



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**EFFECTOS DE LA BIOTINA EN EL METABOLISMO  
DE CARBOHIDRATOS EN LA SEMANA POSTERIOR  
AL DESTETE DE RATÓN**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

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

**MAURA ANGÉLICA FLORES AGUILAR**



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

**2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **HOJA DE DATOS DEL JURADO**

### 1.-Datos del alumno

Apellido paterno: Flores  
Apellido materno: Aguilar  
Nombres: Maura Angélica  
Teléfono: 55-56-22-64-20  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
Número de cuenta: 407064607

### 2.-Datos del tutor

Grado: Dra.  
Nombres: María Cristina  
Apellido paterno: Fernández  
Apellido materno: Mejía

### 3.-Datos del sinodal 1

Grado: Dra.  
Nombres: María Eugenia  
Apellido paterno: Gonsebatt  
Apellido materno: Bonaparte

### 4.-Datos del sinodal 2

Grado: Dr.  
Nombres: René de Jesús  
Apellido paterno: Cárdenas  
Apellido materno: Vázquez

### 5.-Datos del sinodal 3

Grado: M. en C.  
Nombres: Miguel Ángel  
Apellido paterno: Palomino  
Apellido materno: Garibay

### 6.-Datos del sinodal 4

Grado: M. en C.  
Nombres: Néstor Emmanuel  
Apellido paterno: Díaz  
Apellido materno: Martínez

### 7.-Datos del trabajo escrito

Título: Efectos de la biotina en el metabolismo de carbohidratos en la semana posterior al destete de ratón  
Número de páginas: 65  
Año: 2011

## ÍNDICE

Resumen.....	6
Abreviaturas frecuentes.....	7
1 Introducción.....	8
1.1 Diabetes mellitus.....	8
1.1.1 Definición.....	8
1.1.2 Epidemiología.....	8
1.2 Programación metabólica.....	8
1.2.1 Definición.....	8
1.2.1 Su relación con la diabetes mellitus.....	9
1.3 Páncreas.....	10
1.3.1 Desarrollo del órgano.....	11
1.3.2 Ventana crítica postnatal.....	13
1.4 Arquitectura del islote.....	14
1.5 Biotina.....	17
1.5.1 Biotina en el desarrollo fetal.....	22
1.5.2 Biotina en el metabolismo de carbohidratos.....	22
1.5.2.1 Efectos de la biotina sobre el metabolismo de carbohidratos en diferentes condiciones fisiológicas.....	23
1.5.2.3 Efectos de la biotina sobre modelos diabéticos.....	24
2 Planteamiento del problema.....	26
2.1 Hipótesis.....	26
3 Objetivos.....	27
3.1 Objetivos generales.....	27
3.2 Objetivos particulares.....	27
4 Material y métodos.....	28
4.1 Animales de experimentación.....	28
4.2 Determinación de glucosa sanguínea.....	28

4.3	Curvas de tolerancia a la insulina.....	28
4.4	Curvas de tolerancia a la glucosa.....	29
4.5	Determinación de insulina y glucagon en suero.....	29
4.6	Análisis histológicos de páncreas.....	30
4.7	Análisis estadístico.....	30
5	Resultados.....	31
5.1	Caracterización del metabolismo de carbohidratos y la morfología y fisiología pancreáticas de ratones durante la ventana crítica postnatal.....	31
5.1.1	Peso corporal.....	31
5.1.2	Consumo de alimento.....	32
5.1.3	Peso del páncreas.....	33
5.1.4	Peso del tejido adiposo.....	34
5.1.5	Glucosa sanguínea en ayuno.....	35
5.1.6	Glucosa sanguínea postprandial.....	36
5.1.7	Curva de tolerancia a la glucosa.....	36
5.1.8	Curva de tolerancia a la insulina.....	37
5.1.9	Insulina en suero.....	38
5.1.10	Glucagon en suero.....	39
5.1.11	Morfología pancreática.....	39
5.1.11.1	Número de islotes.....	39
5.1.11.2	Tamaño de los islotes.....	40
5.1.11.3	Número de islotes en vías de formación.....	41
5.1.11.4	Expresión de Glut 2.....	41
5.1.11.5	Islotes con células $\alpha$ al centro.....	42
5.2	Efectos de la biotina sobre el metabolismo de carbohidratos y en la morfología y fisiología pancreáticas durante la ventana crítica postnatal.....	43
5.2.1	Peso corporal.....	43
5.2.2	Consumo de alimento.....	44
5.2.3	Peso del páncreas.....	45
5.2.4	Glucosa sanguínea en ayuno.....	46
5.2.5	Glucosa sanguínea postprandial.....	47
5.2.6	Curva de tolerancia a la glucosa.....	48
5.2.7	Insulina en suero.....	48

5.2.8 Glucagon en suero.....	49
5.2.9 Morfología pancreática.....	50
5.2.9.1 Número de islotes.....	50
5.2.9.2 Tamaño de los islotes.....	51
5.2.9.3 Número de islotes en vías de formación.....	51
5.2.9.4 Expresión de Glut 2.....	52
5.2.9.5 Islotes con células $\alpha$ al centro.....	52
6 Discusión.....	53
6.1 Caracterización del metabolismo de carbohidratos y la morfología y fisiología pancreáticas de ratones durante la ventana crítica postnatal.....	53
6.2 Efectos de la biotina sobre el metabolismo de carbohidratos y en la morfología y fisiología pancreáticas durante la ventana crítica postnatal.....	55
7 Conclusiones.....	58
8 Referencias.....	59
9 Anexos.....	---

## **RESUMEN**

La biotina es una vitamina hidrosoluble que en concentraciones farmacológicas interviene en diversas funciones biológicas como el desarrollo embrionario y el metabolismo de carbohidratos. En estudios previos encontramos que la administración de una dieta suplementada con concentraciones farmacológicas de biotina durante 8 semanas incrementa la expresión de genes que favorecen la síntesis de insulina, aumenta su secreción y produce cambios estructurales en el islote pancreático, que es el micro-órgano encargado del mantenimiento de la homeostasis de la glucosa y cuya estructura, así como su función en el organismo adulto, están determinados por el desarrollo postnatal temprano. Dado que la administración de la dieta se inició en el periodo posterior al destete, es posible que las modificaciones que produce la suplementación con biotina observados a las ocho semanas se efectúen durante el periodo de post-ablactación. Ratones macho BALB/cAnN Hsd recién destetados se alimentaron por siete días con dieta control o dieta suplementada con biotina (0.8 ó 100 mg de biotina/kg de alimento, respectivamente). Encontramos que los ratones que recibieron la dieta rica en la vitamina presentan niveles de glucosa más bajos comparados con los ratones control; igualmente muestran un metabolismo de la glucosa más eficiente debido a una mayor sensibilidad a la insulina. Los islotes del grupo suplementado cuentan con una citoarquitectura comparable con la estructura del islote adulto. Así mismo, en este estudio se realiza la descripción de la ventana crítica postnatal pancreática. Nuestros datos indican que la biotina acelera la maduración del islote y mejora su función, lo que tendría efectos benéficos en la etapa adulta evitando el desarrollar enfermedades como la diabetes mellitus, padecimiento que representa uno de los problemas de salud más graves en México y en el mundo.

## **ABREVIATURAS FRECUENTES**

Sox9: región determinante del sexo Y, caja 9.	MafA: familia de oncogenes de fibrosarcoma músculo-aponeurótico v-maf, proteína A.
Nkx2.2: factor de transcripción relacionado con NK2, locus 2.	LKB1: proteína relacionada con la polimerización LKB1.
Nkx6.1: NK6 homeobox 1.	SMVT: transportador múltiple de vitaminas dependiente de sodio.
Pdx1: homeobox pancreática y duodenal 1.	ACC1 : acetil-CoA carboxilasa 1.
Ptf1a: factor de transcripción específico de páncreas, 1a.	ACC2 : acetil-CoA carboxilasa 2.
Hnf1b: homeobox B.	PK : piruvato cinasa.
Hhex: homeobox expresada hematopoyéticamente.	PCC : propionil-CoA carboxilasa.
Foxa2: forkhead caja A2.	MCC: metilcrotonil- CoA carboxilasa.
Mnx1: neurona motora y pancreática homeobox 1.	ATP: trifosfato de adenosina.
Ngn3: neurogenina 3.	Met: metionina.
Neurod1: diferenciación neurogénica 1.	Lys: lisina.
Pax6: gen de la caja 6.	HCS: holocarboxilasa sintetasa.
Irx1: iroquois homeobox 1.	GK: glucocinasa.
Irx2 : iroquois homeobox 2.	PEPCK: fosfoenol piruvato carboxilasa.
Brn4 : proteína de cerebro- 4 clase III dominio POU.	PKG: piruvato cinasa G.
Arx : proteína homeobox Arx.	ARNm: ácido ribonucleico mensajero.
HNF3 $\beta$ : HNF-3-beta-A.	GMPc: guanosina monofosfato cíclico.
HNF1 $\alpha$ : HNF1 homeobox A.	Cacna1d: canal de calcio dependiente de voltaje tipo L, subunidad alfa ID.
CTGF : factor de crecimiento de tejido conectivo.	G6PDH: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.
HNF6 : factor nuclear hepático 6.	PFK: fosfofructocinasa.
N-CAM : molécula de adhesión celular neural 1.	HSL: lipasa sensible a hormonas.



# **1 INTRODUCCIÓN**

## **1.1 Diabetes mellitus**

### **1.1.1 Definición**

La diabetes mellitus se define como un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia crónica, resultado de defectos en la secreción de insulina, en la acción de ésta o en ambos (American Diabetes Association, 2010).

### **1.1.2 Epidemiología**

En las últimas cuatro décadas la diabetes se ha convertido en un grave problema de salud en México, siendo ésta la principal causa de muerte en mujeres y la segunda más frecuente en hombres desde el año 2000. Se estima que para el 2025 cerca de 11.7 millones de mexicanos serán diagnosticados con la enfermedad (Rull, J.A. et al., 2005). Cabe señalar que en el resto del mundo también representa una situación alarmante pues ha alcanzado proporciones epidémicas, siendo los países en vías de desarrollo las naciones más afectadas (Zimmet, P. et al., 2001).

En el desarrollo de la diabetes participan diversos factores, entre ellos el bagaje genético y las cuestiones medioambientales. La razón del explosivo incremento del padecimiento es el estilo de vida que existe en la actualidad, el cual consiste en un consumo abundante de calorías y un bajo aprovechamiento de éstas debido a una reducida actividad física (Zimmet, P. et al., 2001). Aunado a esto, en los últimos años se ha reconocido que la programación metabólica juega un importante rol y que está relacionada con la etiología de la enfermedad (Simmons, R.A, 2007).

## **1.2 Programación metabólica**

### **1.2.1 Definición**

La programación metabólica se define como un fenómeno donde un estrés o estímulo nutricional aplicado durante periodos críticos del desarrollo temprano,

altera permanentemente la fisiología y el metabolismo del organismo. Las consecuencias de éste son observadas mucho tiempo después en la vida del individuo a pesar de que el estrés o estímulo con el que se inició ya no esté presente (Lucas A., 1991) (Figura 1).

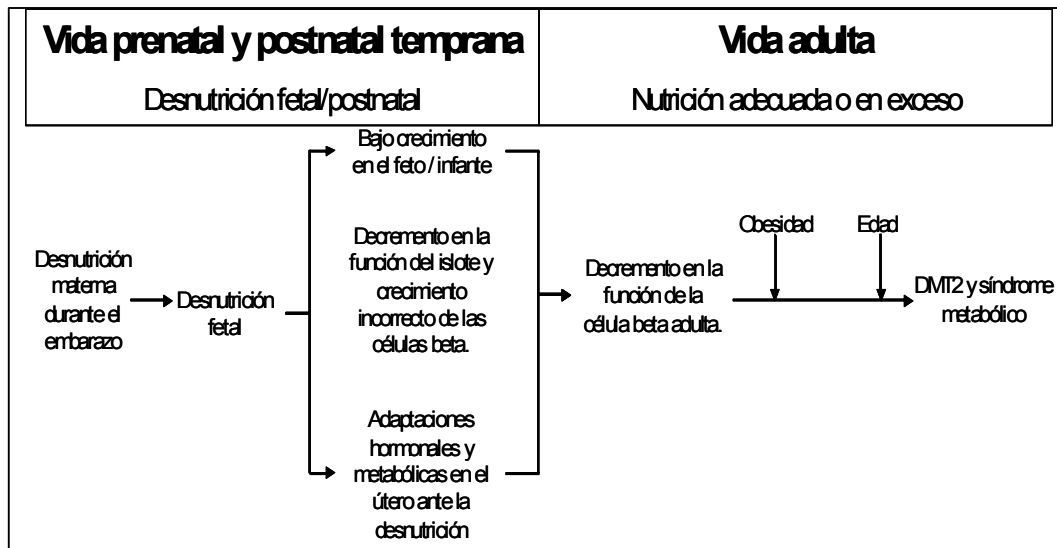


Figura 1. Representación esquemática sobre la programación metabólica de las células beta y su relación con el desarrollo de diabetes (Ozanne, S. et al., 2002)

### 1.2.1 Su relación con la diabetes mellitus

Estudios epidemiológicos en humanos y animales proveen evidencia de la relación de la programación metabólica con el desarrollo de diabetes tipo 2. Se ha encontrado que un ambiente intrauterino adverso se correlaciona con un incremento en el riesgo de desarrollar la enfermedad (Barker, D., 1995). Así, alteraciones nutricionales durante el periodo crítico de maduración pancreática tales como cambios en los componentes del alimento (Srinivasan, M., 2003), restricción calórica y proteica, dietas ricas en carbohidratos y lípidos (Schwitzgebel, V. et al., 2009) o deficiencia de vitamina A (Matthews, K. et al., 2004), dañan el desarrollo normal del islote a través de una reducción de la proliferación de las células  $\beta$  y del tamaño de los islotes en la cabeza del páncreas, así como un incremento en la apoptosis, una reducida vascularización y cambios estructurales; los cuales afectan la capacidad del

islote de responder a retos metabólicos en periodos posteriores de la vida (Ozanne, S. et. al., 2002).

### **1.3 Páncreas**

El páncreas es una glándula de secreción mixta que en los mamíferos está localizada en la cavidad abdominal entre el bazo y el duodeno conectándose con este último por el ámpula de Vater, que es la región donde se unen el conducto pancreático principal y el conducto biliar (Bishop, A. et al., 2003).

Anatómicamente el páncreas está dividido en cabeza, cuerpo y cola. La mayor parte del órgano está formada por la parte exócrina que corresponde al tejido acinar, el cual produce enzimas digestivas y bicarbonato que son liberados durante la digestión al conducto pancreático y al duodeno. Distribuidos entre el tejido acinar hay grupos de células que forman los denominados islotes de Langerhans, los cuales constituyen la parte endócrina y representan del 1 al 2% del volumen total de la glándula. El tamaño de los islotes varía en diámetro y puede ir de los 50 a los 500  $\mu\text{m}$ ; cada uno de ellos está formado por entre 50 y 300 células (Hiriart, M., 2002).

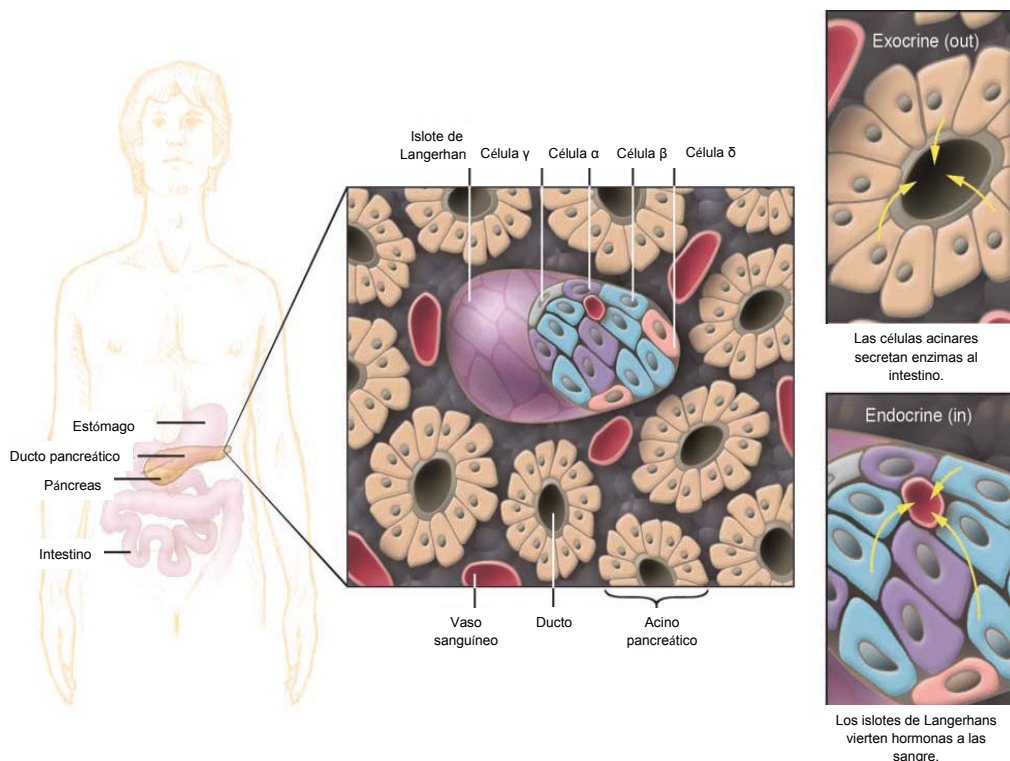


Figura 2. Localización del páncreas y corte que muestra los distintos tipos celulares que lo constituyen (Trucco, M., 2005)

Los tipos celulares endócrinos son cinco. Las primeras y más abundantes son las células  $\beta$ , las cuales secretan insulina y un antagonista de ésta llamado amilina, también se encuentran las células  $\alpha$  que secretan glucagon, las células  $\delta$  secretoras de somatostatina, y las células  $\epsilon$  y las PP que secretan ghrelina y polipéptido pancreático, respectivamente (Bishop, A. et al., 2003) (Figura 2).

### **1.3.1 Desarrollo del órgano**

El desarrollo del páncreas es un proceso altamente regulado. Comienza a partir de un grupo de células progenitoras del endodermo que tienen la característica de ser multipotentes, las cuales se convertirán en células ductales, endócrinas ( $\alpha, \beta, \delta, \epsilon$ , o PP) o del linaje acinar.

La morfogénesis se da a partir del día 9.5 con dos evaginaciones del intestino anterior, una dorsal y otra ventral. Desde que éstas aparecen se inicia la expresión de factores de transcripción claves en el epitelio pancreático: Sox9, Nkx2.2 y Nkx6.1, así como de genes y otros factores muy importantes en el intestino que lo rodea: Pdx1, Ptf1a, Hnf1b, Hhex, Foxa2, Mnx1; los cuales controlan la expansión de la evaginaciones y activan otros factores de transcripción. Mientras esto sucede el intestino va girando y acercando las evaginaciones, poniéndolas en una cercana proximidad al E12.5 y fusionándolas al E16.5.

La diferenciación de células requiere de la expresión transitoria del factor de transcripción Ngn3, el cual compromete a las células del epitelio a linaje endócrino apareciendo células positivas a glucagon al E9.5 y células positivas a insulina al E10.5. Cabe señalar que este proceso comienza de manera más temprana en la evaginación dorsal que en la ventral.

Aproximadamente al E13 ocurre una segunda ola de expresión del factor Ngn3, el cual activa otros genes tales como Neurod1, Pax4 y Nkx2.2. Eventualmente la expresión de múltiples factores transcripcionales van a definir la identidad de las células endócrinas presentes en los islotes. Básicamente las células  $\alpha$  se

caracterizan por Pax 6, Nkx2.2, Irx1 y 2, Brn4 y Arx, las  $\beta$  por Pax 4, Pax6, Nkx2.2, Nkx6.1, Mnx1, MafA y Pdx1, las  $\delta$  por Pax4 y Pax6, y las PP por Nkx2.2 (Vanhoof, D. et al., 2009) (Figura 3).

Una estructura bien definida y seccionada es distinguible al E 14.5 donde las células endócrinas son identificables desde E15.5, éstas son derivadas de las células ductales epiteliales por neogénesis, las cuales después de muchas divisiones darán lugar a agrupaciones de células alrededor de los ductos pancreáticos. Los vasos comienzan a invadir esas agrupaciones de células inmaduras que coexpresan hormonas pancreáticas y algunos neuropéptidos, lo que posteriormente dará lugar a los islotes de Langerhans (Reusens, B. et al, 2006).

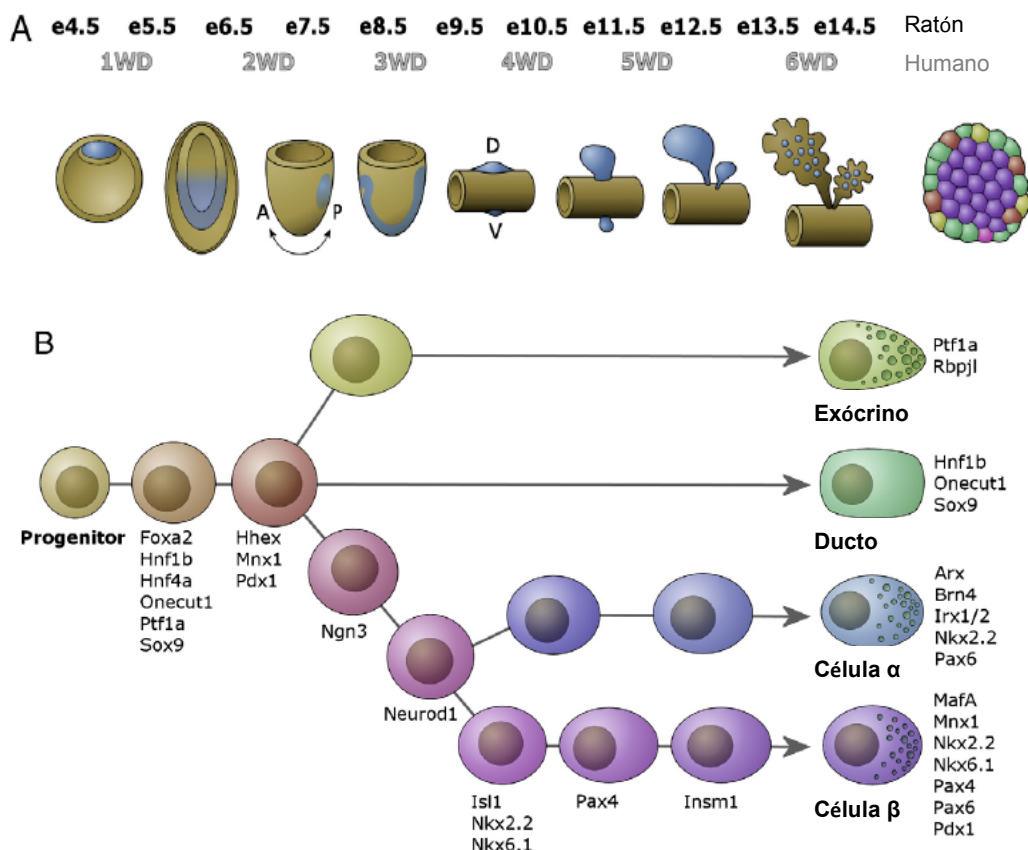


Figura 3. A) Vista esquemática de la diferenciación de los islotes. B) Representación del mecanismo de especificación de la parte endócrina y exócrina del páncreas (Vanhoof, D. et al., 2009).

### **1.3.2 Ventana crítica postnatal**

Como ya se describió, a lo largo del desarrollo del páncreas se llevan a cabo cambios críticos que conducen a una correcta diferenciación y funcionamiento del órgano, los cuales no concluyen en el nacimiento del individuo pues en el periodo posnatal también se presentan cambios que son clave y que comienzan desde el nacimiento, siguen en la lactancia y finalizan en el destete. Éstos determinan la completa maduración de los islotes, su correcta función y una adecuada morfología.

Cabe destacar que el destete representa un gran reto metabólico pues el organismo se ve sometido a un cambio nutricional brusco al pasar de una dieta rica en lípidos que caracteriza a la leche materna a una dieta omnívora rica en carbohidratos principalmente. En los roedores este parteaguas se presenta 21 días después del nacimiento, al cual prosigue una etapa que por su importancia es una ventana crítica posnatal para el órgano, que como se ha definido anteriormente, es un periodo en el que ocurren importantes cambios estructurales y funcionales durante el desarrollo normal de un órgano, en el cual la exposición a ciertos factores ambientales puede originar consecuencias adversas en etapas posteriores (Lucas, A., 1995).

Se reporta que del día posnatal 21 al 28 en ratas, las células  $\beta$  neonatales presentan una baja sensibilidad a la glucosa y una secreción de insulina escasa y unimodal comparada con células  $\beta$  adultas, lo cual refleja una inmadurez funcional. En cuanto a las células  $\alpha$  se ha reportado que, en la ya mencionada ventana crítica, hay un importante decremento en células positivas a glucagon localizadas en la cabeza del páncreas, mientras que se presenta un incremento en la zona del cuerpo y la cola. Este efecto se da paralelamente a un decremento en las concentraciones de glucagon en suero (Aguayo, C. et al., 2006).

Es importante mencionar que, a pesar de la ya reconocida importancia de la programación metabólica en el periodo posnatal para el desarrollo de enfermedades tales como la diabetes, se sabe poco de los eventos moleculares y fisiológicos que ocurren en el periodo posterior al destete.

## **1.4 Morfogénesis del islote**

La formación de los islotes de Langerhans ocurre al rededor E 18-19 y concluye dos o tres semanas después del nacimiento (Haber, J. et al., 2005). El resultado de este proceso es tan complejo que los islotes han sido denominados microorganos altamente vascularizados y minuciosamente organizados los cuales cuentan con una arquitectura específica (Booner-Weir, S., 1988; Lammert, E., 2003). Para que esto se logre son necesarios una serie de eventos morfogénéticos tales como especificación celular, migración y reagregación (Pictet, R., 1972; Slack, J., 1995; Esni F., 1999) (Figura 4).

Se ha propuesto que la correcta estructura de las células endócrinas dentro de los islotes es requerida para una correcta función (Gomez-Dumm, C. et al., 1990; Tokuyama, Y. et al., 1995; Esni, F., 1995) y una apropiada respuesta a cargas de glucosa a través de una secreción de insulina de manera pulsátil y proporcional a la concentración del carbohidrato (Nittala, A. et al., 2007).

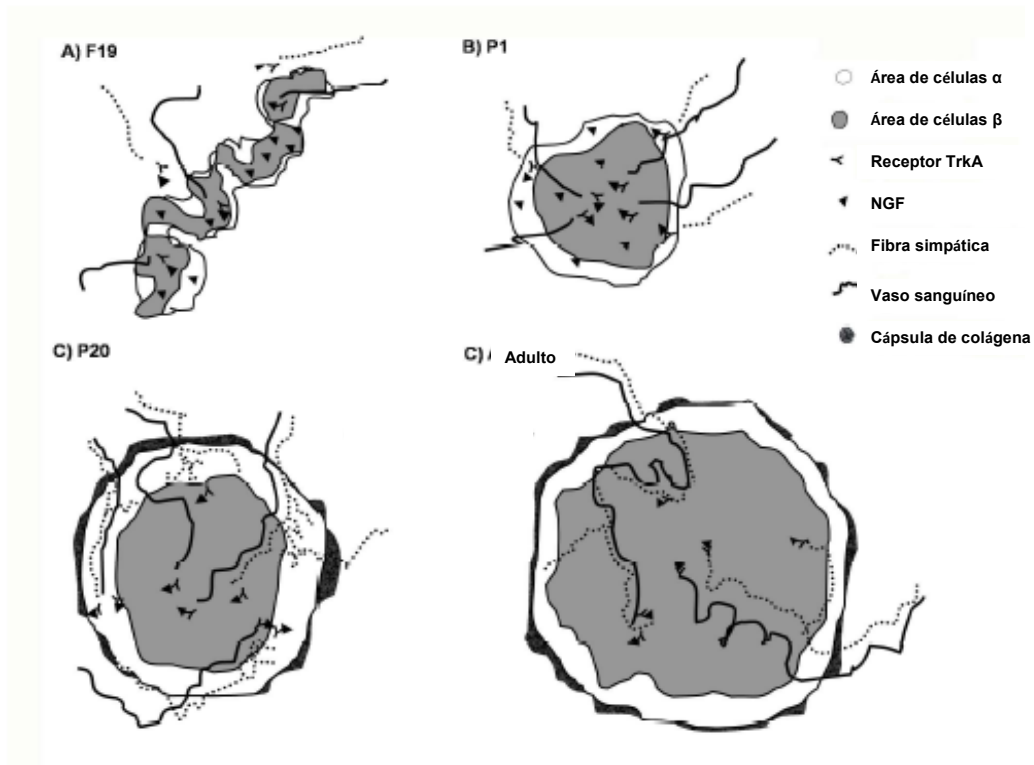


Figura 4. Representación de la formación de los islotes de Langerhans a partir del desarrollo embrionario hasta la adultez (Cabrera, S., 2009) .

La arquitectura normal de un islote de ratón adulto y en general de los roedores consiste en una estructura bien definida generalmente esférica donde las células  $\beta$ , las cuales representan del 60-80% del total de células en el islote, se encuentran en la parte central; mientras que existe una capa de otras células endócrinas que lo rodean incluyendo células  $\alpha$  (15-20% del total de células en el islote),  $\delta$  (<10% del total) y PP (<1%) (Figura 5) (Wieczorek, G. et al., 1998; Brissova, M. et al., 2005; Cabrera, O. et al., 2006; Quesada, I. et al., 2008; Kim, A. et al., 2009). Las células  $\alpha$  aparecen en varias secciones del tejido formando una capa continua de células alrededor de la parte central consistente en células  $\beta$ , sin embargo, análisis tridimensionales recientes sobre la distribución de este tipo celular muestran que las células  $\alpha$  no rodean completamente a las  $\beta$  tal como sucede en islotes de ratas y de humanos, pudiendo encontrar algunas de éstas entremezcladas con las células  $\beta$  en la parte central del islote (Kharouta, M. et al., 2009).

Cabe destacar que otra diferencia que se ha reportado entre los islotes de rata y ratón, además de la morfología, es que éstos últimos tienen una cinética de secreción de insulina diferente, ya que no cuentan con una respuesta bifásica de secreción en respuesta a glucosa presentando únicamente una primera fase de exocitosis rápida, lo que nos indica que la regulación de la secreción de insulina por nutrientes difiere entre una especie y otra (Zawalich, W. et al., 2000). Por esta razón se han puesto de manifiesto los riesgos de extrapolar resultados obtenidos en modelos de rata a modelos de ratón, ya que es evidente que el funcionamiento de la célula  $\beta$ , principal componente del islote pancreático, es distinta (YH, Ma. et al., 1995).

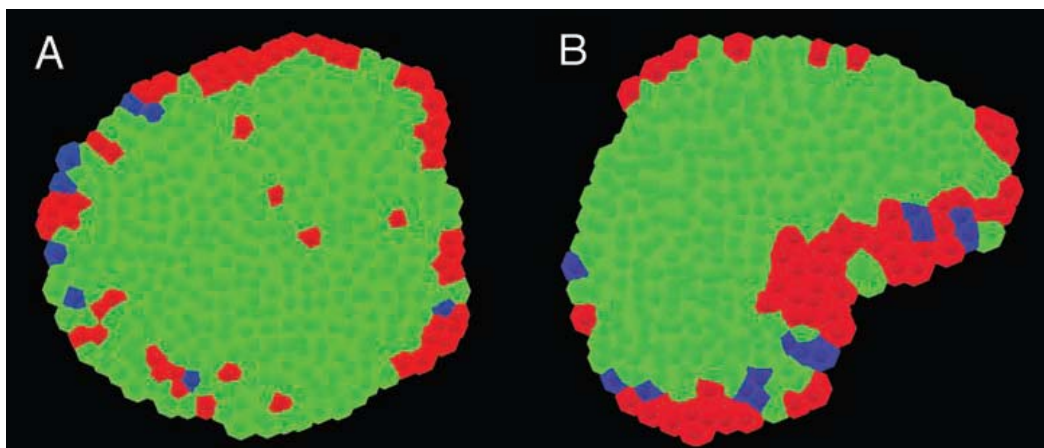




Figura 5. Islotes de ratón basadas en imágenes de inmunohistoquímicas mostrando sus distintos tipos celulares:  $\alpha$  (rojo),  $\beta$  (verde),  $\delta$  (azul). A) Islote de ratón adulto. B) Islote de ratón neonato. Modificado de Steiner, D. et al., 2010.

Una desorganización en la arquitectura del islote ha sido observada en múltiples modelos de ratón a consecuencia de alteraciones en la expresión de genes o por condiciones fisiológicas y/o patológicas. En dichos modelos se presentan alteraciones en la secreción de insulina y/o modificaciones en el metabolismo de la glucosa (Gannon, M. et al., 1996; Zhang, C. et al., 2005; Doyle, M.J. et al., 2009). A continuación se muestran dos tablas en las que se exponen diversos ejemplos (Tabla 1 y 2).

Tabla 1. Modelos transgénicos en ratones donde se observa una modificación en la arquitectura y/o fisiología del islote de Langerhans.

Modelo	Morfología pancreática	Referencia
Deleción <i>Foxa2</i> en células beta.	Arquitectura del islote desorganizada y tipos celulares distintos al beta en el centro.	Lantz, K.A. et al., 2004; Sund, N.J. et al. 2001.
<i>Pdx1</i> <sup>-/+</sup> / <i>HNF3<math>\beta</math></i> y <i>Pdx1</i> <sup>-/+</sup> / <i>HNF1<math>\alpha</math></i> <sup>-/+</sup>	Arquitectura del islote anormal posiblemente debida a una disminución en la expresión de la E-cadherina.	Shih, D.Q. et al., 2002.
Inactivación de CTGF.	Tipos celulares entremezclados e incremento en células $\alpha$ .	Crawford, L.A. et al., 2009
Sobreexpresión de <i>HNF6</i> .	Interrupción de la morfogénesis de los islotes, especificación endócrina disfuncional e incremento de tipos celulares periféricos posiblemente debido a modificaciones en <i>Serpina6</i> .	Wilding Crawford, L. et al., 2008.
Knockout N-CAM.	Células $\alpha$ al centro.	Esni, F. et al., 1999; Cirulli, V. et al., 1994.
Knockout <i>Kir6.2</i> y <i>Sur 1</i> .	Cambios en la masa celular y en su distribución, células $\alpha$ en mayor número y localizadas en el centro del islote.	Seino, S. et al., 2000; Marhfour, I. et al., 2009.
Represión de <i>Nkx2.2</i> en la etapa posnatal.	Transcripción reducida de los gens de insulina y GLUT 2 y células $\alpha$ al centro.	Doyle, M.J. et al., 2009.

Expresión persistente de HNF6.	Modificación en la arquitectura del islote y fallo de la célula $\beta$ .	Gannon, M. et al., 1996.
Knockout MafA.	Desarrollo de diabetes mellitus, transcripción reducida de los gens de insulina y GLUT 2 y células $\alpha$ al centro.	Zhang, C. et al., 2005.
Delección LKB1	Modificación en la morfología del islote. Células desorganizadas.	Sun, G. et al., 2010.

Tabla 2. Condiciones fisiológicas o patológicas donde observa una modificación en la arquitectura del islote de Langerhans.

Condición	Morfología pancreática	Referencia
Diabetes mellitus tipo 2.	Incremento de células $\alpha$ al centro del islote.	Rahier, R.M. et al. 1983., Clark, L. et al., 1988.
Embarazo.	Incremento en la proporción de células $\alpha$ .	Kharouta, M., et al. 2009.
Obesidad y resistencia a la insulina.	Incremento en la proporción de células $\alpha$ .	Kharouta, M., et al. 2009.

### **1.5 Biotina**

En décadas pasadas los mecanismos de acción y los efectos a nivel de expresión de genes de las vitaminas liposolubles ha sido muy estudiado (Calberg, C., 1999; Balmer, J. et al. 2002; Christakos, S. et al., 2003). Los ejemplos clásicos son la vitamina A y D, las cuales sirven como precursores de la superfamilia de receptores nucleares y además tienen efectos a nivel sistémico como en el desarrollo fetal, morfogénesis, inmunidad, crecimiento y diferenciación de células epiteliales (Pfahl, M. et al., 1996; Clagett-Dame, M. et al., 2002; Christakos, S. et al., 2003).

Estudios en modelos animales analizando el exceso o la deficiencia de alguna vitamina han sido útiles para investigar el rol de éstas en diversas funciones biológicas. Así mismo ha sido a través de su estudio que se han identificado importantes factores de transcripción, permitiendo así el desarrollo de nuevos

agentes terapéuticos para distintas enfermedades, entre ellas la diabetes (Mukherjee, R., 1997; Liu, Y.L., 2000).

La extensa investigación sobre vitaminas liposolubles ha permitido entender el amplio espectro de acciones biológicas en las que participan. En contraste, el conocimiento que se tiene acerca de las vitaminas hidrosolubles es escaso, sin embargo cada vez son más las evidencias que demuestran sus efectos sobre la expresión de genes (Brandsch, R., 1994; Combs, J., 1994).

La biotina, también llamada B7 o H, es una vitamina hidrosoluble del complejo B con una estructura química que fue elucidada por primera vez en los años 1940's. Consiste en un compuesto bicíclico con un anillo que contiene un grupo ureido (-N-CO-N-) y otro que contiene un azufre del cual se ramifica una cadena lateral de ácido valérico (Figura 6). En la naturaleza existen ocho posibles estereoisómeros y sólo uno de ellos, la D-biotina, es enzimáticamente activo. Su peso es de 244.3 g/mol; es soluble en agua, etanol y álcalis diluidos (Thorne Research, Inc., 2007).

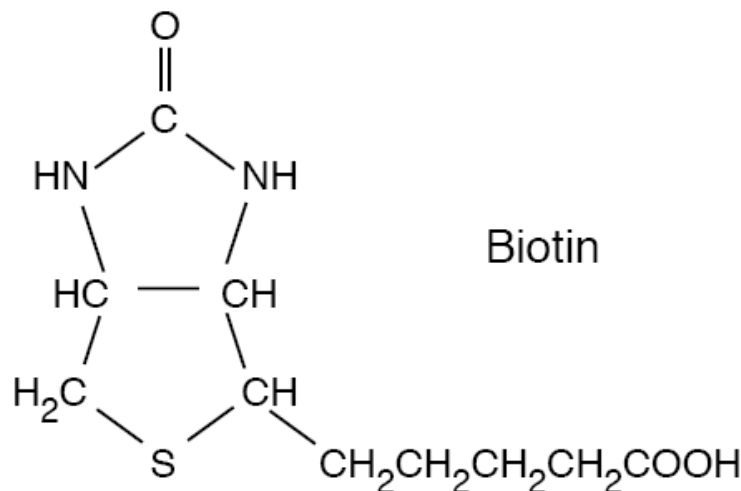


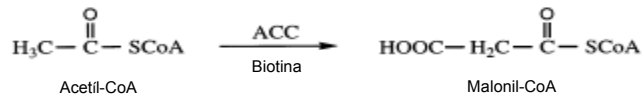
Figura 6. Estructura química de la biotina.

La biotina no puede ser sintetizada por los organismos eucariontes, así es que se hace indispensable su consumo en la dieta con requerimientos que van desde los 75 a los 200 µg diarios. Se encuentra presente en pequeñas

cantidades en gran variedad de alimentos tales como nueces, yema de huevo, hígado, levadura, etc. y generalmente está unida de manera covalente a una lisina, formando así el dímero biotina (Dakshinamurti, K. et al., 1994). Para su absorción se requiere romper este enlace por acción de la biotinidasa pancreática (Hymes, J. et al., 1996) para que, estando de manera libre, sea entonces absorbida por los enterocitos de la porción distal del duodeno y proximal del yeyuno para que posteriormente pase al torrente sanguíneo. La entrada a las células se lleva a cabo por el transportador múltiple de vitaminas dependiente de sodio (SMVT) que reconoce la porción del ácido valérico (Cohen, N. et al., 1982). Este transportador es una proteína de 634 aminoácidos con 12 dominios transmembranales cuyos extremos amino y carboxilo se encuentran hacia el interior de las células. Su papel es el de introducir a la biotina junto con ácido pantoténico y sodio a favor de un gradiente de concentración (Chatterjee, N. et al., 1999).

La función de la biotina más conocida en los organismos eucariontes es la de participar como grupo prostético de las enzimas carboxilasas: acetil-CoA carboxilasa (ACC) tanto en su forma citosólica (ACC1) como en la mitocondrial (ACC2), piruvato carboxilasa (PC), propionil-CoA carboxilasa (PCC) y metilcrotonil-CoA carboxilasa (MCC) (Chapman, A. et al., 1999) (Figura 7), las cuales intervienen en importantes vías metabólicas como la gluconeogénesis, la síntesis de lípidos y el catabolismo de algunos aminoácidos (Achuta, P. et al., 1972).

### Citosol y mitocondria



### Mitocondria

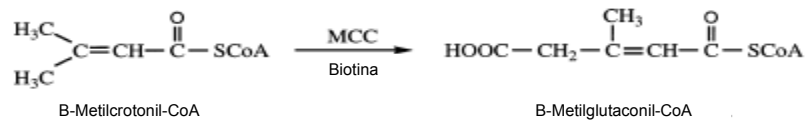
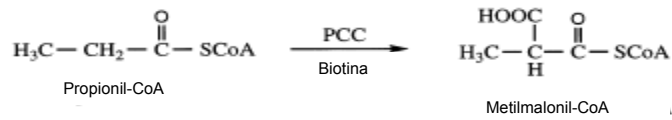
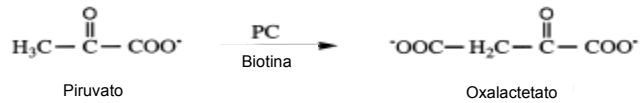


Figura 7. Carboxilasas dependientes de biotina en mamíferos (Zempleni, J. et al., 1999).

Las carboxilasas se sintetizan como apocarboxilasas, es decir, como proteínas sin actividad enzimática. Es hasta que se les une la biotina de manera covalente por acción de la holocarboxilasa sintetasa, cuando se forma una proteína activa u holoenzima (Chapman, A. et al., 1999) (Figura 8). Esta reacción se lleva a cabo en dos etapas: en la primera la biotina se activa al reaccionar con una molécula de ATP formando el intermediario biotinil-5-adenilato. En la segunda etapa el grupo biotinilo se transfiere a la apoenzima formándose un enlace semipeptídico con un residuo de lisina localizada dentro de una secuencia Met-Lys-Met altamente conservada en todas las apocarboxilasas (Lamhonwah, A. et al. 1987).



Figura 8. Ciclo de la biotina en mamíferos

La biotina permanece unida a la carboxilasa hasta que es degradada proteolíticamente en el sistema autofágico lisosomal, liberando así residuos de biotina unida a la lisina (biocitina). Este enlace se rompe por acción de la biotinidasa y de esta manera la biotina puede ser reutilizada en nuevas carboxilasas, o bien, puede ser degradada a otros catabolitos y ser excretada como bisnorbiotina o biotina sulfóxido (Wang, K., 1997)

Desligado al rol de grupo prostético la biotina regula la expresión de genes (Rodríguez-Meléndez, R. et al., 2003; Zemleni, J., 2005). Se tienen reportes de que a nivel transcripcional regula diversos genes como la holocarboxilasa sintetasa (HCS) (Rodríguez-Meléndez, R. et al., 2001; Solórzano-Vargas, S. et al., 2002), ACC, PCC (Solórzano-Vargas, S. et al., 2002), glucocinasa (GK) hepática (Chauhan, J. et al., 1991) y pancreática (Borboni, P. et al., 1996; Romero-Navarro, G. et al., 1999), fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPCK)

hepática (Dakshinamurti, K. et al., 1994), insulina (Romero-Navarro, G. et al., 1999), PDX1 (Yoshikawa, H. et al., 2002), interleucina 2 y su receptor (Yoshikawa, H. et al., 2002; Manthey, K. et al., 2002). Mientras que a nivel post-transcripcional se ha encontrado que la biotina modifica la expresión del receptor de asialoglicoproteínas a través de una vía de fosforilaciones que requieren de GMPc y de la proteína cinasa G (PKG) (Stockert, R. et al., 1990; Stockert, R. et al., 1997; Collins, J. et al., 1999; De la Vega, L. et al., 2000); así mismo, por un mecanismo transcripcional que requiere de la activación de PKG también regula la expresión del receptor de insulina (De la Vega, L. et al., 2000) y la glucocinasa pancreática (Vilches-Flores 2010).

Su efecto sobre la expresión de genes sustenta su acción sobre un amplio repertorio de efectos a nivel sistémico en procesos como el desarrollo (Watanabe, T. et al., 1990; Watanabe, T., 1996); y el metabolismo, especialmente en el de la glucosa (Fernández-Mejía, C., 2005; Dakshinamurti, K., 2005).

### **1.5.1 Biotina en el desarrollo fetal**

Cantidades excesivas de biotina afectan el desarrollo y la reproducción. En insectos, específicamente en mosquitos (*Aedes aegypti*) (Pillai, M. et al., 1969), moscas (*Musca domestica*) (Benschoter, C., 1967) y escarabajos (*Dermestes maculates*) (Cohen, E. et al, 1968) la fertilidad se ve reducida debido al exceso de la vitamina. En ratas la administración aguda durante el embarazo causa reabsorción de los fetos y las placentas (Paul, P. et al., 1975; Paul, P. et al., 1976). Cabe señalar que estos efectos son a concentraciones muy altas.

### **1.5.2 Biotina en el metabolismo de carbohidratos**

Los efectos de la biotina sobre el metabolismo de carbohidratos han sido puestos de manifiesto tanto *in vivo* como *in vitro* en condiciones fisiológicas normales y en el estado diabético. A continuación se describen.

### **1.5.2.1 Efectos de la suplementación de biotina**

Las primeras evidencias que sugirieron que la biotina intervenía en el metabolismo de carbohidratos y que permitieron el descubrimiento de los efectos que tiene sobre la expresión genética fueron reportados por Dakshinamurti y colaboradores (Mistry, S. et al., 1962). Este grupo encontró que las ratas deficientes de biotina presentan curvas de tolerancia a la glucosa significativamente más elevadas que los animales control, y que el contenido de glucógeno hepático y la fosforilación de la glucosa eran menores (Dakshinamurti, K. et al., 1968). Estudios posteriores demostraron que las anomalías en el metabolismo de carbohidratos del modelo experimental con deficiencia se debían a una disminución en la actividad de la GK hepática, la cual es una enzima clave en la captación posprandial de glucosa en el hígado (Dakshinamurti, K. et al., 1970). El mismo grupo encontró que la administración de dosis suprafisiológicas de la vitamina (1 mg/kg de peso) incrementa la actividad de la glucocinasa hepática (Dakshinamurti, K. et al., 1968; Dakshinamurti, K. et al., 1970). Este efecto se observó tanto en condiciones posprandiales, contexto metabólico en el que normalmente la glucocinasa se encuentra aumentada, como en situaciones donde la actividad de la enzima se encuentra disminuida como lo son el ayuno y los momentos posteriores al consumo de una dieta rica en lípidos. La administración de biotina a la dosis ya mencionada también produce un incremento prematuro en la síntesis de la glucocinasa hepática en ratas lactantes, periodo en el que normalmente la enzima no se encuentra presente (Dakshinamurti, K. et al., 1970). Pasados los años y gracias a los avances en las técnicas de biología molecular se hizo evidente que el efecto que tiene la biotina sobre la GK es consecuencia de una modificación en la transcripción del gen (Chauhan, J. et al., 1991).

En ratas preñadas se observó que la administración de altas dosis de la vitamina disminuye la cantidad de glucógeno en útero y placenta, así como la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) en ovario, útero e hígado (Paul, P. et al., 1976).

En cultivos *in vitro* de células también se ha visto que la vitamina tiene efectos sobre la expresión genética. Se ha encontrado que en hepatocitos aislados de



ratas normales la biotina incrementa la actividad de la glucocinasa, evento que es precedido por un aumento en los niveles intracelulares de GMPc (Spence, J. et al., 1984).

También, concentraciones suprafisiológicas de biotina tiene efectos sobre el islote pancreático. Estudios en nuestro laboratorio han encontrado que concentraciones de biotina de 10 a 1000 nM aumentan la actividad de la glucocinasa y la abundancia de ARNm en cultivos de islotes pancreáticos aislados de ratas normales, efecto que también se observa en la línea celular pancreática RIN1046-38 (Borboni, P. et al., 1996). Nuestros estudios (Romero-Navarro, G. et al., 1999) y de otros autores (Furukawa, Y. et al., 1995) también encontraron que islotes cultivados en presencia de biotina aumentan la secreción de la insulina. También se ha reportado que la biotina incrementa la expresión de PDX-1, el cual es un factor transcripcional determinante para el desarrollo pancreático y para la expresión de genes que participan en funciones fundamentales en el islote de Langerhans (Yoshikawa, H. et al., 2002).

Otros estudios hechos por nuestro grupo de trabajo (no publicados) en ratones, los cuales dan origen a este proyecto, han demostrado que la administración de una dieta durante ocho semanas conteniendo dosis farmacológicas de la vitamina incrementa la expresión de RNAm de varios factores de transcripción que participan en la expresión de la insulina y la secreción de ésta, tales como Foxa2, Pdx1 y Hnf4 $\alpha$ ; también se observaron incrementos en el ARNm de genes como glucocinasa, Cacna1d, ACC, glucagon y la misma insulina. En el análisis de la secreción de esta hormona hecho en islotes aislados de ratones con dieta rica en biotina se encontró, que comparados con los ratones de la dieta control, la secreción de insulina se ve aumentada significativamente. También se hallaron modificaciones en la arquitectura de los islotes de ratones que recibieron la dieta suplementada con la vitamina, los cuales muestran un alto porcentaje de islotes con células  $\alpha$  al centro (40.6%). Estudios morfológicos revelan que éstos también presentan un mayor tamaño (Datos no publicados).

### **1.5.2.3 Efectos de biotina en modelos diabéticos**

Se tienen reportes de que la biotina en dosis farmacológicas aminora la hiperglucemia y es actualmente usada en el tratamiento de la enfermedad (Albarracin, C. et al., 2005; Singer, G. et al., 2006). Estudios clínicos han encontrado que pacientes con diabetes tipo 1 tratados durante una semana con biotina sin recibir insulina exógena disminuyeron sus concentraciones de glucosa en ayuno (Coggeshal, J. et al., 1985). En otro estudio con pacientes diabéticos tipo 2 se encontró que la administración oral de 9 mg de biotina diarios durante un mes disminuyó las concentraciones de glucosa en ayuno, así como de piruvato y lactato (Maebashi, M. et al., 1993).

En modelos animales también se ha reportado que la biotina disminuye la hiperglucemia. En ratones KK y ratas OLEFT se observó una disminución de la hiperglucemia y en la curva de tolerancia a la glucosa en respuesta al tratamiento con dosis farmacológicas de la vitamina (Reddi, A. et al., 1988; Zhang, J. et al., 1996). Estudios en ratas con diabetes inducida por alloxan o estreptozotocina encontraron que la biotina aumenta significativamente la actividad de la glucocinasa hepática, así mismo se aumenta la actividad de las enzimas glucolíticas fosfofructocinasa (PFK) y piruvato cinasa (PK) (Reddi, A. et al., 1988; Zhang, H. et al., 1996). En otros estudios en ratas también con diabetes inducida la biotina disminuye en más del 50% la transcripción de la PEPCK, enzima limitante en la gluconeogénesis (Zhang, H. et al., 1997).

## **2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Estudios previamente efectuados por el grupo de trabajo con quien se realizó esta tesis, han mostrado que la administración por ocho semanas de una dieta suplementada con biotina tiene diversos efectos sobre la estructura y función del islote pancreático. Dado que la ingesta de la vitamina se inicia en la etapa posterior al destete, y éste es un periodo crítico para el páncreas debido al cambio del tipo de alimentación, es posible que los efectos que produce la dieta conteniendo cantidades suprafisiológicas de biotina, observados en el modelo a las 8 semanas de edad, se presenten desde este periodo. Por otro lado y debido a que los estudios existentes sobre los cambios que acontecen durante la ventana crítica posnatal pancreática se han efectuado en ratas, resulta importante definir las modificaciones que se producen en ratones en la etapa de post-ablactación. Por esa razón en este trabajo también analizamos las diferencias en el metabolismo de carbohidratos y la morfología y fisiología pancreáticas entre el día del destete (día 21) y el día 8 de la dieta, utilizando para ello el alimento comúnmente usado en los bioterios.

### **2.1 Hipótesis**

La ventana crítica es un periodo en el que ocurren cambios estructurales y funcionales importantes en el desarrollo normal del páncreas.

Dosis suprafisiológicas de biotina administradas en el periodo posterior al destete producen cambios en la morfología y fisiología del islote.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivos generales**

- a) Caracterizar el metabolismo de carbohidratos y la morfología y fisiología pancreáticas de ratones durante la ventana crítica posnatal en la semana posterior al destete.
- b) Analizar los efectos de la biotina en el metabolismo de carbohidratos y en la morfología y fisiología pancreáticas durante ocho días post-ablactación.

#### **3.2 Objetivos particulares**

En ratones alimentados con la dieta comúnmente usada en los bioterios:

- a) Caracterizar el metabolismo de carbohidratos durante el periodo que corresponde a la semana posterior al destete.
- b) Realizar estudios morfológicos y fisiológicos del páncreas durante los días 21 al 28 con la finalidad de llevar a cabo la caracterización de esta etapa.

En ratones alimentados con una dieta con concentraciones suprafisiológicas de biotina:

- c) Caracterizar el metabolismo de carbohidratos durante el periodo que corresponde a la semana posterior al destete.
- d) Realizar estudios morfológicos y fisiológicos del páncreas durante los días 21 al 28 con la finalidad de llevar a cabo la caracterización de esta etapa.
- e) Determinar cuál es el efecto de la biotina durante la primera semana de alimentación.

## **4 MATERIAL Y MÉTODOS**

### **4.1 Animales de experimentación**

Se usaron ratones machos de la cepa Balb/cAnN Hsd comprados en la compañía Harlan, México. En la tercera semana de edad habiendo sido recién destetados se dividieron en tres grupos experimentales que fueron alimentados durante un periodo de ocho días con tres dietas distintas: una que es la comúnmente utilizada en los bioterios (2018S Teklad Global 18% Protein Rodent Maintenance Diet, Harlan Teklad) para el grupo que se denominará en esta tesis como control bioterio, otra con suficiencia de biotina (TD-01362, Harlan Teklad) (16.4  $\mu\text{mol}$  de biotina/kg alimento) para el grupo control (denominado grupo suficiente) y otra con altas dosis de la vitamina (TD-01364, Harlan Teklad) (100 mg de biotina/kg de alimento) para el grupo de suplementación.

Los ratones durante todas las etapas fueron manejados de acuerdo con los procedimientos estándar establecidos por el Comité de Ética para la Experimentación del Instituto de Investigaciones Biomédicas y se mantuvieron en condiciones controladas habituales en los bioterios. El peso corporal y el consumo de alimento fueron monitoreados diariamente con la ayuda de una balanza (Ohaus, Alemania). Al finalizar el tratamiento los animales se dejaron en ayuno 16 horas para después ser sometidos a anestesia inhalada con Sevorane (Laboratorios Abbott, México). Se obtuvieron muestras de sangre y se extrajo el páncreas y el tejido adiposo.

### **4.2 Determinación de glucosa sanguínea**

La concentración de glucosa en sangre proveniente de la vena de la cola fue determinada usando un glucómetro (Medisense Optium Xceed, Laboratorios Abbot, México) y tiras reactivas para este aparato (Medisense Optium Xceed, Laboratorios Abbot, México).

### **4.3 Curvas de tolerancia a la insulina**

Las curvas de tolerancia a la insulina fueron llevadas a cabo alrededor de las 10:30 AM en ratones alimentados ad libitum. Las determinaciones de glucosa en sangre proveniente de la vena de la cola fueron hechas a los 0, 15, 30, 60 y 90 minutos después de una inyección intraperitoneal de 1 IU/kg de insulina regular humana (Humulin, Laboratorios Eli Lilly, USA) usando un glucómetro ((Medisense Optium Xceed, Laboratorios Abbot, México) y tiras reactivas para este aparato (Medisense Optium Xceed, Laboratorios Abbot, México).

#### **4.4 Curvas de tolerancia a la glucosa**

Las curvas de tolerancia a la glucosa se efectuaron alrededor de las 10:30 AM en ratones ayunados 16 horas antes. Se obtuvo una muestra de sangre al tiempo 0 para determinar la glucosa inicial, posteriormente se realizó una inyección intraperitoneal de una solución de glucosa al 10 % a una dosis de 2 g/kg de peso. Las determinaciones de glucosa en sangre proveniente de la vena de la cola fueron hechas a los 15, 30, 60 y 120 minutos después de la inyección usando un glucómetro ((Medisense Optium Xceed, Laboratorios Abbot, México) y tiras reactivas para este aparato (Medisense Optium Xceed, Laboratorios Abbot, México).

#### **4.5 Determinación de insulina y glucagon en suero**

Para la determinación de las concentraciones de insulina y de glucagon en suero se tomaron muestras de sangre proveniente de la vena de la cola de ratones ayunados 16 horas antes del experimento, la cual fue colectada en tubos Eppendorf de 2.0 mL, se mezcló con heparina como anticoagulante (Inhepar, Farmacéutica Mexicana) y con inhibidor de proteasas (Complete, Roche Diagnostics, Suiza). Posteriormente las muestras fueron centrifugadas en dos ocasiones a 10000 rpm a 4 °C por 10 minutos para separar el suero. En éste se llevaron a cabo inmunoensayos para cada una de las hormonas usando un kit para ELISA (ALPCO Diagnostics). Las absorbancias fueron medidas usando un lector de placa (Labsystems, España).

#### **4.6 Análisis histológicos de páncreas**

Páncreas deshidratados con un gradiente de xilol-álcohol previamente fijados en paraformaldehído al 4% disuelto en buffer de sales durante 24 horas a 4 °C y embebidos en parafina (Paraplast) a 58-60 °C se colocaron dentro de moldes de plástico. Los tejidos fueron cortados con 5 µm de grosor usando un mircrotomo y montados en portaobjetos de vidrio previamente recubiertos con Poly-L-lysina. Posteriormente los cortes se desparafinaron e rehidrataron con un gradiente de xilol-álcohol, se lavaron con buffer de fosfatos e incubaron con una solución de PBS, tritón al 3% y suero normal de cabra al 1% durante media hora a temperatura ambiente. Después se incubaron toda la noche con un anticuerpo para insulina montado en coballo (ICN) a una dilución 1:5000. Para la detección de glucagon los cortes se incubaron por tres horas con un anticuerpo montado en ratón (Sigma) a una dilución 1:4000. Para la detección de Glut2 el tejido se incubó el mismo tiempo con un anticuerpo montado en conejo (Millipore) a una dilución 1:1000. Posteriormente se procedió a hacer las incubaciones con los respectivos anticuerpos secundarios, los usados fueron los siguientes: anti-coballo conjugado con FITC (Jackson) a una dilución 1:200, anti-ratón conjugado con CY3 (Jackson) a una dilución 1:800 y anti-conejo acoplado con CY3 (Jackson) a una dilución 1:800. Después de las incubaciones los cortes fueron lavados en PBS y cubiertos con medio de montaje y un cubreobjetos previamente lavado en alcohol absoluto. Las imágenes de los islotes pancreáticos fueron obtenidas usando Laser Scanning System LSM 510 y editadas usando el programa Metamorph.

#### **4.7 Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico se usó el programa Statview V.4.5 (Abacus Concepts). Todos los datos presentados corresponden al promedio  $\pm$  error estándar. La significancia estadística fue evaluada por una prueba de ANOVA de dos vías. Los valores de *P* menores a 0.05 son considerados como estadísticamente significativos.

## 5 RESULTADOS

A continuación se muestran los hallazgos realizados en cada uno de los rubros analizados. Primero se expone lo referente a la descripción de la ventana crítica postnatal pancreática, trabajo hecho en animales alimentados con la dieta que reciben usualmente en el bioterio los ratones (2018S Teklad Global 18% Protein Rodent Maintenance Diet, Harlan Teklad). Posteriormente se presentan los efectos que la biotina tuvo en el metabolismo de carbohidratos y la morfología y fisiología pancreáticas.

### 5.1 Caracterización del metabolismo de carbohidratos y la morfología y fisiología pancreáticas de ratones durante la ventana crítica postnatal

#### 5.1.1 Peso corporal

El peso corporal lo tomamos como un indicador del desarrollo y el estado de salud de los animales, por lo que lo monitoreamos a lo largo del experimento. A continuación se muestra una curva de crecimiento que representa, en porcentaje, el peso que fueron aumentando a lo largo de los días (Figura 9). En esta se observa que en la semana crítica postnatal los ratones aumentan alrededor de un 40%, lo que equivale a 5.1 g. Al segundo día se observó una ligera baja en el peso corporal.

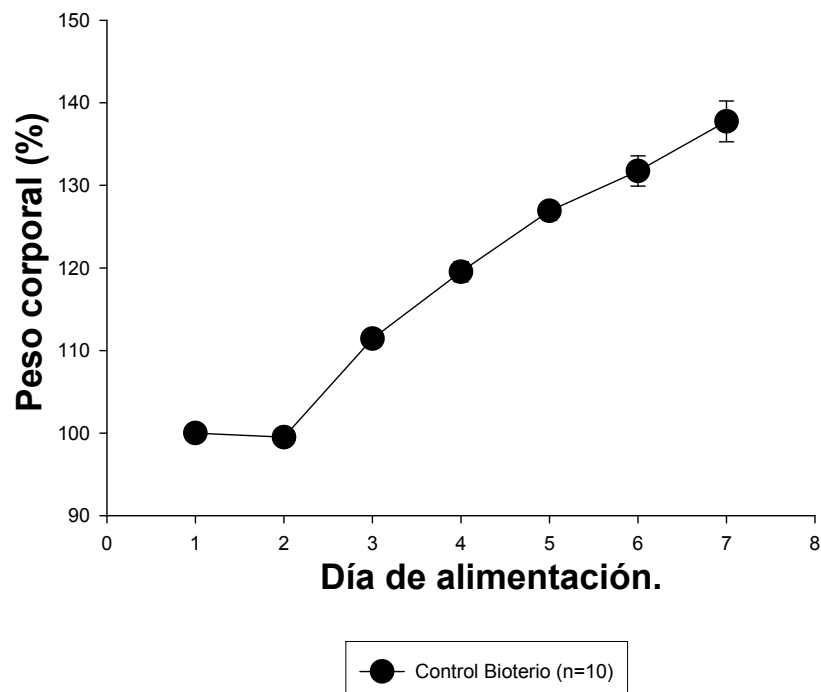




Figura 9. Curva de crecimiento que muestra el aumento de peso en porcentaje del grupo control bioterio a lo largo de la semana de alimentación.

### **5.1.2 Consumo de alimento**

El segundo paso fue monitorear el consumo de alimento para conocer las variaciones que se presentaban a lo largo de la semana y sobre todo, para averiguar si la baja en el peso corporal que se observa en el segundo día se debía a un decremento en la ingesta de comida. En la siguiente figura (10) se esquematiza el consumo de alimento por ratón ajustado al peso corporal. Se puede observar que dicho parámetro se ve en aumento desde el primer hasta el tercer día post-ablactación, con lo cual se descarta que la ligera baja de peso presentada sea ocasionada por una menor ingesta de alimento. Cabe señalar que entre el día 21 y el día 28 postnatal los requerimientos de alimento aumentan en promedio 0.46 g / g de ratón.

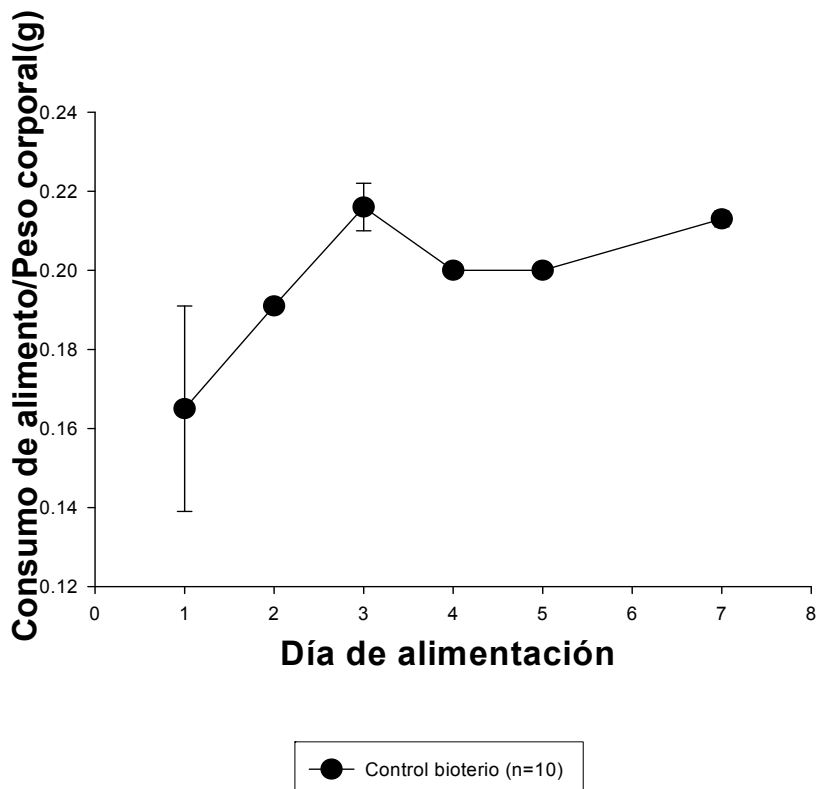


Figura 10. Gráfica que muestra el consumo de alimento promedio por ratón ajustado al peso corporal a lo largo de los siete días de alimentación.

### **5.1.3 Peso del páncreas**

Dado que los animales se encuentran en un periodo crítico de maduración y se espera que el páncreas esté aún en desarrollo, evaluamos el peso de este tejido a los días postnatales 21 y 28. En la siguiente gráfica (Figura 11) se muestra el peso neto del órgano al comenzar y al finalizar el experimento, el cual incrementó 43% con respecto a su peso inicial.

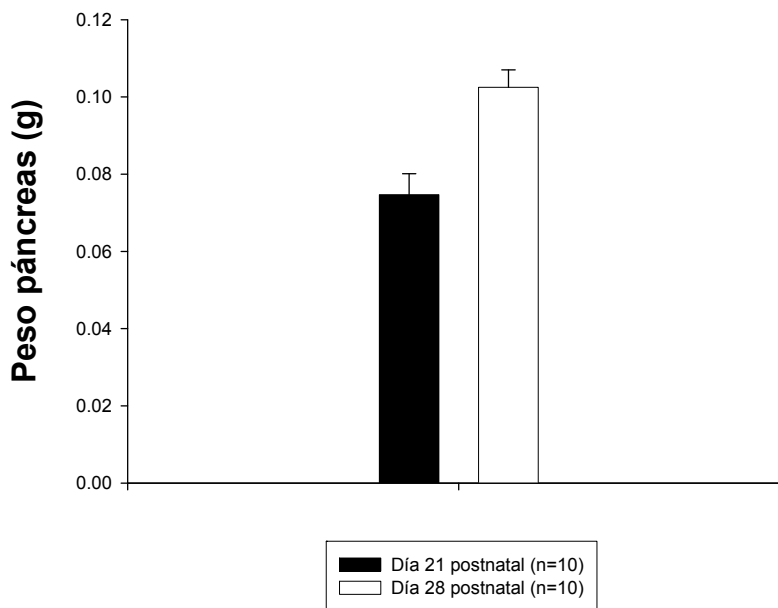


Figura 11. Incremento en el peso del páncreas en la semana post-ablactación.

Otro aspecto importante fue determinar si el incremento en el peso del órgano se relaciona con el peso corporal del organismo. Con este fin se hizo un estudio de regresión incluyendo a las dos variables mencionadas (Figuras 12 y 13). Los resultados revelaron que al día 21 el peso del órgano es independiente al peso corporal, mientras que al día 28 las dos variables están correlacionadas de manera lineal.

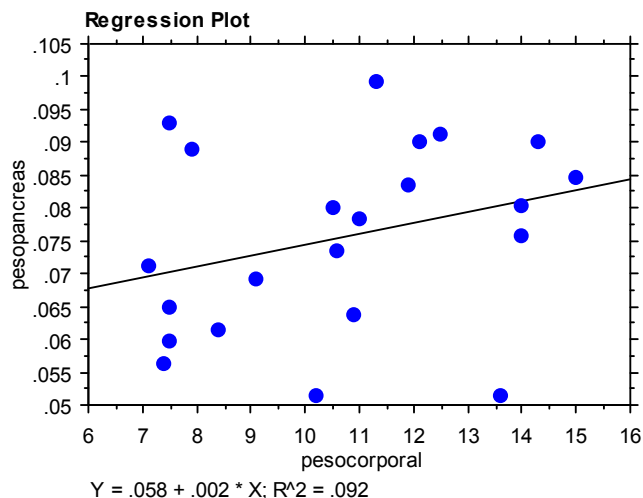


Figura 12. Regresión que muestra la relación existente entre las variables peso corporal y peso del páncreas al día 21 postnatal (n=22).

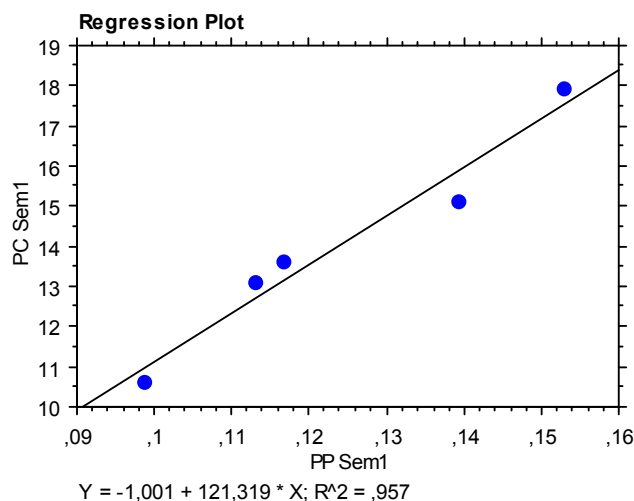


Figura 13. Regresión que muestra la relación existente entre las variables peso corporal y peso del páncreas al día 28 postnatal (n=5).

#### **5.1.4 Peso del tejido adiposo**

Dado que el cambio de alimentación podría modificar las reservas de triglicéridos al pasar de una dieta rica en grasas a una dieta rica en carbohidratos, consideramos que podría haber cambios en el tejido adiposo que es el principal reservorio de grasa en el organismo. Por dicha razón se decidió monitorear su el peso al inicio y al final del experimento. Se observó que dicha variable, ajustada al peso corporal, tiene una disminución

estadísticamente significativa que corresponde a un decremento del 38.8% con respecto al día postnatal 21(Figura 14).

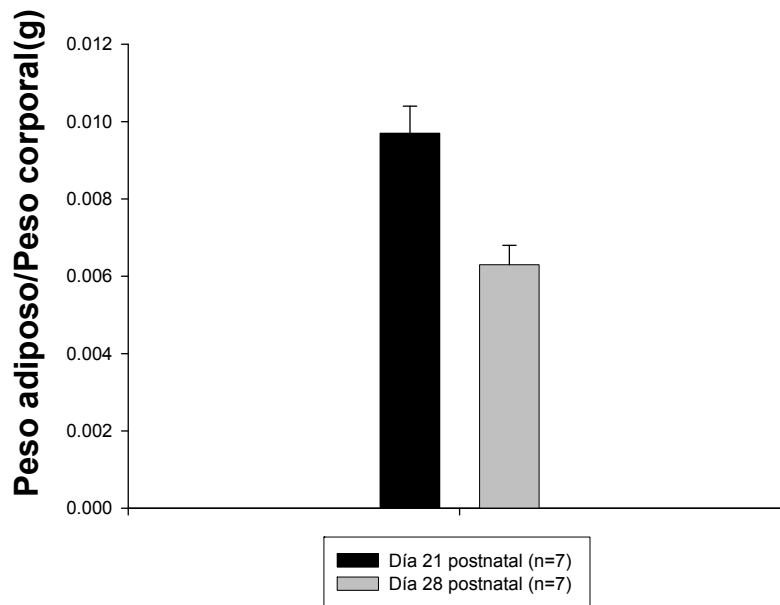


Figura 14. Peso de tejido adiposo ajustado al peso corporal a los días 21 y 28 postnatal.

### **5.1.5 Glucosa sanguínea en ayuno**

Los niveles de glucosa en sangre fueron monitoreados en un estado de ayuno de 16 horas. Se observó que al día postnatal 21 la glucosa promedio es de 111.09 mg/dl, lo que significa que hay una hiperglucemia moderada la cual desaparece al día 28, siendo la glucosa promedio en esta etapa de 77.53 mg/dl. Cabe señalar que estos niveles ya se asemejan a los manejados por un ratón adulto (Figura 15).

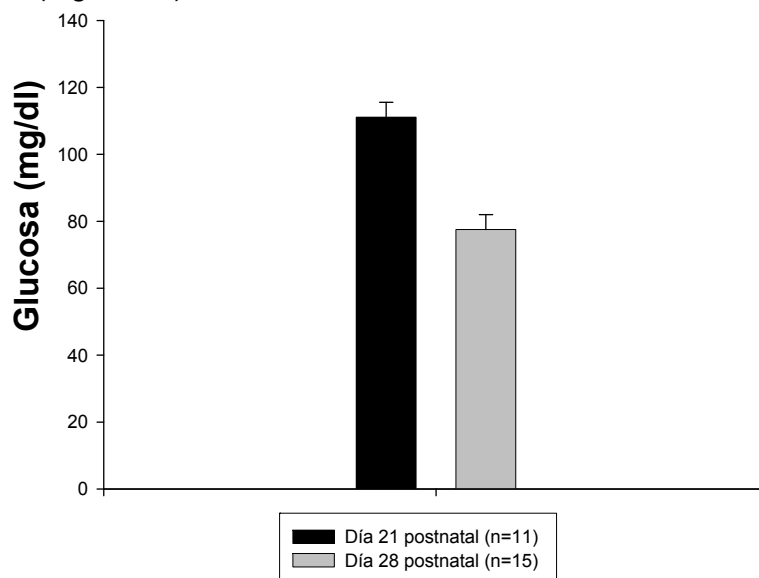


Figura 15. Niveles de glucosa promedio en ayuno a los días 21 y 28 postnatal.

### **5.1.6 Glucosa sanguínea posprandial**

También se analizaron las concentraciones de glucosa en ratones alimentados ad libitum. Los resultados no mostraron diferencias significativas en los concentraciones de glucosa posprandial entre el día 21 y el 28 (Figura 16), siendo en promedio de 150 mg/dl.

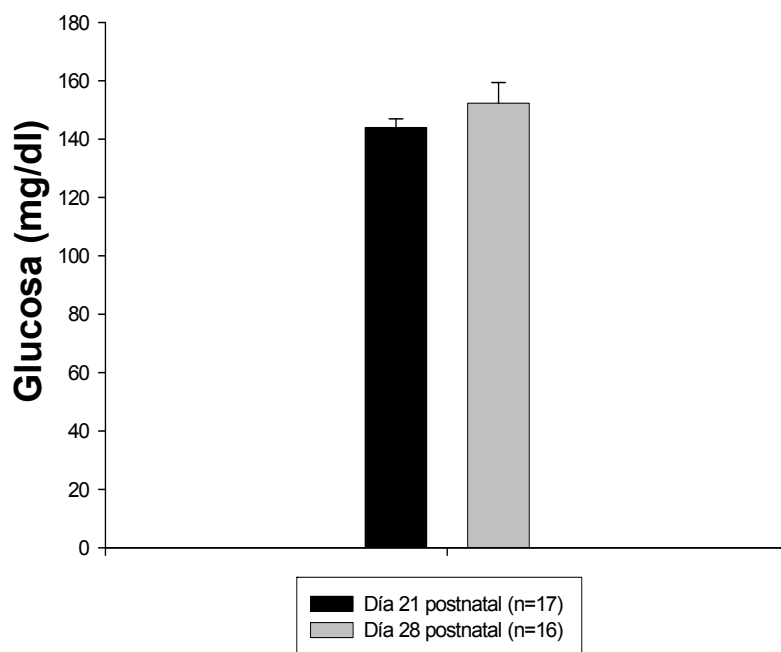


Figura 16. Niveles de glucosa promedio en los días 21 y 28 postnatal en ratones alimentados ad libitum.

### **5.1.7 Curva de tolerancia a la glucosa**

Para analizar la capacidad de regular la glucemia se realizó una curva de tolerancia en los ratones a los 21 y 28 días de nacimiento. En la siguiente gráfica se muestran los cambios de los niveles de glucosa expresada en porcentaje con respecto a las concentraciones al tiempo cero. Los resultados revelan que las curvas de tolerancia a la glucosa en las dos etapas es muy similar, exceptuando en el tiempo 60, donde el grupo de ratones de 21 días de nacidos presenta una glucosa promedio menor comparada con los ratones de 28 días (Figura 17).

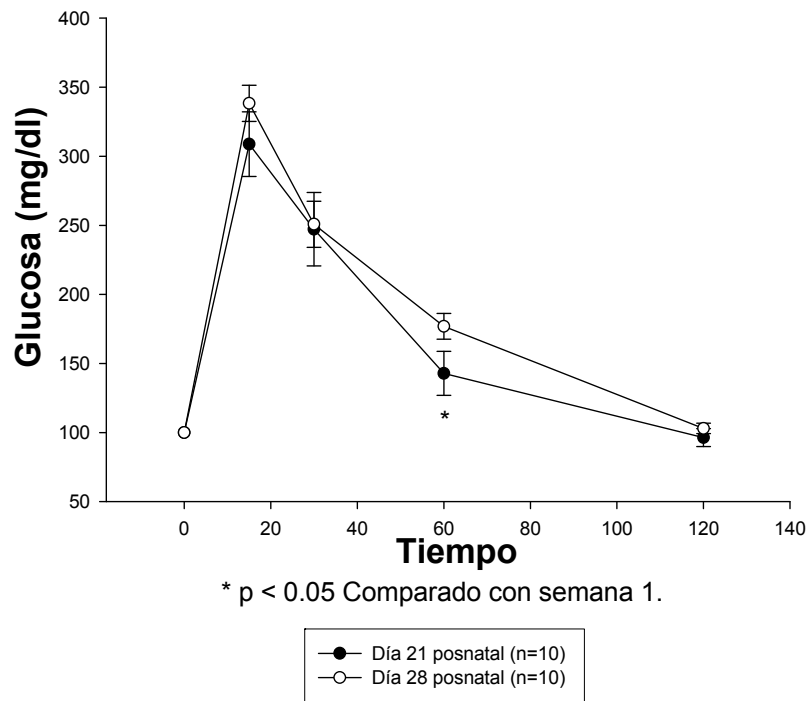


Figura 17. Curva de tolerancia a la glucosa presentada en porcentaje a los tiempos 0, 15, 30, 60 y 120 minutos en los días 21 y 28 posnatal.

### **5.1.8 Curva de resistencia a la insulina**

Dado que existen reportes de una insensibilidad a la insulina durante la ventana crítica posnatal, se realizó una curva de resistencia al finalizar la semana post-ablactación para de esta manera averiguar si la acción biológica de la hormona al final de esta etapa es similar a la de un animal adulto. En la figura 18 se muestra, en porcentaje, los cambios en los niveles de glucosa a los diferentes tiempos. Se observa que en el minuto 15, posterior a la inyección intraperitoneal de insulina, hay una baja del 40% en la concentración de glucosa, disminución que se mantiene al tiempo 30 para ir desapareciendo al minuto 60. Se regresa a los niveles basales al minuto 90. (Figura 18).

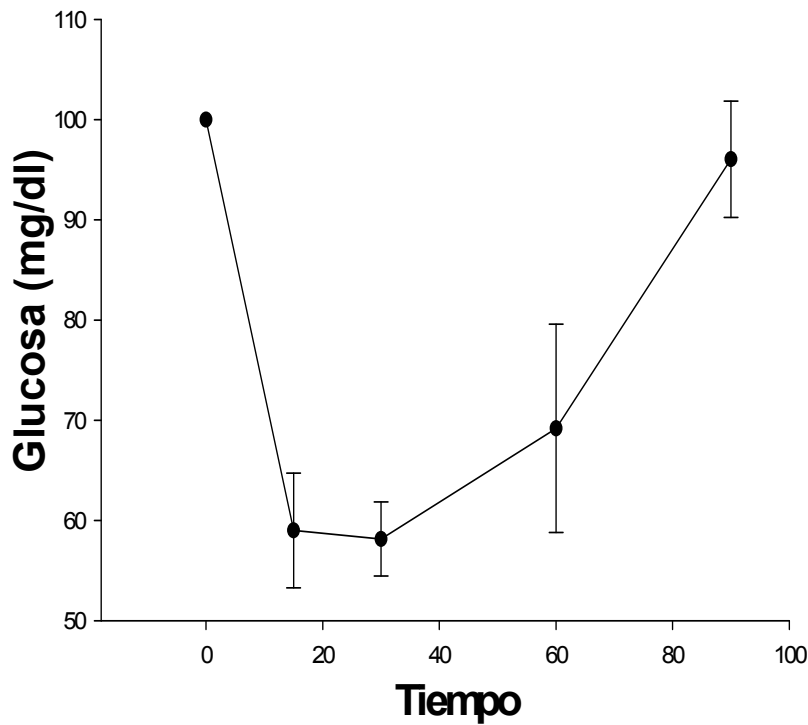


Figura 18. Curva de tolerancia a la insulina presentada en porcentaje a los tiempos 0, 15, 30, 60 y 90 minutos al día postnatal 28 (n=10).

### **5.1.9 Insulina en suero**

Para profundizar en la fisiología pancreática se hicieron experimentos que nos permitieron conocer los niveles en sangre de las hormonas secretadas por este órgano. La primera analizada fue la insulina, observándose que al día 21 se presenta una ligera hiperinsulinemia siendo el promedio de la concentración de ésta de 0.764 ng/ml. Al día 28 postnatal la hormona disminuye a valores de 0.273 ng/ml, lo que corresponde a una reducción del 64.26% con respecto a los valores iniciales (Figura 19).

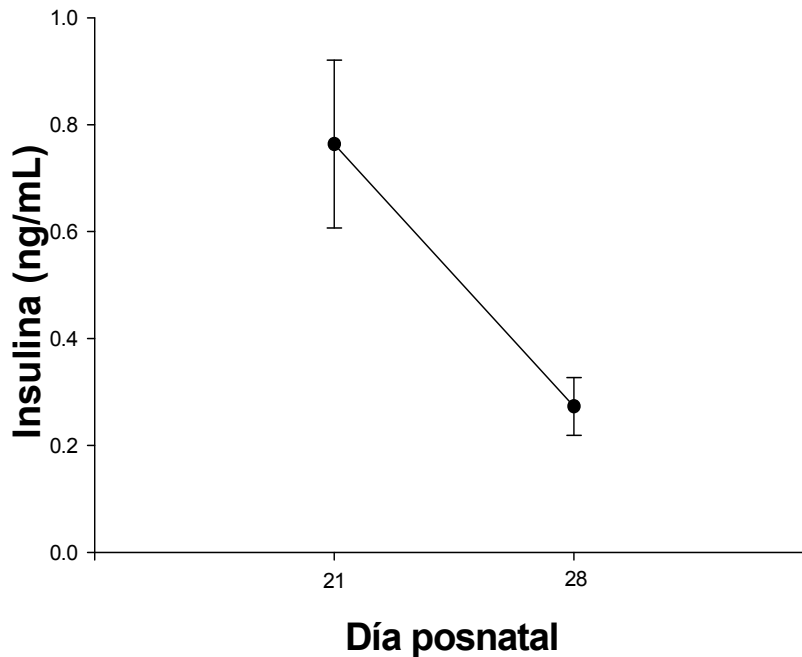


Figura 18. Niveles de insulina en suero al día 21 (n=4) y al día 28 postnatal (n=6).

### **5.1.10 Glucagon en suero**

El glucagon también fue monitoreado dado su rol central en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa. Se encontró que de manera similar al comportamiento de la insulina, en este periodo existe una reducción en los niveles séricos de la hormona. Al día 21 el promedio de la concentración del glucagon es de 395.459 ng/ml mientras que al día 28 los niveles bajan a 189.297 ng/ml, lo que corresponde a una disminución del 47.86% (Figura 19).

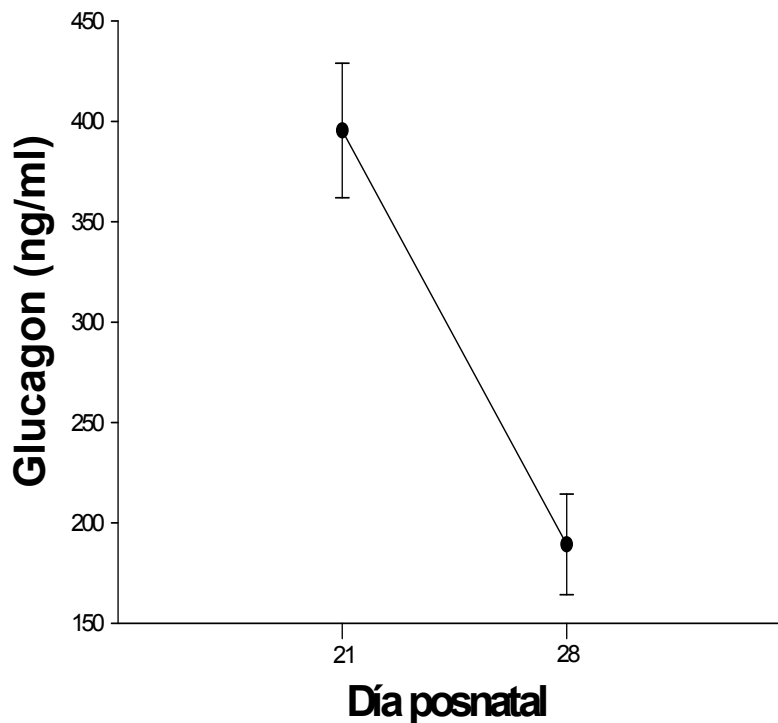


Figura 19. Niveles de glucagon en suero al día 21(n=5) y al día 28 postnatal (n=5).

### **5.1.11 Morfología pancreática**

Para el análisis morfológico se hicieron cortes histológicos de cada uno de los páncreas y se evaluaron en ellos diferentes parámetros. Las variables que se tomaron en cuenta fueron: número y tamaño de los islotes, número de éstos en vías de formación, porcentaje total de islotes con células  $\alpha$  al centro y patrón de expresión de Glut 2 en la célula  $\beta$  pancreática.

#### **5.1.11.1 Número de islotes**



El promedio del total de islotes presentes en cada corte de tejido pancreático se obtuvo realizando un conteo tomando en cuenta únicamente a los islotes ya totalmente formados, es decir, aquellos que cuentan con una estructura y morfología bien definidas así como con un número suficiente de células (>20). Los resultados obtenidos revelaron que tanto al día 21 como al día 28 el número de islotes es el mismo (Tabla 3).

Tabla 3. Promedio de islotes al día 21 (n=4) y al día 28 postnatal (n=4).

	P21	P28
Número de islotes	9.6±1.04	8.5±3.51

### **5.1.11.2 Tamaño de los islotes**

La observación realizada sobre el tamaño de los islotes de Langerhans se hizo de manera cualitativa clasificándolos en pequeños, medianos, grandes y muy grandes. A diferencia de lo encontrado en el día 21 postnatal donde presentan tamaño mediano, al día 28 se observó un aumento de la masa en el 25% de los islotes pancreáticos (Tabla 4 y figura 20).

Tabla 4. Tamaño promedio de los islotes al día 21 (n=4) y al día 28 postnatal(n=4).

	P21	P28
Tamaño de los islotes	Medianos (100%).	Medianos (75%) y grandes (25%).

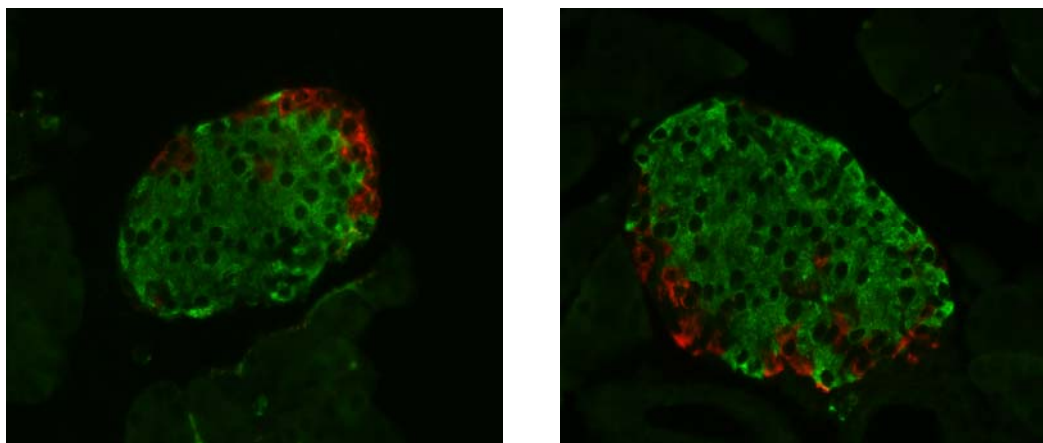


Figura 20. A) Islote representativo del día 21 postnatal. B) Islote representativo del día 28 postnatal.

### **5.1.11.3 Número de islotes en vías de formación**

Al analizar cada uno de los páncreas nos percatamos de que no todos los islotes estaban perfectamente formados, por lo que se realizó el conteo de cuántos eran los islotes que aún no contaban con un número suficiente de células (<20) ni con una estructura y morfología bien definidas, a los cuales nombramos islotes en vías de formación. Encontramos que al día posnatal 21 hay un número mayor de islotes en vías de formación comparado con los presentes al día 28 (Tabla 5 y figura 21).

Tabla 5. Número promedio de islotes en vías de formación al día 21 (n=4) y al día 28 postnatal (n=4).

	<b>P21</b>	<b>P28</b>
Islotes en vías de formación.	11±2.64	6.66±1.15

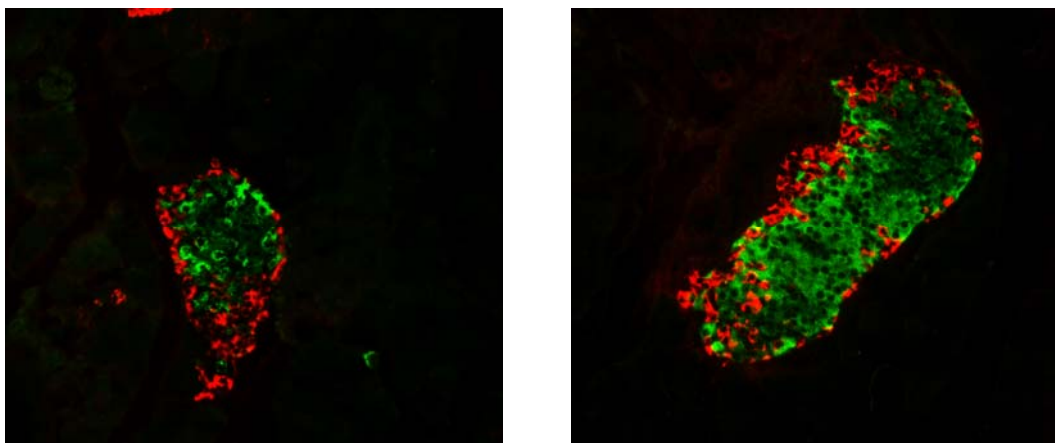


Figura 21. A) Islotes representativos del día postnatal 21 en vías de formación.

### **5.1.11.4 Expresión de Glut2**

Como un marcador de maduración analizamos la expresión del transportador de glucosa Glut2 a los días 21 y 28 postnatales. Lo que se tomó en cuenta fue su localización y lo que se obtuvo fue el porcentaje de islotes que lo expresan en el citoplasma y el porcentaje que lo expresan en la membrana plasmática. Se observó que al día 21 los islotes tienden a presentarlo más en la membrana que en el citoplasma (Tabla 6 y figura 22).

Tabla 6. Patrón de expresión de Glut2 al día 21 (n=4) y al 28 postnatal (n=4).

	P21	P21
Patrón de expresión de Glut2.	Citoplasma (50%) y membrana (50%).	Citoplasma (25%) y membrana (75%).

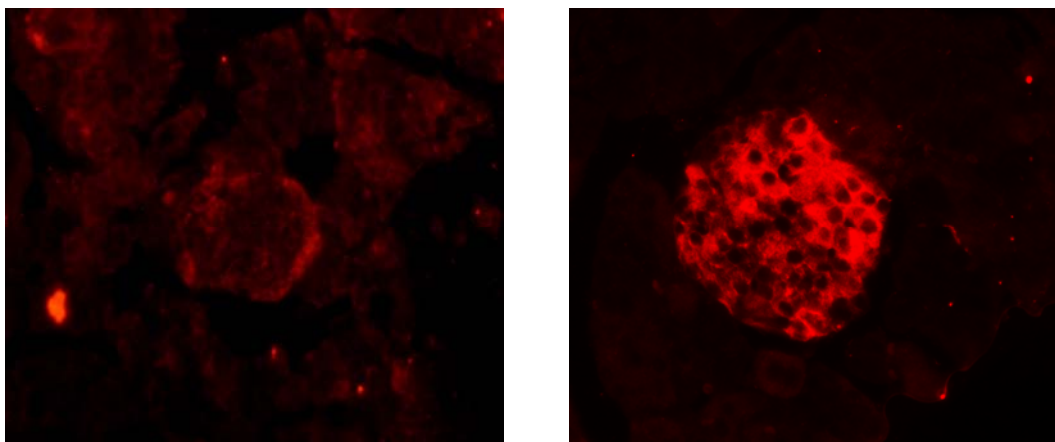


Figura 22. A) Islote representativo del día 21 postnatal (con Glut2 en el citoplasma). B) Islote representativo del día 28 postnatal (con Glut2 en el citoplasma y en la membrana ).

#### **5.1.11.5 Islotes con células $\alpha$ al centro**

Los islotes de Langerhans presentan una citoarquitectura bien definida en donde, de manera general, la mayor parte de células  $\alpha$  se encuentran distribuidas en la periferia y algunas en la en la parte central entremezcladas con las células  $\beta$ . Decidimos analizar qué porcentaje presentan dicha morfología considerando un islote con células  $\alpha$  al centro cuando éstas se encuentran más allá de la tercera capa de células (contando de afuera hacia adentro) en un islote plenamente formado. Se observó que tanto al día 21 como al 28 se encuentra un pequeño porcentaje de islotes con células  $\alpha$  al centro, sin embargo el porcentaje es menor al que se observa en los islotes de los ratones adultos (30-40% en adulto vs. 2.6-4 % en la primera semana post-ablactación) (Tabla 7 y figura 23).

Tabla 7. Porcentaje de islotes con células  $\alpha$  al centro al día 21 (n=4) y al día 28 postnatal (n=4).

	P21	P28
Islotes con células $\alpha$ al centro.	4%	2.6%

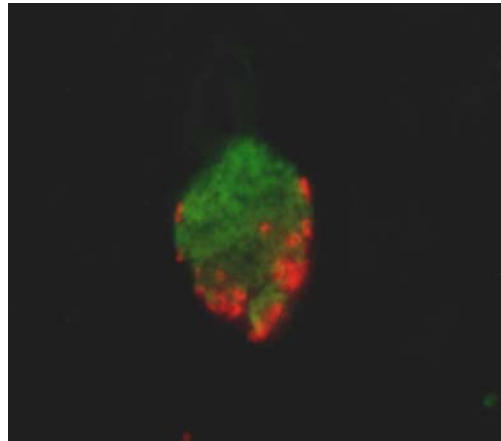


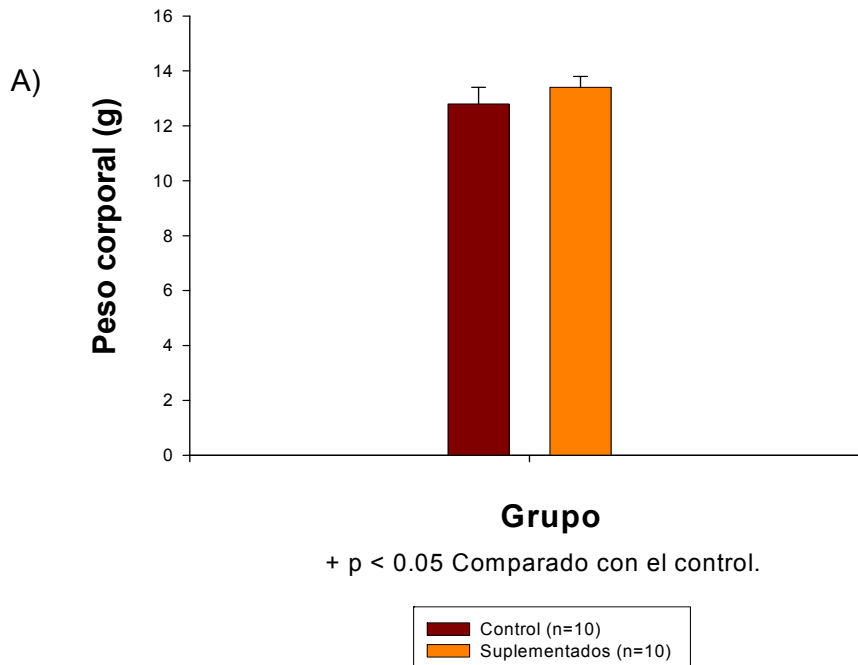
Figura 23. Islote representativo de la semana posterior al destete con células  $\alpha$  al centro.

## **5.2 Efectos de la biotina en el metabolismo de carbohidratos y en la morfología y fisiología pancreáticas durante la ventana crítica postnatal.**

En otra serie de experimentos comparamos los efectos producidos entre una dieta conteniendo las cantidades suficientes de biotina para suplir los requerimientos diarios (1.76 mg/kg dieta), contra los efectos de esta dieta adicionada con cantidades de biotina 55 veces mayores (97.7 mg/kg), las cuales se denominan dieta suficiente y dieta suplementada, respectivamente.

### **5.2.1 Peso corporal**

El peso corporal al final del experimento fue monitoreado en ratones alimentados ad libitum (panel A) y en animales con 16 horas de ayuno (panel B). Los resultados indican que no hubo diferencias entre los grupos. (Figura 24).



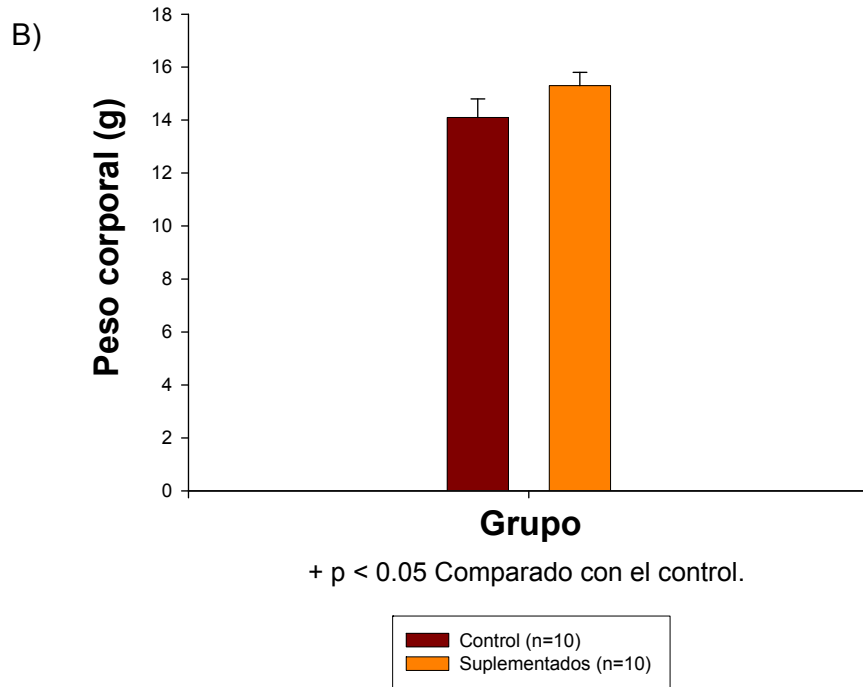


Figura 24. Peso corporal final promedio. A) En condiciones de ayuno. B) En condiciones postprandiales.

### 5.2.2 Consumo de alimento

El consumo de alimento se monitoreó durante los días de tratamiento como un indicativo del estado nutricional y de salud. En la siguiente gráfica se muestra el consumo promedio ajustado al peso corporal a lo largo de la semana de alimentación. No se observan cambios significativos entre los grupos (Figura 26).

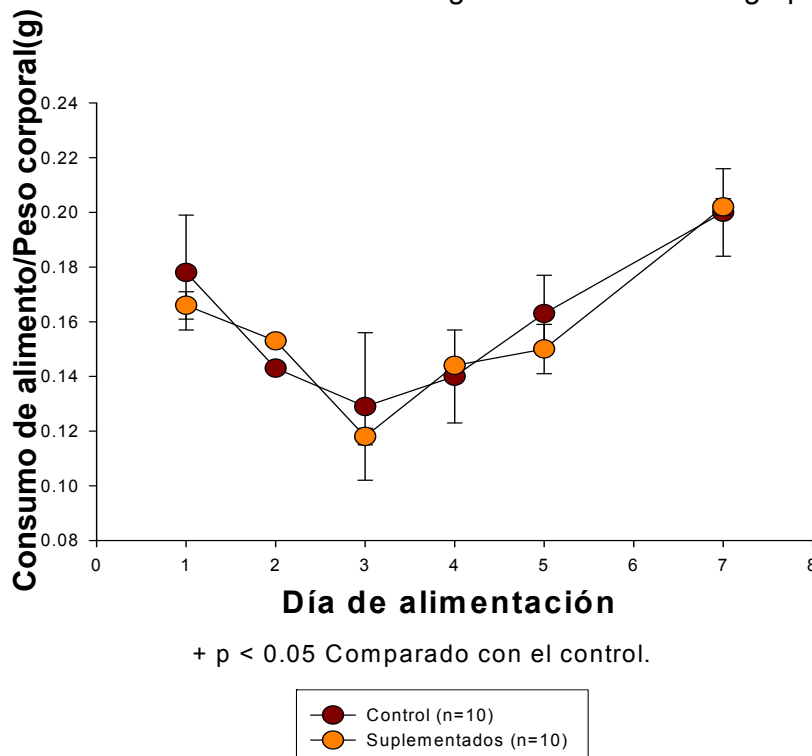


Figura 26. Consumo de alimento promedio ajustado al peso corporal a lo largo de la semana de alimentación.

### **5.2.3 Peso del páncreas**

Como un dato indicativo del desarrollo del órgano se registró el peso del páncreas en los dos grupos. Encontramos que el grupo que recibió la dieta suplementada presentó mayor tamaño del páncreas: 17.74% más grande comparado con el grupo que recibió la dieta suficiente en biotina (Figura 27).

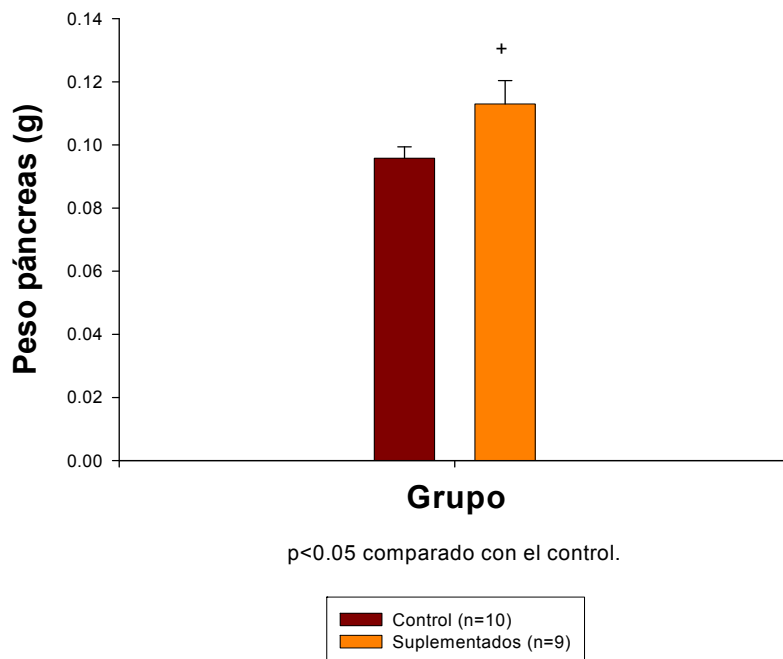


Figura 27. Peso promedio del páncreas al final del experimento.

Así mismo se hizo la relación entre el peso del órgano y el peso corporal. En las siguientes gráficas se muestra una regresión en donde tenemos la primer variable mencionada en el eje de las x y la segunda en el eje de las y. A diferencia del ajuste lineal que presenta esta relación en el grupo que recibió la dieta suficiente de biotina (Figura 28), el grupo con la dieta rica en biotina se ajusta a una ecuación polinomial con una  $R=0.859$ .

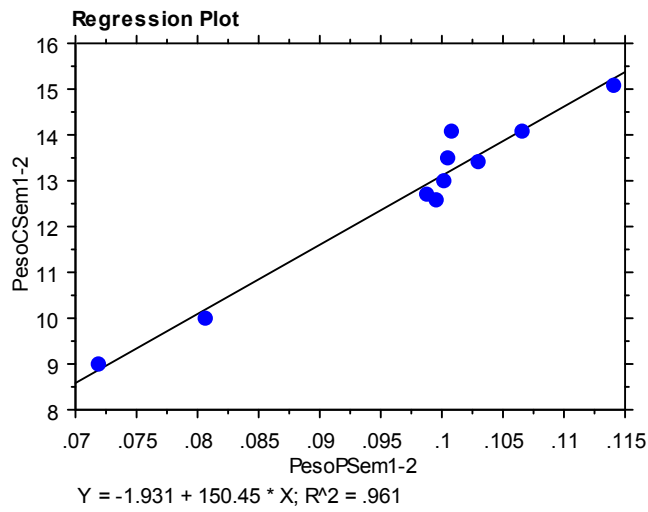


Figura 28. Regresión que muestra la relación existente entre las variables peso corporal y peso del páncreas a la semana 1 en el grupo control (n=10).

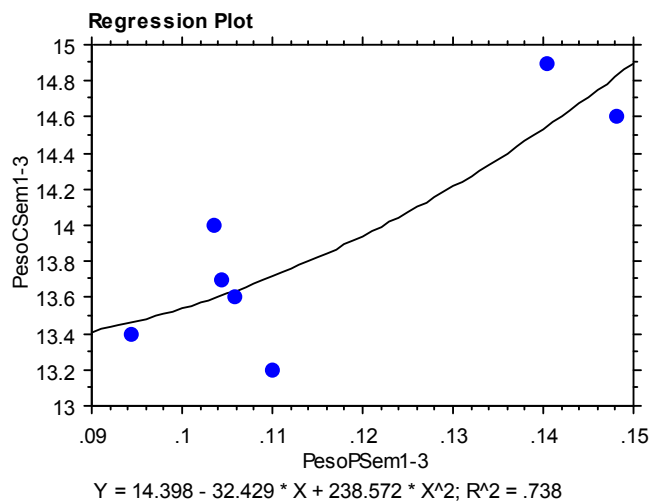


Figura 29. Regresión que muestra la relación existente entre las variables peso corporal y peso del páncreas a la semana 1 en el grupo suplementado (n=7).

#### **5.2.4 Glucosa sanguínea en ayuno**

Se comparó el efecto de las dietas sobre las concentraciones de glucosa en ayuno. Se encontró que el grupo que recibió la dieta suplementada con biotina presenta niveles 12.62% más bajos comparados con el grupo control (Figura 30).

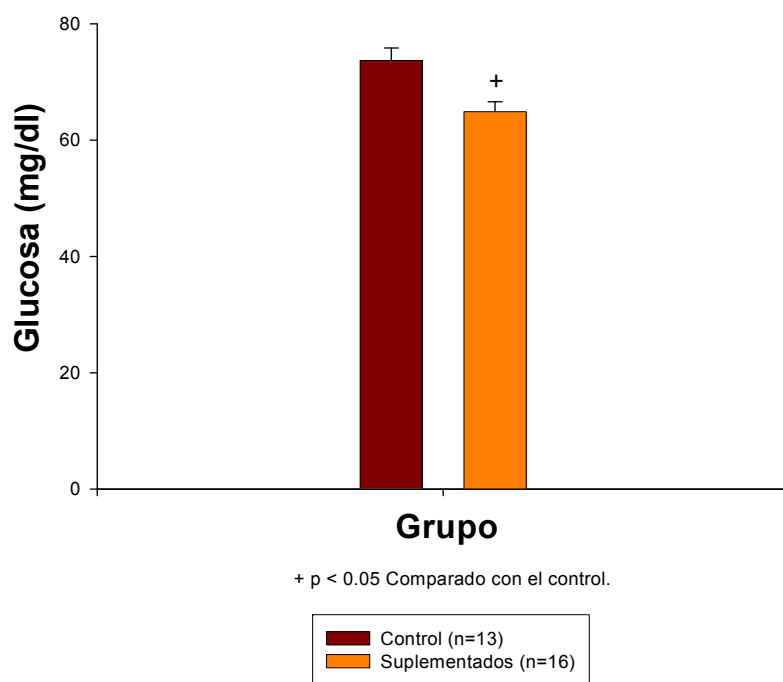


Figura 30. Glucosa final promedio en ayuno.

### 5.2.5 Glucosa sanguínea posprandial

También se determinó la glucosa en ratones alimentados ad libitum. El grupo suplementado presentó concentraciones de glucosa en promedio de 99.78 mg/dl, lo que corresponde a un 31.9% menos respecto a su control (Figura 31).

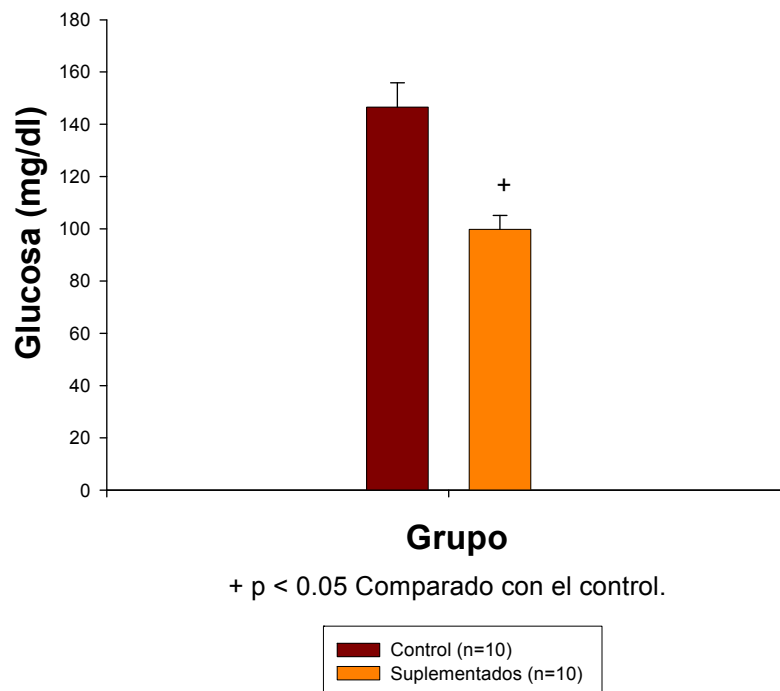


Figura 31. Glucosa final promedio en condiciones postprandiales.



### **5.2.6 Curva de tolerancia a la glucosa**

Al día 28 postnatal se realizó una curva de tolerancia a la glucosa para indagar en la homeostasis de este metabolito. Se observó una diferencia significativamente menor en las concentraciones de glucosa a los 30 minutos de la prueba, en los ratones que recibieron la dieta suplementada con biotina. (Figura 32).

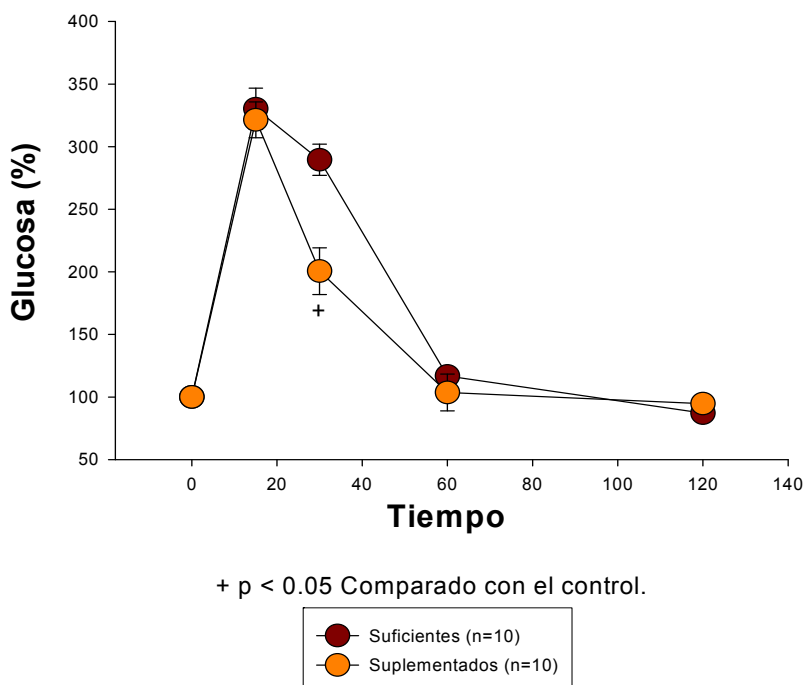


Figura 32. Curva de tolerancia a la glucosa al día 28 postnatal presentada en porcentaje.

### **5.2.7 Insulina en suero**

La disminución en las concentraciones de glucosa observada en los ratones que recibieron la dieta suplementada con biotina podrían ser explicados por una aumento en las concentraciones de insulina, por lo que procedimos a analizar este parámetro. Se encontró que, a diferencia de lo esperado, el grupo suplementado presenta un 79.52% menos de insulina que el grupo (Control =  $0.336 \pm 0.069$  ng/ml, grupo suplementado =  $0.069 \pm 0.008$ ) (Figura 33).

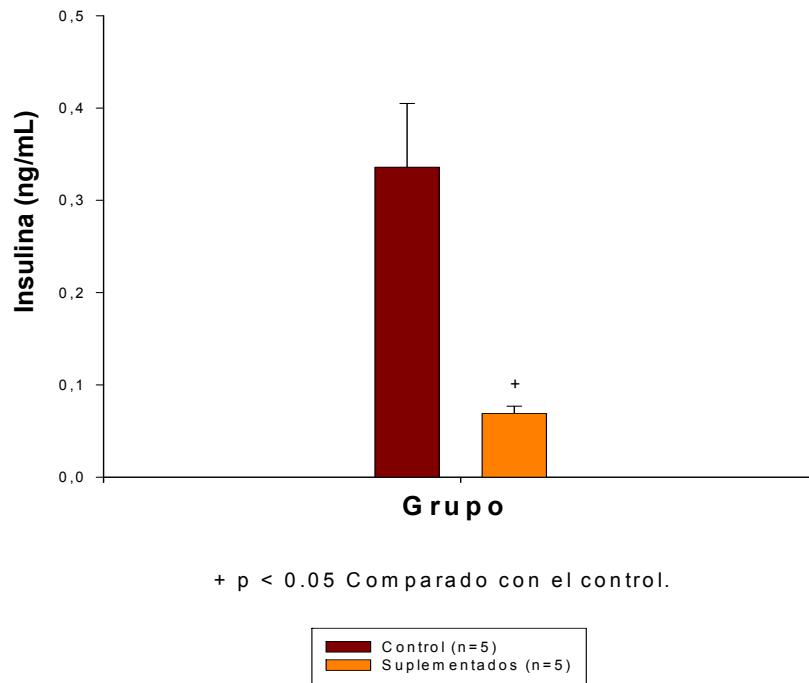


Figura 33. Insulina final promedio.

### 5.2.8 Glucagon en suero

También analizamos las concentraciones de glucagon al día 28 postnatal. No se observaron diferencias significativas entre los grupos. El control tiene un promedio de  $227.36 \pm 17.061$  ng/ml y el grupo con la dieta suplementada  $229.56 \pm 31.524$  ng/ml (Figura 34).

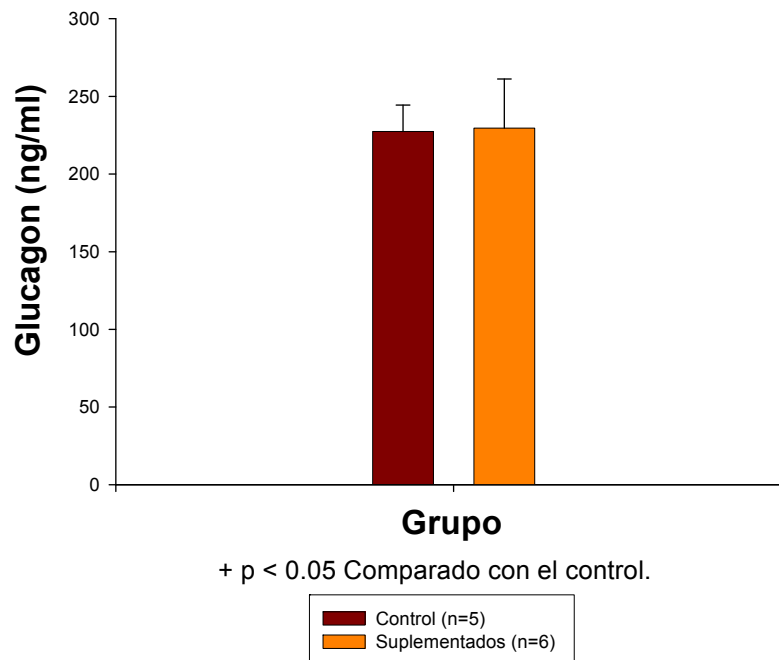


Figura 34. Concentraciones de glucagon.

### **5.2.9 Morfología pancreática**

Se efectuaron estudios morfológicos del páncreas, cuantificándose: el número de islotes y su tamaño; los islotes en vías de formación; la expresión de Glut2, y la proporción del número de islotes con células  $\alpha$  al centro. A continuación se muestran los resultados.

#### **5.2.9.1 Número de islotes**

El número de islotes totales no presentó variación alguna entre los grupos, observándose que cada uno cuenta con entre 9 y 10 islotes en promedio (Tabla 8).

Tabla 8. Promedio de islotes totales (n=4 por grupo).

	<b>Control</b>	<b>Suplementados</b>
Islotes totales	9.75±5.18	10±2.82

#### **5.2.9.2 Tamaño de los islotes**

Se observaron diferencias en el tamaño de los islotes entre los grupos. El grupo control tiene islotes cuyos tamaños oscilan entre pequeños y grandes; mientras que en los islotes del grupo suplementado van de medianos a grandes y, además, muestran islotes muy grandes, los cuales no se encuentran en el grupo control. (Tabla 9 y figura 35).

Tabla 9. Tamaño promedio de los islotes (n=4 por grupo).

	<b>Control</b>	<b>Suplementados</b>
Tamaño de los islotes	Pequeños (50%), medianos (40%) y grandes (10%).	Medianos (60%), grandes (30%) y muy grandes (10%).

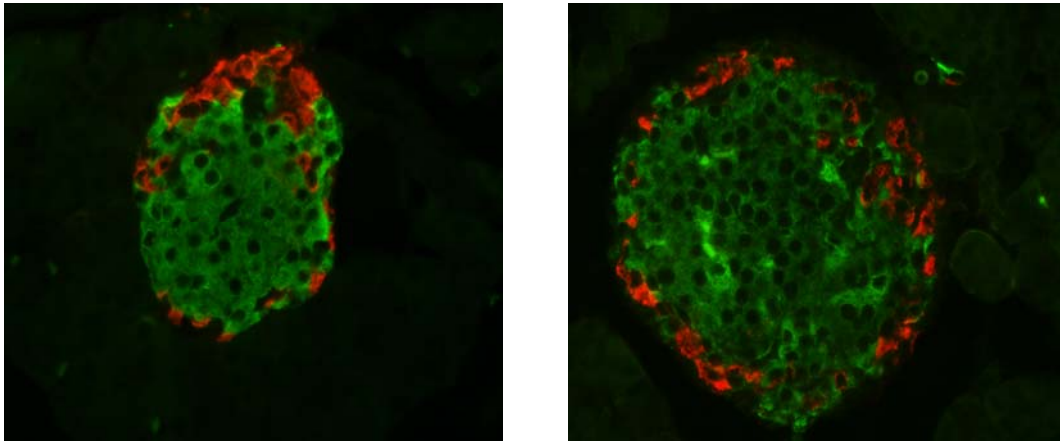


Figura 35. A) Islote representativo del grupo suficiente. B) Islote representativo del grupo suplementado.

### **5.2.9.3 Número de islotes en vías de formación**

En cuanto al número de islotes en vías de formación, el grupo suplementado tiene en promedio mayor número de islotes que cumplen con esta condición (Tabla 10 y figura 36).

Tabla 10. Número promedio de islotes en vías de formación (n=4 por grupo).

	<b>Control</b>	<b>Suplementados</b>
Islotes en vías de formación.	11.33±1.52	17.33±3.05

### **5.2.9.4 Expresión de Glut2**

La localización del glucotransportador Glut2 se analizó a través de inmunohistoquímica. Se encontró que el grupo control presenta el 75% de esta proteína en la membrana plasmática, mientras que el otro 25% se encuentra en el citoplasma. El grupo suplementado tiene el Glut2 localizado en la membrana en el 100% de sus islotes (Tabla 11 y figura 37).

Tabla 11. Patrón de expresión de Glut2 (n=4 por grupo).

	<b>Control</b>	<b>Suplementados</b>
Patrón de expresión de Glut2.	Citoplasma (25%) y membrana (75%).	Membrana (100%).

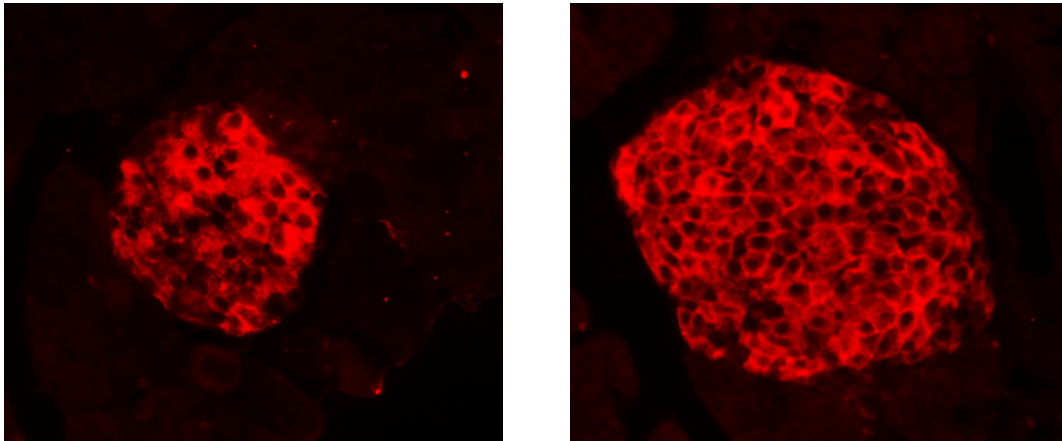


Figura 37. A) Islote representativo del grupo suficiente (con Glut2 en el citoplasma). B) Islote representativo del grupo suplementado (con Glut2 perfectamente en la membrana).

### **5.2.9.5 Islotes con células $\alpha$ al centro**

El porcentaje de islotes con células  $\alpha$  al centro fue una variable que también se cuantificó en los diferentes grupos. Lo aquí encontrado representa uno de los efectos de la biotina sobre la morfología del páncreas que más llama la atención: la suplementación con la vitamina claramente modifica la citoarquitectura del islote encontrándose un 29% de éstos con células  $\alpha$  al centro, lo que corresponde a un 20.1% más respecto a su control (Tabla 12 y figura 38).

Tabla 12. Porcentaje de islotes con células  $\alpha$  al centro (n=4 por grupo).

	<b>Control</b>	<b>Suplementados</b>
Islotes con células $\alpha$ al centro.	9.30%	29.40%

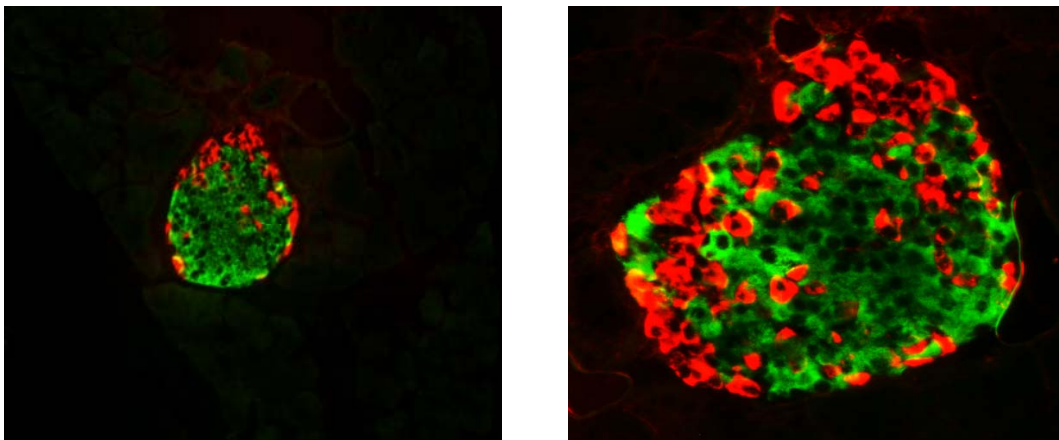


Figura 23. A) Islote representativo del grupo suficiente. B) Islote del grupo suplementado con células  $\alpha$  al centro.

## **6 DISCUSIÓN**

### **6.1 Caracterización del metabolismo de carbohidratos y la morfología y fisiología pancreáticas de ratones durante la ventana crítica posnatal**

El periodo correspondiente al destete es una etapa muy importante e interesante de estudiar porque, como ya se mencionó anteriormente, representa un reto metabólico debido a que se pasa de una dieta rica en lípidos a una dieta rica en carbohidratos, presentándose modificaciones estructurales y funcionales que determinarán el buen funcionamiento de los organismos en la vida adulta. Este periodo ha sido poco estudiado, siendo únicamente datos en la rata los que documentan los eventos en este periodo (Aguayo, C. et al., 2006). No existen hasta el momento datos en el ratón. En este trabajo se hallaron resultados que confirman que en esta etapa se producen cambios únicos en su tipo que incluyen tasas de crecimiento del páncreas que no se presentan en etapas posteriores, y parámetros metabólicos que difieren entre la ventana crítica y la etapa adulta.

Como consecuencia del cambio de dieta se encontró que el tejido adiposo es más abundante al día 21 que al día 28 postnatal a pesar de que el peso corporal es mayor en este último. Esto se debe seguramente a que durante la lactancia no existe una movilización significativa de ácidos grasos, la cual comienza a presentarse posterior al destete, coincidiendo con el hecho de que la lipasa sensible a hormonas (HSL) se activa (Girard, J. et al., 1992).

La adaptación que debe presentarse ante la nueva fuente de energía se ve también reflejada en distintos parámetros metabólicos. Nuestros datos muestran que al día postnatal 21 existe una hiperglucemia moderada junto con niveles de insulina elevados, características que desaparecen al día 28 y que concuerdan con estudios previos hechos en modelos de rata (Aguayo, C. et al., 2006). Esto se atribuye a que las células  $\beta$  neonatales presentan una baja sensibilidad a la glucosa y una secreción de insulina escasa y unimodal (Aguayo, C. et al., 2006), razón que explica porqué se encuentran niveles altos de glucosa en sangre a pesar de existir una concentración de insulina muy elevada. Uno de los mecanismos que se han propuesto para esta falta de

sensibilidad al efecto secretagogo de insulina de la glucosa es una baja intensidad de corriente en los canales de Ca<sup>+</sup> y reducida síntesis de su mRNA, mientras que el otro mecanismo planteado se encuentra ligado con la localización de GLUT2, proteína transportadora de glucosa en páncreas con un papel clave en el metabolismo de ésta y en la secreción de insulina, que en vez de encontrarse en la membrana plasmática, como sucede en las células adultas, se encuentra principalmente en el citoplasma en las células neonatas, afectando así la movilización adecuada de la glucosa al interior de la célula (Heinze, E. et al., 1971; Asplun, K., 1972; Navarro, V. et al., 2006).

Por otra parte encontramos que la hormona contrarreguladora de la insulina, el glucagón, al día postnatal 21 se encuentra muy elevada comparada con los niveles presentados al día 28. Esto podría deberse a una respuesta parácrina del islote como consecuencia de la hiperinsulinemia presentada en esta etapa. Así mismo, la existencia de cantidades elevadas de glucagón en el destete y su posterior disminución en la semana subsiguiente a éste se encuentra en concordancia con observaciones que indican que en la semana posterior al destete se produce una apoptosis de células  $\alpha$  (Aguayo, C. et al., 2006; Steiner, D. et al., 2010), lo que permite que al final de esta ventana crítica se presenten niveles similares de glucagón a los de un animal adulto.

Nuestros resultados sobre los cambios en el peso del páncreas sugieren que el periodo en estudio es importante no sólo para el tejido endócrino, sino también para el órgano en general. Como fue revelado por nuestros datos, el peso neto del tejido incrementa a una tasa elevada en este periodo. Resulta interesante la observación sobre los cambios en la relación entre el peso del tejido y el peso corporal: como se describió en la sección de resultados, durante este periodo se adquiere una linealidad entre las dos variables, la cual es inexistente al día 28 postnatal. Esto sugiere que dicha proporcionalidad podría ser indicativa de una madurez funcional (Montanya, E., et al., 2000).

Aunque en este trabajo encontramos que existen algunos hallazgos que coinciden con la descripción hecha para la ventana crítica postnatal en las ratas, hay algunos datos que difieren; entre ellos se encuentra la insensibilidad a la insulina: En las ratas, (Aguayo, C. et al., 2006) se ha reportado que al día

28 postnatal existe una insensibilidad a la hormona, en tanto que en nuestros estudios en el ratón la curva de resistencia a la insulina presenta un comportamiento similar al de un animal adulto. Nosotros proponemos que estas discrepancias podrían deberse a que en los ratones, el periodo de hiperglucemia visto al día 21 y que en la rata se reporta desde el día seis postnatal (Aguayo, C. et al., 2006), desaparece inmediatamente después del cambio de dieta, lo que propicia la desaparición de esa insensibilidad a la insulina. Esta hipótesis está sostenida por reportes que afirman que la exposición a periodos de hiperglucemia sostenida disminuyen la sensibilidad a la hormona (Leahy, J. et al., 1986; Schuit. F. et al., 2002)

Los datos nos sugieren que finalizada la semana de post-ablactación, se ha producido en el páncreas una maduración funcional que le permite mantener niveles de glucosa séricos normales y responder a cargas del carbohidrato logrando una homeostasis similar a la que se presenta en la edad, esto con la participación de los tejidos periféricos que también han transitado por un periodo de maduración y ahora son sensibles a la insulina. En nuestros estudios con marcadores de maduración como Glut2, encontramos que aún el desarrollo del islote no ha finalizado, punto de vista que es respaldado también por estudios morfológicos que indican que en el día 28 de nacimiento todavía existe un alto número de islotes en vías de formación, así como islotes de pequeño tamaño sin el porcentaje de células  $\alpha$  al centro que usualmente se encuentran en los animales adultos, lo que nos indica de que madurez la morfológica aún no se ha alcanzado. Por todo lo anterior nosotros proponemos que en trabajos futuros el estudio de la ventana crítica no se restrinja a la semana post-ablactación y se realice por un mayor número de días, para que de esta manera se pueda conocer con precisión cuándo concluye este importante periodo.

## **6.2 Efectos de la biotina en el metabolismo de carbohidratos y en la morfolología y fisiología pancreáticas durante la ventana crítica posnatal**

Dado que el páncreas durante la ventana crítica postnatal está inmaduro, es fácilmente susceptible a cambios en respuesta a diferentes factores. Tomando



en cuenta los estudios previamente efectuados por el grupo de trabajo con quien se realizó esta tesis, que han mostrado que la administración por ocho semanas de una dieta suplementada con biotina tiene diversos efectos sobre la estructura y función del islote pancreático, consideramos posible que los cambios que produce la dieta conteniendo cantidades suprafisiológicas de biotina, observados en el modelo a las 8 semanas de edad, se presenten en este periodo.

En este trabajo de Tesis encontramos que los animales alimentados con la dieta rica en biotina presentan concentraciones de glucosa menores a las que presenta el grupo control. Estos resultados concuerdan con los efectos hipoglucemiantes de la biotina observados en pacientes y animales diabéticos (Coggeshall et al., 1985; Reddi, A. et al., 1988; Maebashi et al., 1993; Zhang, H. et al., 1996). Las concentraciones de glucosa reducidas observadas en el grupo de animales tratados con biotina no se encuentran relacionadas con un menor consumo de alimento, ya que la ingesta de comida es igual en los dos grupos. Tampoco se encuentra ligada a aumentos en los niveles sanguíneos de insulina, ya que, paradójicamente, las concentraciones de esta hormona están disminuidas. El hecho de que tengamos niveles séricos de insulina bajos y que a pesar de eso se mantenga una glucosa en ayuno baja, sugiere que los animales que recibieron el tratamiento con biotina son más sensibles a la acción de la insulina.

En las curvas de tolerancia a la glucosa los animales del grupo suplementado respondieron mejor a la carga del carbohidrato bajando en mayor proporción las concentraciones de glucosa en sangre en comparación con el control; esto podría deberse a una mayor secreción de insulina en respuesta a glucosa, como se ha visto en otros trabajos (Romero-Navarro, G. et al., 1999; Sone, H. et al., 2000). Dicho aumento en la secreción por parte de los islotes de Langerhans se puede deber, en parte, a que en estos animales el Glut2 se encuentra localizado en la membrana plasmática, permitiendo así una adecuada entrada de la glucosa y, en consecuencia, una secreción de insulina más eficiente. También dilucidamos que el aumento del tamaño de los islotes y la cantidad de células  $\beta$ , participarían en un aumento en la secreción de la insulina debido a un mayor contenido de la hormona.

Sin embargo, la ya mencionada mejor respuesta del grupo suplementado en la curva de tolerancia a la glucosa también podría ser resultado de un aumento en la sensibilidad a la insulina, como lo sugieren los efectos observados en las concentraciones sanguíneas de glucosa y de insulina descritos en el párrafo anterior y los estudios reportados en la literatura (Reddi, A. et al., 1988). En estudios futuros proponemos analizar el efecto de la dieta rica en biotina sobre la sensibilidad a la insulina mediante una curva de tolerancia a la insulina..

Se sabe que el tamaño de los islotes, y del páncreas en general, está determinado por una proporción entre la proliferación y la apoptosis de las células. El que nosotros hayamos encontrado un aumento en su tamaño en respuesta a la dieta suplementada con biotina podría deberse a un incremento en la primera, ya que existen reportes de que la biotina *in vitro* aumenta tasas de proliferación (Sarah, E. et al., 2004). Este hecho también respaldaría nuestro hallazgo de un mayor número de islotes en vías de formación en el grupo suplementado ya que, en la etapa postnatal, lo que rige la regeneración en el órgano es la proliferación y no la neogénesis como se da en el desarrollo embrionario (Hue-Lee C., 1994; Francisco de Assis, G. et al., 2002; Jiang, Y. et al., 2008).

Finalmente, nuestros resultados también encontraron que la biotina, además de poseer efectos sobre la fisiología del islote pancreático, también modifica la estructura de éste. Dicho hallazgo sugiere que la vitamina es capaz de modificar la estructura tisular y abre nuevas preguntas sobre los mecanismos mediante los cuales la vitamina produce sus efectos.

## **7 CONCLUSIONES**

El trabajo aquí expuesto representa el primer reporte sobre lo que acontece en el metabolismo de la glucosa, la morfología y la fisiología pancreáticas durante la semana posterior al destete. Conforme a nuestra hipótesis de que este periodo es una ventana crítica para el órgano se encontró que el páncreas atraviesa por una serie de cambios que repercuten en el metabolismo de carbohidratos.

Así mismo, nuestros resultados indican que la biotina tiene efectos sobre la estructura y favorece la función del páncreas en este periodo crítico del desarrollo. Dado que se ha ampliamente documentado que una correcta maduración de este órgano favorece su función y lo hace menos susceptible a daños por retos metabólicos, la suplementación con cantidades suprafisiológicas de esta vitamina durante el desarrollo postnatal temprano podría tener efectos benéficos evitando el desarrollar enfermedades como la diabetes mellitus, padecimiento que representa uno de los problemas de salud más graves en México y en el mundo.

## **8. REFERENCIAS**

- Achuta, P.N. & Mistry, S.P. Synthesis of biotin-dependent carboxylases from their apoproteins and biotin. *Biochem Rev* 43, 1-12 (1972).
- 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* 1, e35 (2006).
- Albarracin, C., Fuqua, B., Geohas, J., Finch, M. & Komorowski, J. Improvement in glycemic control, lipids and insulin sensitivity with the combination of chromium picolinate and biotin in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes care* 54, A428 (2005).
- American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 28, 1:S5-S10 (2005).
- Asplund, K. Effects of postnatal feeding on the functional maturation of pancreatic islet B-cells of neonatal rats. *Diabetologia* 8, 153-9 (1972)
- Baez-Saldana, A., Zendejas-Ruiz, I., Revilla-Monsalve, C., Islas- Andrade, S., Cardenas, A., Rojas-Ochoa, A., Vilches, A. & Fernandez-Mejia C. Effects of biotin on pyruvate carboxylase, acetyl-CoA carboxylase, propionyl-CoA carboxylase, and markers for glucose and lipid homeostasis in type 2 diabetic patients and nondiabetic subjects. *Am J Clin Nutr*; 79, 238-43 (2004).
- Báez-Saldaña, A. & Ortega, E. Biotin deficiency blocks thymocyte maturation, accelerates thymus involution, and decreases nose-rump length in mice. *J Nutr* 134, 1970-7 (2004).
- Báez-Saldaña, A., Diaz, G., Espinoza, B. & Ortega, E. Biotin deficiency induces changes in subpopulations of spleen lymphocytes in mice. *Am J Clin Nutr* 67, 431-7 (1998).
- Balmer, J. E. & Blomhoff, R. Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res* 43, 1773-1808 (2002).
- Barker, D.J. Fetal origins of coronary heart disease. *Br Med J* 311, 171-4 (1995).
- Barker, D.J. The fetal origins of adult disease. *Proc Biol Sci* 262, 37-43 (1995).
- Benschoter, C.A. Effect of dietary biotin on reproduction of the house fly. *J Econ Entomol* 60, 1326-8 (1967).
- Bishop, A. & Polak, J. The anatomy, organization and ultrastructure of the islets of Langerhans en *Text book of diabetes 1*. Blacwell Publishing. Tercera edición. USA. 2003.
- Booner-Weir, S. Morphological evidence for pancreatic polarity of beta cells. *Diabetes* 37, 6-14 (1988)
- Borboni, P., Magnaterra, R., Rabino, R., Staffolanni, R., Porzio, O. et al. Effect of biotin on glucokinase activity, mRNA expression and insulin release in cultured  $\beta$  cells. *Diabetol* 33, 154-8 (1996).
- Brandsch, R. Regulation of gene expression by cofactors derived from B vitamins. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 40, 371-99 (1994).
- Brissova, M., Fowler, M.J., Nicholson, W.E., Chu, A., Hirshberb, B., Harlan, D.M. & Powers, A.C. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem*; 53, 1087-97 (2005).

- Cabrera, O., Berman, M., Kenyon, N.S., Ricordi, C., Berggren, P., & Caicedo, A. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *PNAS* 103, 2334-9 (2006).
- Cabrera, S. et al. Remodelling sympathetic innervation in rat pancreatic islets ontogeny. *BMC Developmental Biology* 9, 34-42 (2009).
- Calberg, C. Lipid soluble vitamins in gene regulation. *Biofactors* 10, 91-7 (1999).
- Chapman, A. & Cronan, J. Molecular biology of attachment to proteins. *J Nutr* 129, 447S-84S (1999).
- Chapman, A. & Cronan, J. The enzymatic biotinylation of proteins: a post-translational modification of exceptional specificity. *Trends Biochem Sci* 24, 359-63 (1999).
- Chatterjee N., Kumar, C., Ortiz, A., Rubin, S. & Said, H. Molecular mechanism of the intestinal biotin transport process. *Am J Physiol* 277: C605-13 (1999).
- Chauhan, J. & Dakshinamurti, K. Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats. *J Biol Chem* 266, 10035-8 (1991).
- Christakos, S., Dhawan, P. & Liu Y. New insights into the mechanisms of vitamin D action. *J Cell Biochem* 88, 695-705 (2003).
- Cirulli, V. et al. Expression of neural cell adhesion molecule (N-CAM) in rat islets and its role in islet cell type segregation. *J Cell Sci* 107 (Pt 6), 1429-36 (1994).
- Clagett-Dame, M. & DeLuca, H.F. The role of vitamin A in mammalian reproduction and embryonic development. *Annu Rev Nutr* 22, 347-81 (2002).
- Coggeshal, J., Heggors, J., Robson, M. & Beker H. Biotin status and plasma glucose in diabetes. *Ann NY Acad Sci*; 447, 389-92 (1985).
- Cohen, E. & Levinson, H.Z. Disrupted fertility of the hidebeetle *Dermestes maculatus* (Deg.) due to dietary overdosage of biotin. *Experientia* 24, 367-8 (1968).
- Cohen, N. & Thomas, M. Biotin transport into fully differentiated 3T3-L1 cells. *Biochim Biophys Res Comm* 10: 1508-16 (1982).
- Collins, J., Paietta, E., Green, R., Morell, A. & Stockert, R. Biotin dependent expression of the asialoglycoprotein receptor in HepG2 cells. *J Biol Chem* 263, 11 (1998).
- Combs, G.F. Biotin: the vitamins. Fundamental aspects in nutrition and health. Academic Press Inc. Segunda edición. San Diego, USA. 1994.
- Cooper, W. & Brown, S. Tissue abnormalities in newborn rats from biotin deficient mothers. *Tex Sci* 10, 60-8 (1958).
- Couch, J., Cravens, W. et al. Relation of biotin to congenital deformities in the chick. *Anat Rec* 100, 29-48 (1948).
- Cravens, W., McGibbon, W. & Sebesta, E. Effect of biotin deficiency on embryonic development in the domestic fowl. *The Anatomical Record* 90, 55-64 (1944).
- Crawford, L.A. et al. Connective Tissue Growth Factor (CTGF) Inactivation Leads to Defects in Islet Cell Lineage Allocation and  $\beta$ -Cell Proliferation during Embryogenesis. *Mol Endocrinol* 23, 324-36 (2009).
- Dakshinamurti, K. & Li, W. Transcriptional regulation of the liver phosphoenolpyruvate carboxykinase by biotin in diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 132, 127-32 (1994).
- Dakshinamurti, K. & Cheah-Tan C. Liver glucokinase of the biotin deficient rat. *Can J Biochem* 46, 75-80 (1968).

Dakshinamurti, K. & Ho Chong Hong. Regulation of key hepatic glycolytic enzymes. *Enzymol Biol Clin* 11, 423-8 (1970).

Dakshinamurti, K. Biotin—a regulator of gene expression. *J Nutr Biochem* 16, 419-23 (2005).

De la Vega, L. & Stockert, R. Regulation of the insulin and asialoglycoprotein receptors via cGMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol* 279, C2037-42 (2000).

Doyle, M.J. & Sussel, L. Nkx2.2 regulates beta-cell function in the mature islet. *Diabetes* 56, 1999-2007 (2007).

Esni, F. et al. Neural cell adhesion molecule (N-CAM) is required for cell type segregation and normal ultrastructure in pancreatic islets. *J Cell Biol* 144, 325-37 (1999).

Esni, F. et al. Neural cell adhesion molecule (N-CAM) is required for cell type segregation and normal ultrastructure in pancreatic islets. *J Cell Biol* 144, 325-37 (1999).

Fernández-Mejía, C. Pharmacological effects of biotin. *J Nutr Biochem* 16, 424-7 (2005).

Furukawa, Y., Ohinata, K., Ikai, M., Maebashi, M., Zhang, H. & Kimura, S. Biotin-stimulated insulin secretion in biotin-deficient rats. *J Clin Biochem Nutr*; 18, 35-42 (1995).

Gannon, M. et al. Persistent expression of HNF6 in islet endocrine cells causes disrupted islet architecture and loss of beta cell function. *Development* 127, 2883-95 (2000).

Gomez Dumm, C.L., Semino, M.C. & Gagliardino, J.J. Sequential morphological changes in pancreatic islets of spontaneously diabetic rats. *Pancreas* 5, 533-9 (1990).

Habener, J.F., Kemp, D.M. & Thomas, M.K. Minireview: transcriptional regulation in pancreatic development. *Endocrinology* 146, 1025-34 (2005).

Heinze, E. & Steinke, J. Glucose metabolism of isolated pancreatic islets: difference between fetal, newborn and adult rats. *Endocrinology* 88, 1259-63 (1971).

Hiriart, M. El páncreas endócrino en Fisiología médica. El manual moderno. México. 2002.

Hymes, J. & Wolf, B. Human biotinidase isn't just for recycling biotin. *J Nutr* 129, 485S-9S (1996)

Kharouta, M., Miller, K., Kim, A., Wojcik, P., Kilimnik, G., Dey A, et al. No mantle formation in rodent islet-The prototype of islet revisited. *Diabetes Research and Clinical Practice* 85, 252-7(2009).

Kim, A., Miller, K., Jo, J., Kilimnik, G., Wojcik, P. & Hara, M. Islet architecture: a comparative study. *Islets* 1, 129-36 (2009).

Klandorf, H., Clarke, L. & Brown, J. Altered glucagon release in biotin deficiency. *Ger of medicine. Gerl Comp Endocrinol* 65, 133-40 (1987).

Lamhonwah, A., Quan, F. & Gravel, R. Sequence homology around the biotin-binding site of human propionyl-CoA carboxylase. *Arch Biochem Biophys* 254, 631-6 (1987).

Lammert, E. Early pancreatic development. *Mech Dev* 120, 59-67 (2003).

Lantz, K.A. et al. Foxa2 regulates multiple pathways of insulin secretion. *J Clin Invest* 114, 512-20 (2004).

Leahy, J., Cooper, H., Deal, D. & Weir G. Chronic hyperglycemia is associated with impaired glucose influence on insulin secretion. *J Clin Invest* 77; 908–15 (1986).

Liu, Y.L. et al. Retinoid X receptor agonists have anti-obesity effects and improve insulin sensitivity in Zucker fa/fa rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24, 997-1004 (2000).

- Lucas, A. Programming by early nutrition in man. CIBA foundation Symposium 156, 38-55 (1991).
- Lucas, A. Programming by early nutrition: An experimental approach. *J Nutr* 128: 401S–406S (1998).
- Maebashi, M., Makino, Y., Furukawa, Y., Ohinata, K., Kimura, S. & Takao S. Therapeutic evaluation of the effect of biotin on hyperglycemia in patients with non-insulin diabetes mellitus. *J Clin Biochem Nutr*; 14, 211-18 (1993).
- Manthey, K., Griffin, J. & Zempleni, J. Biotin supply affects expression of biotin transporters, biotinylation of carboxylases and metabolism of interleukine-2 in Jurkat cells. *J Nutr* 132, 887-92 (2002).
- Marhfour, I. et al. Impact of Sur1 gene inactivation on the morphology of mouse pancreatic endocrine tissue. *Cell Tissue Res* 335, 505-15 (2009).
- Matthews, K., Rhoten, W., Driscoll, H. & Chertow, B. Vitamin A deficiency impairs fetal islet development and causes subsequent glucose intolerance in adult rats. *J Nutr* 134, 1958-63 (2004).
- Mistry, S., Dakshinamurti, K. & Modi, V. Impairment of glucose utilization in biotin deficiency. *Arch Biochem Biophys* 96, 674-5 (1962).
- Mock, D.M. & Stadler, D.D. Conflicting indicators of biotin status from a cross-sectional study of normal pregnancy. *J Am Coll Nutr* 16, 252-7 (1997).
- Mock, D.M. Marginal biotin deficiency is teratogenic in mice and perhaps humans: a review of biotin deficiency during human pregnancy and effects of biotin deficiency on gene expression and enzyme activities in mouse dam and fetus. *J Nutr Biochem* 16, 435-7 (2005).
- Mock, D.M., Mock, N.I., Stewart, C.W., LaBorde, J.B. & Hansen, D.K. Marginal biotin deficiency is teratogenic in ICR mice. *J Nutr* 133, 2519-25 (2003).
- Mock, D.M., Quirk, J.G. & Mock, N.I. Marginal biotin deficiency during normal pregnancy. *Am J Clin Nutr* 75, 295-9 (2002).
- Mock, D.M., Stadler, D.D., Stratton, S.L. & Mock, N.I. Biotin status assessed longitudinally in pregnant women. *J Nutr* 127, 710-6 (1997).
- Montanya, E., Nacher, V., Biarnes, M. & Soler J Linear correlation between  $\beta$ -cell mass and body weight throughout the lifespan in Lewis rats: role of  $\beta$ -cell hyperplasia and hypertrophy. *Diabetes* 49, 1341–6 (2000).
- Mukherjee, R. et al. Sensitization of diabetic and obese mice to insulin by retinoid X receptor agonists. *Nature* 386, 407-10 (1997).
- Navarro-Tableros, V., Fiordeliso, T., Hernández-Cruz, A. & Hiriart, M. Physiological development of insulin secretion, calcium channels and GLUT2 expression of pancreatic rat  $\beta$  cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292: E1018-29 (2006).
- Nittala A., Gosh, S. & Wang, X. Investigating the role of islet cytoarchitecture in its oscillation using a new  $\beta$  cell cluster model. *PLoS ONE* 2(10): e983 (2007)
- Ozanne, S. & Hales, N. Pre and early postnatal nongenetic determinants of type 2 diabetes. Cambridge University Press 2 462-94 (2002).
- Patel, M.S., Srinivasan, M. & Laychock, S.G. Metabolic programming: Role of nutrition in the immediate postnatal life. *J Inherit Metab Dis* 11, 87-94 (2008).
- Paul, P.K. & Duttagupta, P.N. The effect of an acute dose of biotin at a post-implantation stage and its relation with female sex steroids in the rat. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 22, 181-6 (1976).

- Paul, P.K. & Duttagupta, P.N. 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, 89-101 (1975).
- Pfahl, M. & Chytil, F. Regulation of metabolism by retinoic acid and its nuclear receptors. *Annu Rev Nutr* 16, 257-83 (1996).
- Pictet, R.L., Clark, W.R., Williams, R.H. & Rutter, W.J. An ultrastructural analysis of the developing embryonic pancreas. *Dev Biol* 29, 436-67 (1972).
- Pillai, M.K. & Medhukar, B.V. Effect of biotin on the fertility of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* (L.). *Naturwissenschaften* 56, 218-9 (1969).
- Quesada, I., Tudurí, E., Ripoll, C. & Nadal, Á. Physiology of the pancreatic  $\alpha$ -cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *Journal of Endocrinology* 199, 5-19 (2008).
- Rahier, J., Wallon, J., Loozen, S., Lefevre, A., Gepts, W. & Haot, J. The pancreatic polypeptide cells in the human pancreas. The effects of age and diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 56, 441-4 (1983).
- Reddi, A., DeAngelis, B., Frank, O., Lasker, N. & Baker, H. Biotin supplementation improves glucose and insulin tolerances in genetically diabetic KK mice. *Life Sci* 42, 1323-30 (1988).
- Reusens, B. & Remacle, C. Programming of the endocrine pancreas by the early nutritional environment. *International Journal of Biochemistry* 38, 913-22 (2006).
- Rodríguez Meléndez, R., Cano, S., Méndez, S. & Velázquez A. Biotin regulates the genetic expression of holocarboxylase synthetase and mitochondrial carboxylases in rats. *J Nutr* 131, 1909-13 (2001).
- Rodríguez-Meléndez, R. & Zemleni, J. Regulation of gene expression by biotin (review). *J Nutr Biochem* 14, 680-90 (2003).
- Rodríguez-Meléndez, R., Camporeale, G., Griffin, J. & Zemleni, J. Interleukin 2 receptor – dependent endocytosis depends on biotin in Jurkat cells. *Am J Physiol* 284, C415-21 (2003).
- Romero-Navarro, G., Cabrera-Valladares, G., German, M., Matchinsky, F., Wang, J. & Fernández-Mejía, C. Biotin regulation of pancreatic glucokinase and insulin in primary cultured rat islets and in biotin deficient rats. *Endocrinol* 140, 4595-600 (1999).
- Rull, J.A., Aguilar C., Rojas R., Rios, J.M., Gómez, F. & Olaiz, G. Epidemiology of type 2 diabetes in Mexico. *Arch Med Res* 36, 188-96 (2005).
- Schuit, F., Flamez, D., DeVos, A. & Pipeleers, D. Glucose regulated gene expression maintaining the glucose-responsive state of beta cells. *Diabetes* 51; S326–32 (2002).
- Schwitzgebel, V., Somm, E. & Klee, P. Modeling intrauterine growth retardation in rodents: Impact on pancreas development and glucose homeostasis. *Molecular and cellular endocrinology* 304, 78-83 (2009).
- Seino, S., Iwanaga, T., Nagashima, K. & Miki, T. Diverse roles of K(ATP) channels learned from Kir6.2 genetically engineered mice. *Diabetes* 49, 311-8 (2000).
- Shih, D.Q. et al. Profound defects in pancreatic beta-cell function in mice with combined heterozygous mutations in Pdx-1, Hnf-1alpha, and Hnf-3beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3818-23 (2002).
- Simmons, R.A. Role of metabolic programming in the pathogenesis of beta-cell failure in postnatal life. *Rev Endocr Metab Disord* 8, 95-104 (2007).
- Singer, G. & Geohas, J. The effect of chromium picolinate and biotin supplementation on glycemic control in poorly controlled patients with type 2 diabetes mellitus: a placebo-controlled, double-blinded, randomized trial. *Diabetes Technol Ther* 8, 636-43 (2006).



- Slack, J.M. Developmental biology of the pancreas. *Development* 121, 1569-80 (1995).
- Solórzano-Vargas, S., Pacheco-Álvarez, D. & León del Río, A. Holocarboxilase synthetase is an obligate participant in biotin-mediated regulation of its own expression and of biotin-dependent carboxylases mRNA levels in human cells. *Proc Natl Acad Sci* 99, 5325-30 (2002).
- Sone, H., Ito, M., Shimizu, M., Sasaki, Y., Komai, M. & Furukawa, Y. Characteristics of the biotin enhancement of glucose-induced insulin secretion in pancreatic islets of rat. *Biosci Biotechnol Biochem*; 64, 550-4 (2000).
- Spence, J. & Koudelka, A. Effects of biotin upon the intracellular level of cGMP and the activity of glucokinase in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem* 259, 6393-6 (1984).
- Srinivasan, M., Laychock, S., Hill, D. & Patel, M. Neonatal nutrition: metabolic programming of pancreatic islets and obesity. *Society for Experimental Biology and medicine* 9, 201-09 (2003).
- Steiner, D., Kim, A., Miller, K. & Hara, M. Pancreatic islet plasticity: interspecies comparison of islet architecture and composition. *Islets* 2, 135-45 (2010).
- Stockert, R. & Morell, A. Second messenger modulation of the asialoglycoprotein receptor. *J Biol Chem* 265, 1841-6 (1990).
- Stockert, R. & Ren, Q. Cytoplasmic protein mRNA interaction mediates cGMP-modulated translational control of the asialoglycoprotein receptor. *J Biol Chem* 267, 56-9 (1997).
- Sun, G., Tarasov, A., McGinty, J., French, P., McDonald, A., Leclerc, I. & Rutter, G. LKB1 deletion with the RIP2.Cre transgene modifies pancreatic  $\beta$  cell morphology and enhances insulin secretion in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298, E1261-73 (2010).
- Sund, N.J. et al. Tissue-specific deletion of Foxa2 in pancreatic beta cells results in hyperinsulinemic hypoglycemia. *Genes Dev* 15, 1706-15 (2001).
- Thorne Research, Inc. Biotin. *Alternative Medicine Review* 12, 1-5 (2007).
- Tokuyama, Y. et al. Evolution of beta-cell dysfunction in the male Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes* 44, 1447-57 (1995).
- Trucco, M. Regeneration of the pancreatic beta cell. *Journal of Clinical Investigation* 115, 5-12 (2005).
- Tweedie, E. et al. Maintenance of hepatic nuclear factor 6 in postnatal islets impairs terminal differentiation and function of beta-cells. *Diabetes* 55, 3264-70 (2006).
- Van Hoof, D., D'Amour, K. & German, M. Derivation of insulin-producing cells from human embryonic stem cells. *Stem Cell Research* 3, 73-87 (2009).
- Vilches-Flores, A. & Fernández-Mejía, C. Efecto de la biotina sobre la expresión genética y el metabolismo. *Rincón del residente* 57, 71-24 (2005).
- Wang, K., Mock, N. & Mock, D. Biotin biotransformation to bisnorbiotin is accelerated by several peroxisome proliferators and steroid hormones in rats. *J Nutr* 127, 2212-6 (1997).
- Watanabe, T. & Endo, A. Teratogenic effects of maternal biotin deficiency on mouse embryos examined at midgestation. *Teratology* 42, 295-300 (1990).
- Watanabe, T. Dietary biotin deficiency affects reproductive function and prenatal development in hamsters. *J Nutr* 123, 2101-8 (1993).
- Watanabe, T. Morphological and biochemical effects of excessive amounts of biotin on embryonic development in mice. *Experientia* 52, 149-54 (1996).

Wieczorek, G., Pospischil, A. & Perentes, E. A comparative immunohistochemical study of pancreatic islets in laboratory animals (rats, dogs, minipigs, nonhuman primates). *Exp Toxicol Pathol* 50:151-72 (1998).

Wilding Crawford, L. et al. Gene expression profiling of a mouse model of pancreatic islet dysmorphogenesis. *PLoS ONE* 3, e1611 (2008).

Yoshikawa, H., Tajiri, Y., Sako, Y., Hashimoto, T., Umeda, F. & Nawata H. Effects of biotin on glucotoxicity and lipotoxicity in rat pancreatic islets. *Metabolism* 51, 163-8 (2002).

Zempleni, J. Uptake, localization, and noncarboxylase roles of biotin. *Annu Rev Nutr* 25, 175-96 (2005).

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*; 42, 517-26 (1996).

Zhang, H., Osada, K., Sone, H. & Furukawa Y. Biotin administration improves the impaired glucose tolerance of streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 43; 271-80 (1997).

Zimmet, P., Alberti, K.G. & Shaw, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414, 782-7 (2001).