therapeutic evaluation of the effect of biotin on hyperglycemia in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Clin Biochem Nutr* 1993;14:211–218.
  45. Koutsikos D, Fourtounas C, Kapetanaki A, *et al.*: Oral glucose tolerance test after high-dose i.v. biotin administration in normoglycemic hemodialysis patients. *Ren Fail* 1996;18:131–137.



## Basic nutritional investigation

## Effects of dietary biotin supplementation on glucagon production, secretion, and action



Maria-Luisa Lazo-de-la-Vega-Monroy Ph.D.<sup>a,b</sup>, Elena Larrieta Ph.D.<sup>a,c</sup>,  
 Wilma Tixi-Verdugo M.Sc.<sup>a</sup>, Rafael Ramírez-Mondragón B.Sc.<sup>a</sup>,  
 Ileana Hernández-Araiza M.Sc.<sup>a</sup>, Michael S. German M.D.<sup>d</sup>,  
 Cristina Fernandez-Mejia Ph.D.<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Unit of Genetics of Nutrition, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Pediatría, Mexico City, Mexico

<sup>b</sup> Division of Health Sciences, Department of Medical Sciences, University of Guanajuato, Guanajuato, Mexico

<sup>c</sup> Department of Gastroenterology, Salvador Zubirán National Institute of Health Sciences and Nutrition, Mexico City, Mexico

<sup>d</sup> Diabetes Center/Center of Regeneration Medicine and Stem Cell Research, University of California, San Francisco, California, USA

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 17 January 2017

Accepted 4 June 2017

## Keywords:

Biotin

Glucagon mRNA

Glucagon secretion

Phosphoenolpyruvate carboxykinase

Glucagon tolerance test

Glycogen

## ABSTRACT

**Objective:** Despite increasing evidence that pharmacologic concentrations of biotin modify glucose metabolism, to our knowledge there have not been any studies addressing the effects of biotin supplementation on glucagon production and secretion, considering glucagon is one of the major hormones in maintaining glucose homeostasis. The aim of this study was to investigate the effects of dietary biotin supplementation on glucagon expression, secretion, and action.

**Methods:** Male BALB/cAnN Hsd mice were fed a control or a biotin-supplemented diet (1.76 or 97.7 mg biotin/kg diet) for 8 wk postweaning. Glucagon gene mRNA expression was measured by the real-time polymerase chain reaction. Glucagon secretion was assessed in isolated islets and by glucagon concentration in plasma. Glucagon action was evaluated by glucagon tolerance tests, phosphoenolpyruvate carboxykinase (*Pck1*) mRNA expression, and glycogen degradation.

**Results:** Compared with the control group, glucagon mRNA and secretion were increased from the islets of the biotin-supplemented group. Fasting plasma glucagon levels were higher, but no differences between the groups were observed in nonfasting glucagon levels. Despite the elevated fasting glucagon levels, no differences were found in fasting blood glucose concentrations, fasting/fasting–refeeding glucagon tolerance tests, glycogen content and degradation, or mRNA expression of the hepatic gluconeogenic rate-limiting enzyme, *Pck1*.

**Conclusions:** These results demonstrated that dietary biotin supplementation increased glucagon expression and secretion without affecting fasting blood glucose concentrations or glucagon tolerance and provided new insights into the effect of biotin supplementation on glucagon production and action.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

This work was supported by funds from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 219787), Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) (IN214811 and IN210714), UC-MEXUS (CNO7-87, EBC/433/CFM), National Institutes of Health Grant P30 DK63720 (to MSG) and Fondos Federales 074/2013. M-LLde laVM was a Ph.D. student from the Doctorado en Ciencias Biomédicas at UNAM and had a scholarship from CONACYT (CVU/scholar no.: 217876/207055). WT-V is a Ph.D. student from the Doctorado en Ciencias Biomédicas at UNAM and has a scholarship from CONACYT (CVU/scholar: 378371). RR-M was an M.Sc. student from

the Posgrado en Ciencias Bioquímicas at UNAM and had a scholarship from CONACYT (CVU/scholar: 510608). IH-A was an M.Sc. student from the Posgrado en Ciencias Bioquímicas at UNAM and had a scholarship from CONACYT (CVU/scholar: 549758). M-LLde laVM, CF-M, and EL conceived and designed the study. M-LLde laVM, EL, WT-V, and RRM generated, collected, and assembled the data. M-LLde laVM, EL, CF-M, and MSG analyzed and interpreted the data and drafted and critically revised the article.

\* Corresponding author. Tel.: +52 55 5606 3558; fax: +52 55 5606 3489.

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

## Introduction

In recent decades, vitamins have been found to affect biological functions in ways other than their classically defined functions [1,2]. At pharmacologic concentrations (~30 to 700 times the daily requirement of 30 µg), biotin modifies several physiological processes [3-7], including glucose homeostasis [3].

Glucose homeostasis results from the concerted actions of metabolic pathways in different tissues, which depend on the hormonal state. The endocrine pancreas is central to the hormonal regulation of blood glucose concentration. The endocrine component of the pancreas consists of clusters of cells called islets, which house different cell types that each produce a different hormone. The predominant cell components of islets are  $\alpha$  and  $\beta$  cells, which synthesize and secrete glucagon and insulin, respectively. Glucagon mobilizes hepatic glucose in the fasting state via glycogenolysis and gluconeogenesis to maintain normoglycemia, whereas insulin prevails in the fed state and decreases blood sugar [8].

Studies in animal models of diabetes demonstrate that biotin administration at pharmacologic doses decreases glucose levels [9,10] and improves glucose tolerance [9,11] by enhancing both insulin action [9,12] and insulin secretion [13,14]. These effects also have been observed in several clinical studies [15] in patients with type 1 [16,17] and type 2 diabetes [18]. The underlying mechanisms by which biotin exerts these metabolic actions are still being clarified. In the pancreas, biotin supplementation in vitro and in vivo increases mRNA expression of insulin [13,19], pancreatic glucokinase [20,21], and other pancreatic  $\beta$ -cell genes that modulate insulin secretion, as well as the expression of key  $\beta$ -cell transcription factors such as *Foxa2*, *Pdx1*, and *Hnf4a* [13,19-25].

Despite increasing evidence that pharmacologic concentrations of biotin modify glucose homeostasis and enhance  $\beta$ -cell function, to our knowledge there have not been any studies that have addressed the effect of biotin supplementation on  $\alpha$  cells and the production and secretion of glucagon, one of the major factors responsible for maintaining normal glucose homeostasis. Previously, we found that biotin supplementation increased the  $\alpha$ -cell area per total pancreatic area (due to increased islet size) and the percentage of islets with  $\alpha$  cells at the islet core [13]. In the present study, we investigated the implications of these effects on glucagon expression, secretion, and action.

## Materials and methods

### Animal model and experimental design

The present study was performed as previously reported [6,13,26]. We randomly assigned 3-wk-old male BALB/cAnN Hsd mice to groups that were fed for 8 wk either a biotin-control (TD-01362) or biotin-supplemented diet (TD-01363) containing 1.76 and 97.7 mg of free biotin/kg of diet, respectively (Harlan Teklad, Madison WI, USA). Five mice per cage were kept in 12-h light/dark cycles and provided water and food ad libitum, except when fasting conditions were required. The full diet composition was published elsewhere [27].

After 8 wk of diet administration, the mice were deprived of food for 12 h and anesthetized with Sevoflurane (Sevoflurane, Abbott Laboratories, Mexico DF, Mexico). The liver and pancreas were extracted and processed. Finally, mice were sacrificed by cervical dislocation. Data on body weight, food intake, daily biotin intake, and serum biotin concentrations for the model were reported previously [13]. Animal handling and procedures were done in compliance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Academy of Sciences, Washington DC, USA, 1996) and approved by the Ethical Committee for Experimentation of the Biomedical Research Institute of the National Autonomous University of Mexico.

### Quantitative real-time PCR

Total RNA was isolated from a pooled sample of 150 to 200 pancreatic islets or from liver tissue using TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), as described previously [13,26,28]. We used 0.4 µg of total RNA for synthesizing cDNA by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) as detailed elsewhere [28]. Relative mRNA quantifications were done in cDNA by real-time quantitative PCR using TaqMan MGB probes (Taqman Assay ID Mm00801712\_m1 for *Gcg* and Mm00440636\_m1 for *Pck1*, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Samples were analyzed in triplicate and corrected for the 18 S ribosomal subunit (Taqman Assay # 4319413 E) as an internal standard. Gene expression was calculated using the relative quantification method ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) [29].

### Glucagon secretion analysis

Glucagon secretion analysis from size-paired pancreatic islets was performed as previously reported [28]. The glucagon secretion level was determined in the media by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; ALPCO Diagnostics, Salem, NH, USA).

### Blood glucose and plasma glucagon measurements

Blood glucose concentrations were determined from tail-vein samples using a portable glucose meter (Precision QID, MediSense, Inc., Abbott Laboratories, Mexico, DF, Mexico). Blood was collected in tubes with heparin, centrifuged at 10 000g for 10 min for plasma separation, and preserved at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Plasma glucagon was determined by ELISA (ALPCO Diagnostics) according to the manufacturer's instructions. The intra- and interassay coefficients of variation were 3.3% to 5.1% and 7.3% to 18.9%, respectively.

### Analysis of glycogen content and degradation

Glycogen content was analyzed in liver samples of 9 control and 10 supplemented mice sacrificed after 12 h of fasting, as well as in the liver samples of mice sacrificed 2, 4, and 6 h after a 6 g/kg intraperitoneal glucose injection ( $n = 6, 8, \text{ and } 7$  mice for control; and 5, 7, and 9 for supplemented mice, respectively). Glycogen was determined using a modification of the method by Trinder [30]. Briefly, liver tissue (50-100 mg) was homogenized in 400 µL of distilled water. Liver homogenates were treated with ice-cold NaOH [1.6 M] to attain a final concentration of 0.1 M, and then incubated at  $80^{\circ}\text{C}$  for 1 h. Samples were treated with 1 mL 100% cold ethanol and kept at  $-20^{\circ}\text{C}$  overnight. The samples were then centrifuged at 20 000g for 15 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . The supernatant was eliminated, and the pellet was vacuum dried. The dried pellet was resuspended into 490 µL sodium acetate buffer [5 mM, pH 4.5]. A 10 µL aliquot of each sample was mixed with 1.4 amyloglucosidase units (Roche Applied Science, West Sussex, UK) and incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 1 h to degrade the glycogen into glucose residuals. Glucose was quantified by a colorimetric assay using a commercial kit (Glucose GOD-PAP, Spinreact, Sant Esteve de Bas, Spain) according to the manufacturer's protocol.

### Glucagon tolerance test

Nine control and 10 supplemented mice were deprived of food for 12 h. An initial blood glucose measurement (0 min), was taken from tail-vein samples using a portable glucose meter (Precision QID, MediSense, Inc.). An intraperitoneal glucagon injection of 16 µg/kg of body weight (Eli-Lilly, Mexico City, Mexico) was administered to each mouse, and subsequent blood glucose concentrations were measured after 15, 30, 60, and 90 min of glucagon injection.

### Effect of glucagon on hepatic glycogenolysis

To analyze the effect of glucagon in hepatic glycogenolysis, an intraperitoneal glucose injection of 6 g/kg of body weight was administered to 12 h seven control and eight supplemented fasting mice, to replenish liver glycogen storage (fasting-refeeding condition). Four h after glucose administration, an initial blood glucose measurement was taken ( $T_0$ ). Next, 16 µg of glucagon/kg of body weight (Eli-Lilly), were administered intraperitoneally to each mouse, and subsequent blood glucose concentrations were measured after 15, 30, 60, and 90 min of glucagon injection.

### Statistical analysis

The statistical software Statview V.4.5 (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA) was used for statistical analysis. Data are presented as the means  $\pm$  SEM, and  $n$  represents the number of mice. Differences between experimental groups were analyzed by the Student's *t* test, two-way analysis of variance, or repeated measurements two-way analysis of variance where applicable.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## Results

### Effect of biotin supplementation on glucagon mRNA expression

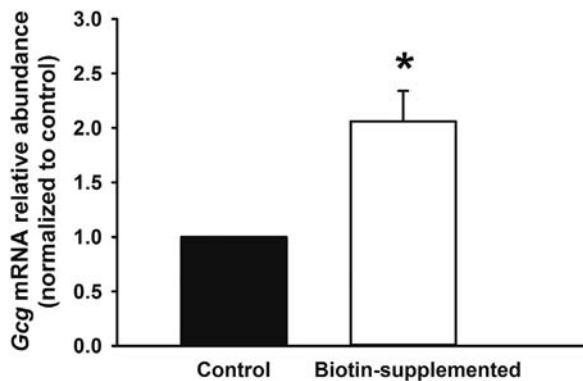
We explored the effect of biotin supplementation on glucagon mRNA expression in the islets of biotin-supplemented mice. The present analysis revealed a significant twofold increase in glucagon (*Gcg*) gene expression in response to the 8 wk of biotin supplementation (Fig. 1).

### Effect of biotin supplementation on glucagon secretion from isolated islets

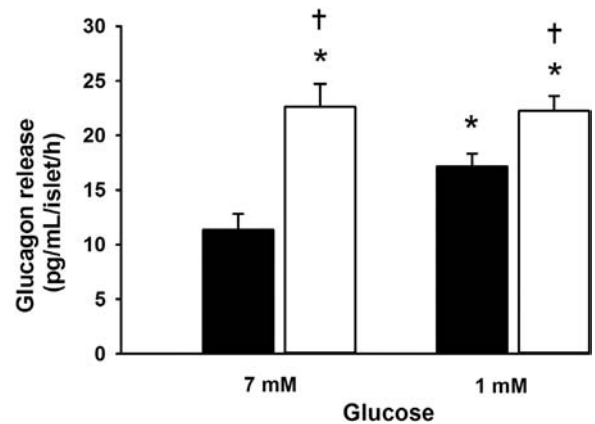
To evaluate whether biotin supplementation can increase glucagon secretion, we measured the glucose-induced glucagon release from islets isolated from both biotin-supplemented mice and a control group. Glucagon secretion levels increased significantly at both the basal (7 mM) and low (1 mM) glucose concentrations in islets isolated from biotin-supplemented mice. The effect was more pronounced at the 7 mM glucose concentrations (control:  $11.7 \pm 1.46$  and  $17.2 \pm 1.19$ ; biotin-supplemented:  $22.6 \pm 2.11$  and  $22.2 \pm 1.39$  pg of glucagon•mL•islet•h<sup>-1</sup> for high and low glucose, respectively; Fig. 2).

### Effect of biotin supplementation on fasting and nonfasting plasma glucagon and glucose levels

We investigated how the changes induced in glucagon expression and glucagon static secretion by biotin supplementation influenced the glucagon plasma levels under fasting and nonfasting conditions. The biotin-supplemented mice had higher fasting plasma glucagon concentrations than the control group (control:  $312 \pm 29.8$ ; supplemented:  $708 \pm 106$  pg/mL). No differences were found in the nonfasting glucagon levels between the groups (control:  $286.8 \pm 49.1$ ; supplemented:  $244 \pm 29.7$  pg/mL; Fig. 3). Notwithstanding the elevated fasting glucagon levels, no differences were seen in the fasting blood glucose concentration between the two groups (control:  $84.11 \pm 3.36$ , supplemented:  $77.40 \pm 4.03$  mg/dL). Likewise, no differences were observed in the nonfasting blood glucose levels for the control and supplemented mice ( $115.20 \pm 4.98$  and  $119.55 \pm 4.47$  mg/dL, respectively).



**Fig. 1.** Biotin supplementation increases glucagon gene expression. *Gcg* mRNA levels from the islets of control and biotin-supplemented mice were measured by real-time quantitative polymerase chain reactin and normalized to the levels of 18 S ribosomal RNA. Expression level is presented as the fold-change for biotin-supplemented islets relative to the control value. Data are presented as means  $\pm$  SEM. \* $P \leq 0.05$  was compared with the control. Samples were tested in duplicate.  $n = 5$  pools of 200 islets per group.



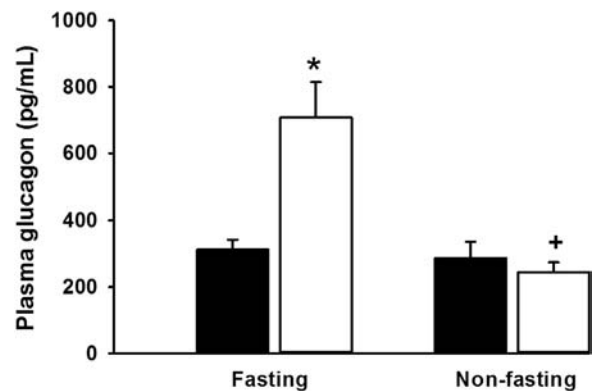
**Fig. 2.** Biotin supplementation increases glucagon secretion. Glucagon release was assessed from cultured pancreatic islets of control (black) or biotin-supplemented (white) mice. Data are presented as the means  $\pm$  SEM. The results are the means of four independent experiments. \* $P < 0.01$  compared with basal secretion (7 mM). † $P < 0.05$  compared with control under the same conditions.

### Effect of biotin supplementation on hepatic glucose release in response to glucagon

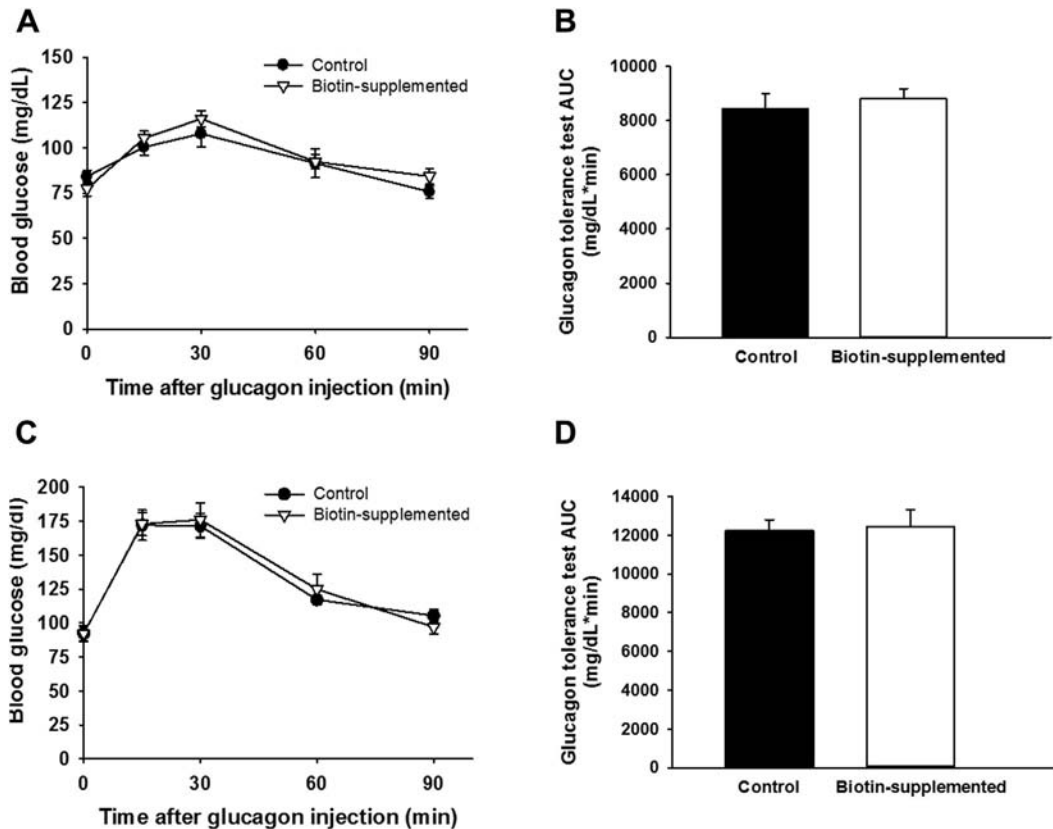
We analyzed hepatic glucagon sensitivity to examine further whether hepatic glucagon resistance could account for normal glucose concentration despite the increased glucagon levels. Glucagon tolerance test data in either a fasting state or fasting–refeed state revealed that the area under the curve and the hyperglycemic effect of glucagon were not significantly different between the two groups (Fig. 4).

### Effect of biotin supplementation on hepatic glycogen content and degradation

Glucagon induces glycogenolysis. We evaluated whether higher fasting plasma glucagon concentrations may affect hepatic glycogen content. No significant differences were observed in fasting glycogen content between the groups (control:  $6.08 \pm 0.62$ , supplemented:  $5.95 \pm 0.63$  ug glycogen/mg tissue;  $P = 0.88$ ). As expected, glycogen content after 2 h of glucose load was



**Fig. 3.** Biotin supplementation increases fasting plasma glucagon concentration. Glucagon concentrations in blood from the control (black) and biotin supplemented (white) mice under fasting or fed (nonfasting) conditions. The values represent the means  $\pm$  SEM. \* $P < 0.01$  for the comparison with fasted control mice. † $P < 0.01$  for the comparison with fasted, biotin-supplemented mice.  $n = 3$  to 6 mice for each group.



**Fig. 4.** Biotin supplementation does not affect hepatic glucagon sensitivity. Blood glucose concentrations and area under the curve during a glucagon tolerance test in fasting (A and B) or fasting–refeeding (C and D) conditions. Data are displayed for control mice (black circle/black bar) and biotin-supplemented mice (white triangle/white bar). The data are presented as the means  $\pm$  SEM.  $n = 9$  (fasting) and 7 (fasting–refeeding) mice for the control group, and 10 (fasting) and 8 (fasting–refeeding) mice for the supplemented group, respectively.

significantly higher ( $P < 0.0001$ ) than the fasting glycogen, and it subsequently decreased at 4 and 6 h postglucose load. No differences were found in hepatic glycogen content between the control and biotin-supplemented mice at any point in time (Fig. 5).

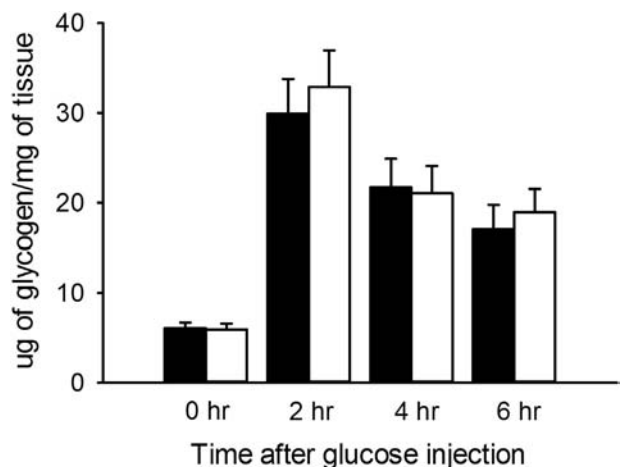
#### Effect of biotin supplementation on phosphoenol pyruvate carboxykinase mRNA expression

Because gluconeogenesis provides a major contribution to the overnight fasting glucose levels [31], we analyzed the effect of biotin on hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA abundance (*Pck1*), a key regulatory enzyme of this pathway whose expression is induced by glucagon. We found that the mRNA expression of *Pck1* was not modified, despite the increased plasma glucagon levels (control:  $1.00 \pm 0.016$ , supplemented:  $0.99 \pm 0.071$  fold-change;  $P = 0.88$ ; Fig. 6).

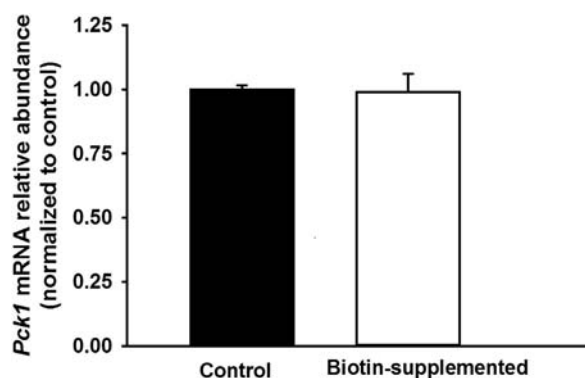
#### Discussion

Although increasing evidence demonstrates that pharmacologic concentrations of biotin modify glucose homeostasis, to our knowledge there have been no studies addressing the effect of biotin supplementation on glucagon production, secretion, or action. In a previous study [13], we found that biotin supplementation increased the proportion of  $\alpha$  and  $\beta$  cells by increasing the islet size. Furthermore, the percentage of islets with  $\alpha$  cells at the islet core was increased. These observations prompted us to investigate the implications of these effects on the glucagon

expression and secretion levels. In the present study, we found that biotin supplementation increased plasma glucagon levels, glucagon mRNA expression, and glucagon release from isolated islets, as well as fasting plasma glucagon levels without affecting glucagon action in the liver.



**Fig. 5.** Biotin supplementation does not affect hepatic glycogen content or degradation. Hepatic glycogen concentrations in fasting conditions and after a 6 g/kg intraperitoneal glucose injection. Data for control (black bar) and biotin-supplemented (white bar) mice are presented as means  $\pm$  SEM.  $n = 9, 6, 8,$  and 7 mice for control; and 10, 5, 7, and 9 for supplemented group at 0, 2, 4, and 6 h, respectively.



**Fig. 6.** Biotin supplementation does not modify *Pck1* gene expression. mRNA expression of the *Pck1* gene was determined from the liver of the control and biotin-supplemented mice. mRNA expression is presented as the fold-change for biotin-supplemented relative to the control value. Data are presented as the means  $\pm$  SEM.  $n = 7$  mice for each group.

The data demonstrated that 8 wk of biotin supplementation increases glucagon mRNA expression, an effect unlikely due to the increase in  $\alpha$  cells observed in our prior study [13], as the results were normalized to 18s ribosomal RNA. Additionally, glucagon release from isolated islets increased in the presence of 1 and 7 mM of glucose in biotin-supplemented mice. It is interesting to note that this increase in glucagon secretion was more pronounced at 7 mM of glucose, a concentration that inhibits the secretion of this hormone under normal conditions [32]. The mechanisms by which glucose controls glucagon secretion are controversial [32], making it difficult to discern the actions involved in the observed increase in static glucagon secretion at 7 mM glucose. Disruption of the islet structure has been associated with altered hormone secretion [33–35], and we previously found that biotin supplementation modifies the islet architecture [13]. Thus, this effect may have influenced glucagon secretion. However, in a previous study, we did not observe impaired insulin release [13], making it unlikely that islet structure accounts for increased glucagon secretion at 7 mM. We hypothesized that increased low glucose-induced glucagon secretion may act as a positive feedback signal since glucagon and cosecreted glutamate can amplify glucagon secretion levels [32]. Another possibility may be related to AMP-activated protein kinase (AMPK) action. AMPK activation induced by either pharmacologic agents or adenoviral transduction of an  $\alpha$ -cell line results in the stimulation of glucagon secretion at both low and high glucose concentrations [36]. We have previously shown that AMPK activation is involved in the effects of biotin supplementation in liver [37] and adipose tissue [38]. Nevertheless, the effects of biotin on AMPK activation in the islet have not been assessed. Further investigations are required to determine whether the increased glucagon secretion at low glucose, AMPK activation, or other intrinsic paracrine mechanisms are involved in biotin's effects on static glucagon secretion.

Despite the observed effects of biotin supplementation at 7 mM glucose on static glucagon release in isolated islets, the plasma glucagon concentrations in the nonfasting state (corresponding approximately to the glucose levels) were similar between the biotin-supplemented mice and control mice. These data suggest that other factors participate in the  $\alpha$ -cell glucose sensing and secretion in the biotin-supplemented mice in vivo.

The biotin-supplemented mice had higher plasma glucagon concentrations than the control group under fasting conditions. However, despite the increased fasting glucagon levels, no

differences were found in the overnight fasting blood glucose concentration between the two groups, suggesting that hepatic glucagon resistance could account for this effect. Nevertheless, the overnight fasting glucagon tolerance test revealed that the hormone was able to increase the glucose concentrations in a similar fashion in both the control and biotin-supplemented mice, as observed in the glucagon tolerance curves. This rules out the possibility that the increases in glucagon level observed in the biotin-supplemented mice were due to glucagon resistance.

Glucagon maintains fasting blood glucose via glycogenolysis and gluconeogenesis [39]. We analyzed the effect of biotin supplementation on hepatic glycogen breakdown as well as on gluconeogenesis rate-limit enzyme *Pck1* expression [40], which are two actions known to be regulated by increases in glucagon. No significant differences were found between the control and supplemented mice regarding basal glycogen content, glycogen breakdown, and glucagon tolerance in fasting–re-feeding conditions. This indicates that the increased plasma glucagon with biotin supplementation does not influence hepatic glycogen degradation. Likewise, we found a comparable mRNA abundance of the gluconeogenesis rate-limiting enzyme phosphoenolpyruvate carboxykinase (*Pck1*) between both the biotin-supplemented mice and the control mice.

Increases in insulin levels or action might have roles in the lack of glucagon in increasing fasting glucose levels because insulin suppresses gluconeogenesis and glycogenolysis [41]. However, as demonstrated in our previous work, 8 wk of biotin supplementation did not modify fasting or nonfasting serum insulin levels; therefore, it is unlikely that increased insulin levels account for the discrepancy. In Lazo de la Vega-Monroy et al. [13], we demonstrated that insulin action did not differ between the control and supplemented mice, so this mechanism does not seem to account for the discrepancy. In view of these facts, we speculated that the lack of glucagon effects might be related to AMPK, as studies in our laboratory have shown that 8 wk of biotin supplementation increases the active form of AMPK in the liver [37]. Furthermore, recent investigations have demonstrated that AMPK activation antagonizes hepatic glucagon-stimulated cyclic AMP signaling [42]. Therefore, it is possible that biotin-induced AMPK activation might counteract glucagon actions. Further studies are required to test this hypothesis.

Commercially available pharmacologic concentrations of biotin are used for the treatment of diabetes [3]. The effects of biotin supplementation on glucagon levels and  $\alpha$ -cell proportion [13] raise concerns about possible detrimental effects in patients with diabetes as hyperglucagonemia [43] and an increased proportion of  $\alpha$  cells relative to  $\beta$  cells [44,45] have been associated with type 2 diabetes mellitus. However, these features are accompanied by diminished  $\beta$ -cell mass and deficient glucose-induced insulin-secretion levels. Biotin supplementation increases the  $\alpha$ -cell mass [13] and fasting glucagon levels, as shown in the present study. However, in contrast with  $\beta$ -cell features and hyperglucagonemia observed in diabetes, biotin supplementation increases insulin secretion and  $\beta$ -cell mass without affecting total proportions of  $\alpha$  and  $\beta$  cells. Additionally, our observations show that despite increased glucagon concentrations, biotin supplementation does not affect gluconeogenesis or glycogenolysis, suggesting that pharmacologic concentrations of biotin are unlikely to have significant effects on fasting glucose levels. Indeed, the current evidence supports its safety in long-term treatment. Biotin supplementation in patients with diabetes for 2 mo decreased fasting blood glucose concentrations,

which was sustained for up to 48 mo after treatment without unwanted side effects or clinical deterioration [18]. Daily doses of 200 mg oral biotin or 20 mg intravenous have been used for treating inborn errors of biotin metabolism and do not have harmful effects on patients [46]. Current studies in our laboratory are assessing long-term biotin supplementation and its effects at various doses to support its use as a therapeutic agent.

The present study found that dietary biotin supplementation increased glucagon mRNA levels, glucagon release, and fasting plasma glucagon concentration. However, the increase in glucagon levels did not modify fasting blood glucose levels, glycogen degradation, and the expression of the gluconeogenesis rate-limiting enzyme phosphoenolpyruvate carboxykinase expression. Together with our previous findings of the effects of biotin in glucose-stimulated insulin secretion, improvement of glucose tolerance [13], and hypotriglyceridemic effects [26,47], the results suggest that biotin has the potential to be used as a therapeutic agent for metabolic diseases, either alone or in combination with other treatments.

## Conclusions

These results demonstrated that dietary biotin supplementation increased glucagon expression, and secretion without affecting fasting blood glucose concentrations or glucagon tolerance and, to our knowledge, provided for the first time insights into the effect of biotin supplementation on glucagon production and action.

## Acknowledgments

The authors acknowledge Martha Perez-Armendariz and Armando Tovar-Palacio for valuable discussions throughout these studies and BS Lilian Esparza Rosales and C. Alberto Rojas-Ochoa for technical assistance.

## References

- Zempleni J. Uptake, localization, and noncarboxylase roles of biotin. *Annu Rev Nutr* 2005;25:175–96.
- Carlberg C. Lipid soluble vitamins in gene regulation. *Biofactors* 1999;10:91–7.
- Fernandez Mejia C, Lazo De La Vega-Monroy ML. Biological effects of pharmacological concentrations of biotin. *J Evid Based Complementary Altern Med* 2011;16:40–8.
- Zempleni J, Helm RM, Mock DM. In vivo biotin supplementation at a pharmacologic dose decreases proliferation rates of human peripheral blood mononuclear cells and cytokine release. *J Nutr* 2001;131:1479–84.
- Wiedmann S, Eudy JD, Zempleni J. Biotin supplementation increases expression of genes encoding interferon-gamma, interleukin-1 beta, and 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase, and decreases expression of the gene encoding interleukin-4 in human peripheral blood mononuclear cells. *J Nutr* 2003;133:716–9.
- Baez-Saldana A, Camacho-Arroyo I, Espinosa-Aguirre JJ, Neri-Gomez T, Rojas-Ochoa A, Guerra-Araiza C, et al. Biotin deficiency and biotin excess: effects on the female reproductive system. *Steroids* 2009;74:863–9.
- Simmins PH, Brooks PH. Supplementary biotin for sows: effect on reproductive characteristics. *Vet Rec* 1983;112:425–9.
- Ahren B. Glucagon—early breakthroughs and recent discoveries. *Peptides* 2015;67:74–81.
- Reddi A, DeAngelis B, Frank O, Lasker N, Baker H. Biotin supplementation improves glucose and insulin tolerances in genetically diabetic KK mice. *Life Sci* 1988;42:1323–30.
- Koutsikos D, Fourtounas C, Kapetanaki A, Agroyannis B, Tzanatos H, Rammos G, et al. Oral glucose tolerance test after high-dose i.v. biotin administration in normoglycemic hemodialysis patients. *Ren Fail* 1996;18:131–7.
- Zhang H, Osada K, Maebashi M, Ito M, Komai M, Furukawa Y. A high biotin diet improves the impaired glucose tolerance of long-term spontaneously hyperglycemic rats with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 1996;42:517–26.
- Sasaki Y, Sone H, Kamiyama S, Shimizu M, Shirakawa H, Kagawa Y, et al. Administration of biotin prevents the development of insulin resistance in the skeletal muscles of Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. *Food Funct* 2012;3:414–9.
- Lazo de la Vega-Monroy ML, Larrieta E, German MS, Baez-Saldana A, Fernandez-Mejia C. Effects of biotin supplementation in the diet on insulin secretion, islet gene expression, glucose homeostasis and beta-cell proportion. *J Nutr Biochem* 2013;24:169–77.
- Sahin K, Tuzcu M, Orhan C, Sahin N, Kucuk O, Ozercan IH, et al. Anti-diabetic activity of chromium picolinate and biotin in rats with type 2 diabetes induced by high-fat diet and streptozotocin. *Br J Nutr* 2013;110:197–205.
- Baez-Saldana A, Zendejas-Ruiz I, Revilla-Monsalve C, Islas-Andrade S, Cardenas A, Rojas-Ochoa A, et al. Effects of biotin on pyruvate carboxylase, acetyl-CoA carboxylase, propionyl-CoA carboxylase, and markers for glucose and lipid homeostasis in type 2 diabetic patients and nondiabetic subjects. *Am J Clin Nutr* 2004;79:238–43.
- Coggeshall JC, Hegggers JP, Robson MC, Baker H. Biotin status and plasma glucose in diabetics. *Ann N Y Acad Sci* 1985;447:389–92.
- Hemmati M, Babaei H, Abdolsalehi M. Survey of the effect of biotin on glycemic control and plasma lipid concentrations in type 1 diabetic patients in kermanshah in iran (2008–2009). *Oman Med J* 2013;28:195–8.
- Maebashi M, Makino Y, Furukawa Y, Ohinata K, Kimura S, Sato T. Therapeutic evaluation of the effect of biotin on hyperglycemia in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Clin Biochem Nutr* 1993;14:211–8.
- Yoshikawa H, Tajiri Y, Sako Y, Hashimoto T, Umeda F, Nawata H. Effects of biotin on glucotoxicity or lipotoxicity in rat pancreatic islets. *Metabolism* 2002;51:163–8.
- Vilches-Flores A, Tovar AR, Marin-Hernandez A, Rojas-Ochoa A, Fernandez-Mejia C. Biotin increases glucokinase expression via soluble guanylate cyclase/protein kinase G, adenosine triphosphate production and autocrine action of insulin in pancreatic rat islets. *J Nutr Biochem* 2010;21:606–12.
- Romero-Navarro G, Cabrera-Valladares G, German MS, Matschinsky FM, Velazquez A, Wang J, et al. Biotin regulation of pancreatic glucokinase and insulin in primary cultured rat islets and in biotin-deficient rats. *Endocrinology* 1999;140:4595–600.
- Borboni P, Magnaterra R, Rabini RA, Staffolani R, Porzio O, Sesti G, et al. Effect of biotin on glucokinase activity, mRNA expression and insulin release in cultured beta-cells. *Acta Diabetol* 1996;33:154–8.
- Sone H, Ito M, Shimizu M, Sasaki Y, Komai M, Furukawa Y. Characteristics of the biotin enhancement of glucose-induced insulin release in pancreatic islets of the rat. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000;64:550–4.
- Sone H, Ito M, Sugiyama K, Ohneda M, Maebashi M, Furukawa Y. Biotin enhances glucose-stimulated insulin secretion in the isolated perfused pancreas of the rat. *J Nutr Biochem* 1999;10:237–43.
- Matschinsky FM. Banting lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes* 1996;45:223–41.
- Larrieta E, Velasco F, Vital P, Lopez-Aceves T, Lazo-de-la-Vega-Monroy ML, Rojas A, et al. Pharmacological concentrations of biotin reduce serum triglycerides and the expression of lipogenic genes. *Eur J Pharmacol* 2010;644:263–8.
- Baez-Saldana A, Ortega E. Biotin deficiency blocks thymocyte maturation, accelerates thymus involution, and decreases nose-rump length in mice. *J Nutr* 2004;134:1970–7.
- Larrieta E, Vega-Monroy ML, Vital P, Aguilera A, German MS, Hafidi ME, et al. Effects of biotin deficiency on pancreatic islet morphology, insulin sensitivity and glucose homeostasis. *J Nutr Biochem* 2012;23:392–9.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402–8.
- Trinder P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem* 1969;6:24–7.
- Rui L. Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol* 2014;4:177–97.
- Gylfe E, Gilon P. Glucose regulation of glucagon secretion. *Diabetes Res Clin Pract* 2014;103:1–10.
- Kilimnik G, Zhao B, Jo J, Periwal V, Witkowski P, Misawa R, et al. Altered islet composition and disproportionate loss of large islets in patients with type 2 diabetes. *PLoS One* 2011;6:e27445.
- Kane MA, Foliass AE, Pingitore A, Perri M, Krois CR, Ryu JY, et al. Crbpl modulates glucose homeostasis and pancreas 9-cis-retinoic acid concentrations. *Mol Cell Biol* 2011;31:3277–85.
- Jain R, Lammert E. Cell-cell interactions in the endocrine pancreas. *Diabetes Obes Metab* 2009;11(Suppl 4):159–67.
- Leclerc I, Sun G, Morris C, Fernandez-Millan E, Nyirenda M, Rutter GA. AMP-activated protein kinase regulates glucagon secretion from mouse pancreatic alpha cells. *Diabetologia* 2011;54:125–34.
- Aguilera-Mendez A, Fernandez-Mejia C. The hypotriglyceridemic effect of biotin supplementation involves increased levels of cGMP and AMPK activation. *Biofactors* 2012;38:387–94.
- Boone-Villa D, Aguilera-Mendez A, Miranda-Cervantes A, Fernandez-Mejia C. Effects of biotin supplementation in the diet on adipose tissue



- cGMP concentrations, AMPK activation, lipolysis, and serum-free fatty acid levels. *J Med Food* 2015;18:1150–6.
- [39] Ramnanan CJ, Edgerton DS, Kraft G, Cherrington AD. Physiologic action of glucagon on liver glucose metabolism. *Diabetes Obes Metab* 2011;13(Suppl 1):118–25.
- [40] Christ B, Nath A, Bastian H, Jungermann K. Regulation of the expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in cultured rat hepatocytes by glucagon and insulin. *Eur J Biochem* 1988;178:373–9.
- [41] Cherrington AD, Chiasson JL, Liljenquist JE, Jennings AS, Keller U, Lacy WW. The role of insulin and glucagon in the regulation of basal glucose production in the postabsorptive dog. *J Clin Invest* 1976;58:1407–18.
- [42] Johanns M, Lai YC, Hsu MF, Jacobs R, Vertommen D, Van Sande J, et al. AMPK antagonizes hepatic glucagon-stimulated cyclic AMP signalling via phosphorylation-induced activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 4 B. *Nat Commun* 2016;7:10856.
- [43] Li XC, Zhuo JL. Current insights and new perspectives on the roles of hyperglucagonemia in non-insulin-dependent type 2 diabetes. *Curr Hypertens Rep* 2013;15:522–30.
- [44] Henquin JC, Rahier J. Pancreatic alpha cell mass in European subjects with type 2 diabetes. *Diabetologia* 2011;54:1720–5.
- [45] Yoon KH, Ko SH, Cho JH, Lee JM, Ahn YB, Song KH, et al. Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2300–8.
- [46] Mock DM. Biotin. In: Shils ME, Shike M, Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, editors. *Modern nutrition in health and disease*. 10th ed. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 498–506.
- [47] Revilla-Monsalve C, Zendejas-Ruiz I, Islas-Andrade S, Baez-Saldana A, Palomino-Garibay MA, Hernandez-Quiroz PM, et al. Biotin supplementation reduces plasma triacylglycerol and VLDL in type 2 diabetic patients and in nondiabetic subjects with hypertriglyceridemia. *Biomed Pharmacother* 2006;60:182–5.