



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DE LA BIOTINA
SOBRE LA REGULACIÓN GENÉTICA
DEL METABOLISMO DE LÍPIDOS**

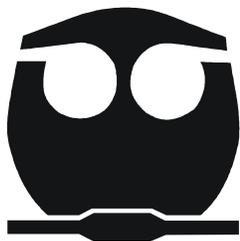
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A

FIDEL ANTONIO VELASCO GONZÁLEZ



MÉXICO, D. F.

2010



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.

Directora de tesis: Dra. Cristina Fernández Mejía

Jurado asignado:

Presidente	Dr. Rogelio Hernández Pando
Vocal	Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre
Secretario	Dr. Juan Miranda Ríos
Suplente	Dr. Ignacio Camacho Arroyo
Suplente	Dr. Armando Roberto Tovar Palacio

Sitio donde se desarrolló el trabajo:

Unidad de Genética de la Nutrición
Instituto Nacional de Pediatría
Instituto de Investigaciones Biomédicas

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Cristina Fernández Mejía, mi directora de tesis.
Por su paciencia, comprensión y apoyo.

A los miembros del comité tutorial y a los sinodales:
Dr. Ignacio Camacho Arroyo, Dr. Javier Espinosa Aguirre,
Dr. Rogelio Hernández Pando, Dr. Juan Miranda Ríos, Dr. Armando Tovar Palacio.
Por las atenciones recibidas.

A Alberto Rojas, técnico académico del laboratorio. Por tu asistencia y amabilidad.

Al CONACYT, por la beca proporcionada para llevar a cabo mis estudios de maestría.

A papá y a mamá, por su amor y apoyo.
A Jorge, por su cariño.
A mis familiares, amigos y amigas, por su confianza y afecto.
A Vanessa, porque me enseñaste que los abrazos dan felicidad.

A ti, regia Universidad, por haberme llamado a tus legiones. Gracias por el saber que he bebido de tus manos. Lo que más me ha conmovido es la grandeza humana plasmada en todo tu ser... en el Colegio de San Ildefonso, en la hermosa Ciudad Universitaria...
Gracias porque mi mente no sólo se alimentó de tu ciencia, sino porque mi alma se nutrió con el humanismo y el arte. Tu tradición humanística es un pozo inagotable, consuelo para los corazones sedientos de lo trascendente...
Gracias por dejar que mi espíritu se empara de los maestros antiguos y modernos:
...Catulo, Horacio, Homero, Sófocles, Platón, Sor Juana, Cervantes, Paz, Grass...
...Chaucer, Shakespeare, Milton, Yeats, Marlowe, Shelley, Sterne...
...y tantos y tantos más...

Gracias a ti, Señor, por tu bondad y por la vida. Siempre.

*Para Jorge.
Con amor.*

Para mi hermanito.

La cruel Muerte me privó de darte el cariño y la protección de un hermano mayor. Te arrancó de mis brazos y pulverizó tu cuerpo, mas no pudo destruir tu recuerdo. Fue una victoria pírrica: nuestro lazo jamás terminará. Y mi memoria será tu morada, hasta el fin de mi existencia. Te extraño.

*Ahora descansa, hermano mío,
deja que resguardemos tu amor en nuestros corazones,
cual vasos canopos
consagrados a preservar la esencia de los faraones.*

Come, my friends,
'Tis not too late to seek a newer world.
Push off, and sitting well in order smile
The sounding furrows; for my purpose holds
To sail beyond the sunset, and the baths
Of all the western stars, until I die.
It may be that the gulfs will wash us down;
It may be we shall touch the Happy Isles,
And see the great Achilles, whom we knew.
Though much is taken, much abides; and though
We are not now that strength which in old days
Moved earth and heaven, that which we are, we are—
One equal temper of heroic hearts,
Made weak by time and fate, but strong in will
To strive, to seek, to find, and not to yield.

Lord Alfred Tennyson (1809-1892)

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	4
1. Papel de la biotina en las reacciones de carboxilación	5
2. Efecto de la biotina sobre la expresión genética	8
2.1. Activación de la guanilato ciclasa soluble	9
2.2. Biotinilación de histonas	10
3. Efecto de la biotina sobre el metabolismo de carbohidratos	11
3.1. Efecto de la deficiencia de biotina	11
3.2. Efecto de la biotina en condiciones fisiológicas normales	12
3.3. Efecto de la biotina en modelos de diabetes	13
3.4. Resumen	14
4. Efecto de la biotina sobre el metabolismo de lípidos	14
5. Efecto de otras vitaminas hidrosolubles sobre la expresión genética en eucariontes	15
5.1. Ácido fólico	15
5.2. Ácido ascórbico (vitamina C)	16
5.3. Tiamina (vitamina B ₁)	17
5.4. Riboflavina (vitamina B ₂)	18
5.5. Nicotinamida (vitamina B ₃)	18
5.6. Piridoxina (vitamina B ₆)	18
5.7. Cobalamina (vitamina B ₁₂)	19
6. Metabolismo de lípidos	20
6.1. Lipogénesis	20
6.2. Factores transcripcionales del metabolismo de lípidos	24
ANTECEDENTES DIRECTOS DE ESTE PROYECTO	26
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
HIPÓTESIS	27
OBJETIVO GENERAL	27
OBJETIVO PARTICULAR	27

MÉTODOS	28
Modelo experimental	28
Extracción de RNA y obtención de cDNA	29
PCR en tiempo real	30
Análisis de expresión relativa	31
Análisis estadístico	32
RESULTADOS	33
1. Expresión de genes en el hígado	33
1.1. Metabolismo de carbohidratos	33
1.1.1. Enzimas glucolíticas	33
1.1.2. Enzimas gluconeogénicas	34
1.1.3. Transportador de glucosa	34
1.2. Metabolismo de lípidos	35
1.2.1. Enzimas de la β -reducción	35
1.3. Factores transcripcionales del metabolismo de carbohidratos y de lípidos	36
2. Expresión de genes en el tejido adiposo	38
2.1. Factores transcripcionales del metabolismo de carbohidratos y de lípidos	38
2.2. Enzimas de la β -reducción	38
2.3. Enzimas gliceroneogénicas	39
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES	47
REFERENCIAS	48

RESUMEN

Además de su papel como grupo prostético de las carboxilasas, la biotina es capaz de regular la expresión genética. Estudios en humanos y animales han documentado que concentraciones farmacológicas de biotina reducen la hiperglucemia y la hiperlipidemia. Se desconoce cuál es el efecto de la biotina sobre la expresión de proteínas del metabolismo de lípidos, por lo que en este trabajo analizamos los efectos de concentraciones farmacológicas de biotina en la dieta sobre la expresión de factores transcripcionales y de enzimas pertenecientes al metabolismo de lípidos.

Se utilizó un modelo experimental de ratones de la cepa BALBc, dividido en dos grupos: un grupo control (suficiente) y un grupo experimental (suplementado). El grupo suficiente recibió una dieta con la concentración necesaria de biotina para satisfacer los requerimientos fisiológicos de esta vitamina (4 mg biotina / kg peso alimento). El grupo suplementado recibió una dieta con concentraciones farmacológicas de biotina (100 mg biotina / kg peso alimento). Al final de ocho semanas de tratamiento, se les tomaron muestras de sangre a los ratones y se les sacrificó. Se obtuvo el ARN total del hígado y del tejido adiposo, con el cual se realizaron estudios de PCR en tiempo real para evaluar la expresión de genes del metabolismo de lípidos.

Encontramos que los ratones alimentados con las concentraciones farmacológicas de biotina presentaron una menor concentración de triglicéridos que los ratones alimentados con una dieta control ($P < 0.05$). La expresión relativa de genes correspondientes a enzimas y factores transcripcionales reveló diferencias entre los grupos. En el hígado, encontramos que la dieta suplementada disminuyó la abundancia del ARN mensajero de los factores transcripcionales Foxa1, Foxa2, HNF-4alfa, SREBP-1c, y de la enzima lipogénica sintetasa de ácidos grasos (FAS). No se observaron cambios en la expresión de acetil-CoA carboxilasa (ACC-1). Por otra parte, se observó un aumento en la expresión de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). Además, hubo una disminución en la expresión de piruvato cinasa (PK), fosfofructocinasa 1 (PFK-1), piruvato carboxilasa (PC) y el transportador de glucosa GLUT 2. En el tejido adiposo, los ratones suplementados mostraron una disminución en la expresión de los factores transcripcionales Srebp-1c, PPAR-alfa y Ppar-gama, así como de las enzimas ACC-1, FAS, G6PDH, PEPCCK y PC.

Nuestros resultados muestran, por primera vez, una relación entre la expresión de genes lipogénicos y el efecto hipotriglicéridémico de la biotina. Dichos resultados sugieren que la biotina podría ayudar a tratar padecimientos metabólicos como la hipertriglicéridemia.

ABSTRACT

Besides its role as carboxylase prosthetic group, biotin regulates gene expression. Several studies have shown that pharmacological concentrations of biotin reduce hypertriglyceridemia and hyperglycemia. The molecular mechanisms involved in biotin effects on lipid metabolism are largely unknown. The present study analyzed the effects of pharmacological concentrations of biotin on the mRNA expression of various lipogenic genes.

BALBc mice were divided into two groups. A diet with an enough concentration of biotin for physiological requirements (4 mg / kg food weight) was given to the control group, also named sufficient group. A diet with a pharmacological concentration of biotin (100 mg / kg food weight) was given to the experimental group, also named supplemented group. Blood samples were taken and mice were sacrificed after eight weeks of diet. RNA from liver and adipose tissue was obtained to perform real-time PCR in order to assess the expression of lipid metabolism genes.

We found that triglyceride blood level was lower in supplemented group than in sufficient group ($P < 0.05$). There were differences regarding the genetic expression of enzymes and transcriptional factors between the groups. In liver, the supplemented biotin diet was related to a decrease in RNAm levels of HNF-4 α , Srebp-1c, Foxa1, Foxa2 and fatty acid synthase (FAS). The relative expression of acetyl-CoA carboxilase (ACC-1) was not changed, but the relative expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) was increased. Besides, the expression of pyruvate kinase (PK), phosphofructokinase (PFK-1), pyruvate carboxylase (PC) and glucose transporter GLUT 2 was decreased. In adipose tissue, supplemented mice showed a decrease in the expression of the transcriptional factors Srebp-1c, Ppar-alpha and Ppar-gamma, as well as in the expression of the enzymes ACC-1, FAS, G6PDH, PEPCK and PC.

For first time in literature, our results show a relation between the hipotriglyceridemic effect of biotin and the expression of lipogenic genes. These results suggest that biotin should be helpful in the treatment of metabolic disorders such as hypertriglyceridemia.

INTRODUCCIÓN

La biotina es una vitamina hidrosoluble del complejo B (vitamina B₈), esencial para la homeostasis y el crecimiento de todos los seres vivos (Pacheco-Álvarez y León del Río, 2002). Esta vitamina fue identificada por Kögl en 1935, quien la caracterizó como un factor indispensable para el crecimiento de la levadura (Kögl, 1935). Es un nutriente esencial para el ser humano cuya deficiencia es rara, ya que se encuentra en varios alimentos (especialmente en levaduras, vísceras como riñón e hígado, carne de pollo, huevos, chícharos, cacao, cereales) y además es sintetizada por las bacterias de la flora intestinal (Melo y Cuamatzi, 2004). La figura 1 presenta su estructura química.

Generalmente, la deficiencia de biotina se debe al consumo elevado de huevos crudos. La clara de huevo contiene una gran cantidad de avidina, una proteína que se une con mucha fuerza a la biotina e impide su absorción intestinal, conduciendo a una deficiencia cuyos síntomas incluyen depresión, dolor muscular, dermatitis y alopecia (Melo y Cuamatzi, 2004). Se piensa que, al inhibir el crecimiento bacteriano, la avidina sirve como defensa del embrión de pollo. Cuando se cuecen los huevos, la avidina es desnaturalizada, razón por la que la deficiencia de biotina ocurre al ingerir huevos en estado crudo (Lehninger et al, 2001, cap. 16, p. 586). A la biotina también se le llamó vitamina H (del alemán *haut*, piel) debido a su papel protector contra la toxicidad de la clara de huevo, toxicidad manifiesta en síntomas como dermatitis y alopecia (Melo y Cuamatzi, 2004).

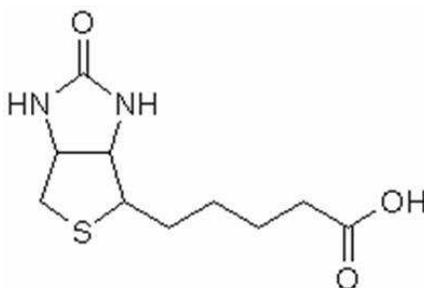


Figura 1. Estructura química de la biotina.

1. Papel de la biotina en las reacciones de carboxilación

En mamíferos, la biotina funciona como grupo prostético de las enzimas acetil-CoA carboxilasa (ACC-1 y ACC-2), piruvato carboxilasa (PC), propionil-CoA carboxilasa (PCC) y metilcrotonil-CoA carboxilasa (MCC). Estas enzimas catalizan reacciones fundamentales de procesos metabólicos como la gluconeogénesis, la síntesis de ácidos grasos y el catabolismo de aminoácidos (Rodríguez, 2000). La figura 2 presenta las reacciones de carboxilación de estas enzimas.

La ACC cataliza la carboxilación de acetil-CoA para formar malonil-CoA, molécula que sirve como precursor en la síntesis de ácidos grasos. La enzima ACC regula la β -reducción y la β -oxidación de ácidos grasos, además de intervenir en la génesis de la membrana celular (Rodríguez, 2000). En humanos, ACC presenta dos isoformas: ACC-1 o ACC- α y ACC-2 o ACC- β . ACC-1 es una isoenzima citosólica involucrada en la síntesis de ácidos grasos en el citosol, mientras que ACC-2 es una isoenzima mitocondrial responsable de la β -oxidación de ácidos grasos (Pacheco-Álvarez y León del Río, 2002).

La PC es una enzima clave de la gluconeogénesis en hígado y riñón, donde cataliza la síntesis del oxaloacetato a partir de piruvato. También está presente en tejidos lipogénicos, en los que actúa en la síntesis de ácidos grasos. En todos los tejidos, especialmente en cerebro, PC tiene un papel anaplerótico en el ciclo del ácido cítrico, al catalizar la formación de oxaloacetato (Rodríguez, 2000).

La PCC interviene en el catabolismo de ácidos grasos de cadena impar y de ciertos aminoácidos (isoleucina, treonina, metionina, valina), al catalizar la conversión de propionil-CoA en metilmalonil-CoA (Rodríguez, 2000). Este metabolito es transformado posteriormente a succinil-CoA para entrar al ciclo de Krebs (Pacheco-Álvarez y León del Río, 2002).

La MCC participa en el catabolismo del aminoácido leucina, convirtiendo al 3-metilcrotonil-CoA en 3-metilglutaconil-CoA (Rodríguez, 2000).

Citosol y mitocondria



Mitocondria

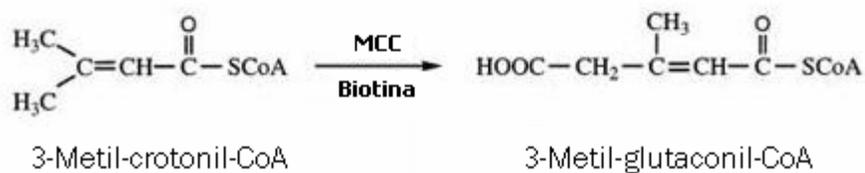
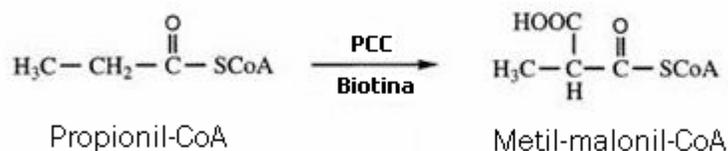
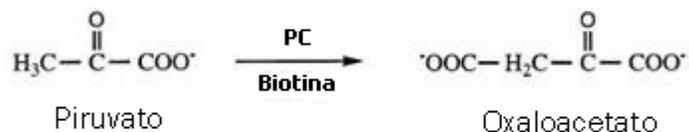


Figura 2. Reacciones catalizadas por las carboxilasas dependientes de biotina (modificada de Zemleni y Mock, 1999).

La unión covalente de la biotina a las carboxilasas ocurre gracias a la acción de la holocarboxilasa sintetasa (HCS), con la presencia de biotinil-AMP como intermediario (Dakshinamurti y Li, 1994). La biotina tiene un papel fundamental en numerosas reacciones de carboxilación puesto que es un acarreador específico de CO_2 . Los grupos carboxilo son activados en una reacción que consume ATP y un CO_2 al complejo formado por la biotina y la enzima correspondiente. El CO_2 , “activado” de esta forma, es transferido posteriormente a una molécula aceptora para completar la reacción de carboxilación (Lehninger et al, 2001, cap. 16, pp. 585-586).

Las carboxilasas dependientes de biotina son sintetizadas como precursores inactivos o apoenzimas. La proteína activa u holoenzima se forma cuando la molécula de biotina se une a un residuo de lisina localizado en una secuencia Met-Lys-Met que está conservada universalmente en todas las enzimas dependientes de biotina (Chapman-Smith y Cronan, 1999). Esta reacción se lleva a cabo en dos etapas. En la primera, la biotina es activada empleando ATP para formar el intermediario biotinil-5'-adenilato (biotinil-AMP). En la segunda etapa, el grupo biotinilo se transfiere a la apoenzima para unir la biotina al residuo de lisina previamente mencionado, liberándose AMP (Lamhonwah et al, 1987).

Una vez formada la holoenzima, procede la reacción de carboxilación del sustrato. Por ejemplo, la piruvato carboxilasa está compuesta por cuatro subunidades idénticas, cada una de las cuales contiene una molécula de biotina unida covalentemente al grupo ϵ -amino de un residuo específico de lisina en el sitio activo de la enzima. La carboxilación del piruvato tiene lugar en dos pasos: en primer lugar, un grupo carboxilo proveniente del HCO_3^- se une a la biotina, y a continuación el grupo carboxilo se transfiere al piruvato para formar oxaloacetato. Estos dos pasos tienen lugar en sitios activos diferentes; el brazo largo y flexible de la biotina permite la transferencia del grupo carboxilo activado desde el primer sitio activo al segundo sitio activo. El mecanismo es similar para otras carboxilasas dependientes de biotina (Lehninger et al, 2001, cap. 16, p. 586).

La reacción de biotinilación en bacterias es catalizada por la enzima BirA. Se sabe que en *Escherichia coli*, BirA es una enzima bifuncional que además de catalizar la biotinilación de la acetil-CoA, regula la transcripción de los cinco genes involucrados en la síntesis de biotina, actuando como un represor de la transcripción de los mismos. También se sabe que BirA funciona como un sensor de la cantidad de biotina y de la concentración de apocarboxilasas en bacterias. Así, en un medio donde la concentración de biotina es baja o nula, habría transcripción del operón de biotina, mientras que en un medio donde la concentración de biotina es adecuada para la célula, BirA reprimiría la transcripción del operón (Pacheco-Álvarez et al, 2002).

En el caso de los eucariontes, la biotinylación de carboxilasas se lleva a cabo por la holocarboxilasa sintetasa (HCS). Se ha clonado el cDNA de la HCS, y se sabe que aunque su ARNm se encuentra presente en todos los tejidos estudiados, se expresa preferentemente en riñón, páncreas y músculo esquelético (León del Río et al, 1995).

La comparación de las secuencias de BirA y de la HCS humana revela una homología en el extremo carboxilo terminal de ambas enzimas, región correspondiente al dominio de biotinylación de BirA. Sin embargo, la región amino terminal en ambas enzimas no muestra conservación en la secuencia de aminoácidos, ya que esta región en BirA es la que confiere actividad transcripcional y es posible que la pérdida de la capacidad de sintetizar biotina por los eucariontes sea la causa de estas diferencias (Pacheco-Álvarez et al, 2002).

2. Efecto de la biotina sobre la expresión genética

A finales de la década de 1960 y principios de la de 1970, se observó que la biotina, en mamíferos, además de intervenir en las reacciones de carboxilación, participa en la regulación de la transcripción genética y de la estructura cromosómica (Dakshinamurti et al, 1968b; Dakshinamurti et al, 1970). A nivel transcripcional, la biotina puede modificar la estructura de la cromatina, o regular vías metabólicas, tanto positiva como negativamente (Zempleni, 2005).

La biotina participa en la regulación de la transcripción de algunas enzimas que la utilizan como sustrato y grupo prostético: la holocarboxilasa sintetasa (HCS) (Rodríguez-Meléndez et al, 2001; Solórzano-Vargas et al, 2003), la acetil coenzima A carboxilasa 1 (ACC-1), la propionil coenzima A carboxilasa (PCC) (Solórzano-Vargas et al, 2002). Además, esta vitamina actúa en la regulación de otras proteínas que no la requieren como cofactor, como la glucocinasa hepática (Chauhan y Dakshinamurti, 1991), la fosfoenolpiruvato carboxicinasas hepática (Dakshinamurti y Li, 1994), la glucocinasa pancreática (Romero-Navarro et al., 1999), la insulina (Romero-Navarro et al., 1999), la interleucina 2, el receptor de interleucina 2 (Manthey et al, 2002; Rodríguez-Meléndez et al, 2003), y los factores transcripcionales NF- κ B, N-myc, c-myc, N-ras y raf (Scheerger et al, 2003).

En los últimos años han comenzado a delinearse los mecanismos moleculares a través de los cuales la biotina modifica la expresión genética. Se han identificado diferentes vías, no necesariamente excluyentes, que podrían participar en la acción de la vitamina: la activación de la guanilato ciclasa soluble y la biotinilación de histonas (Vilches-Flores y Fernández-Mejía, 2005; Hassan y Zempleni, 2006).

El uso de microarreglos ha revelado un número mucho mayor de genes que son afectados por la biotina. En un estudio se hicieron microarreglos de células humanas mononucleares de sangre periférica (PMBC), y se observó que la suplementación de adultos sanos con 8.8 $\mu\text{mol/día}$ de biotina durante tres semanas provocó un aumento en la expresión de 139 genes y una disminución en la expresión de 131 genes, en comparación con el estado anterior a la suplementación de biotina (Wiedmann et al, 2003). En otro estudio se identificaron 1803 genes dependientes de biotina en células humanas de hepatocarcinoma (HepG2), cultivadas en medios con diferentes concentraciones de biotina (Rodríguez-Meléndez et al, 2006).

Existe evidencia de que los genes dependientes de biotina no se encuentran repartidos al azar en el genoma humano, sino que están acomodados en clusters, con base en su función molecular: proteínas de unión a ADN, proteínas de unión a ARN, genes que tienen actividad traduccional, proteínas de unión a nucleótidos, y proteínas con actividad de transferasa. La existencia de clusters asociados con proteínas de unión a ADN, ARN y nucleótidos, es acorde con la idea de que la vitamina afecta la regulación genética al modificar la estructura de la cromatina o al estimular vías de señalización celular (Zempleni, 2005).

2.1. Activación de la guanilato ciclasa soluble

La biotina es la primera vitamina que se ha demostrado que incrementa la actividad de la enzima guanilato ciclasa. Vesely reportó que la biotina y un compuesto análogo (éster de p-nitrofenil-biotina), en una concentración de 1 μM , aumentan la actividad de la guanilato ciclasa soluble en hígado, riñón, colon, cerebelo y corazón de rata, incrementando los niveles de GMPc originales al doble o triple (Vesely et al, 1982).

Adicionalmente a las evidencias sobre la relación existente entre la biotina y la guanilato ciclasa observada por Vesely, Spence y Koudelka (1984) encontraron que el aumento producido por la biotina en la actividad de la glucocinasa hepática estaba precedido por un incremento en las concentraciones intracelulares de GMPc, lo que sugería que la biotina ejerce su efecto a través de este segundo mensajero. A partir de entonces, diversos estudios han identificado que un denominador común en el efecto de la biotina sobre la expresión genética involucra el incremento en la actividad de la guanilato ciclasa soluble (GCs), la elevación de las concentraciones de guanosil monofosfato cíclico (GMPc) intracelular, y la participación de la proteína cinasa G (PKG) (Chauhan y Dakshinamurti, 1991; De la Vega et al, 2000; Solórzano-Vargas et al, 2002).

Solórzano-Vargas et al (2002) han propuesto que el compuesto biotinil-AMP es el vínculo en la cascada de fosforilaciones involucradas en la regulación de la expresión genética por la biotina. Dicho compuesto es formado por la holocarboxilasa sintetasa en la primera etapa de su acción catalítica. Estos investigadores proponen que el biotinil-AMP, por un mecanismo aún desconocido, activa la guanilato ciclasa soluble, y que, de esta manera, se incrementa el contenido de GMPc, que a su vez activa a la PKG, favoreciendo así una serie de fosforilaciones que modifican la expresión genética (Solórzano-Vargas et al, 2002).

2.2. Biotinilación de histonas

La biotina podría regular la expresión genética mediante la biotinilación de histonas. Hymes et al (1995) observaron *in vitro* que la biotina se une en forma covalente a las histonas gracias a la acción de la biotinidasa. También se ha descubierto que la holocarboxilasa sintetasa puede catalizar la biotinilación de histonas (Narang et al, 2004). *In vivo*, se han detectado histonas biotiniladas en diversos tipos de células como células PBMC (Stanley et al, 2001), células de linfoma (Manthey et al, 2002), células de cáncer pulmonar (Scheerger y Zempleni, 2003), células de coriocarcinoma (Crisp et al, 2004) y eritrocitos de pollo (Peters et al, 2002).

Se ha propuesto que la biotinylación de histonas, similar a otras modificaciones covalentes como la metilación y la acetilación, podría ser parte de los mecanismos a través de los cuales la biotina modifica la expresión genética. Se ha sugerido que la biotinylación de histonas podría estar ligada a la proliferación celular (Stanley et al, 2001) así como a la reparación y replicación del ADN (Peters et al, 2002)

Sin embargo, el grupo de investigación de Polyak publicó que la estreptavidina, proteína de uso común en los estudios de biotinylación de histonas, puede unirse a dichas proteínas de manera independiente del sitio de unión a la biotina presente en la estreptavidina (Bailey et al, 2008). Es importante considerar este artículo, dado que los estudios de biotinylación mencionados emplean estreptavidina como sonda (Stanley et al, 2001; Manthey et al, 2002; Peters et al, 2002; Scheerger y Zempleni, 2003; Crisp et al, 2004). Al parecer, el uso de estreptavidina marcada para detectar histonas biotinyladas no es un método adecuado porque esta molécula es capaz de unirse a las histonas en forma independiente de la biotina, por lo que hay que tener mucho cuidado al interpretar dichos estudios.

3. Efecto de la biotina sobre el metabolismo de carbohidratos

Los estudios de la influencia de la biotina sobre el metabolismo de carbohidratos sentaron las bases para descubrir el efecto de la biotina sobre la expresión genética, y muchos de los genes regulados por la biotina participan a su vez en la regulación del metabolismo de carbohidratos. Estos efectos se han examinado tanto *in vivo* como *in vitro*, en diferentes condiciones fisiológicas, tales como la deficiencia de biotina, el estado fisiológico normal y la diabetes (Vilches-Flores y Fernández-Mejía, 2005).

3.1. Efecto de la deficiencia de biotina

El grupo de Dakshinamurti encontró que las ratas deficientes en biotina presentaban hiperglucemia, y que el contenido de glucógeno hepático y la fosforilación de la glucosa también eran menores en dichos animales, en comparación con los animales control. Los estudios revelaron que la deficiencia de biotina en ratas provoca una disminución de la

actividad de la glucocinasa hepática en un orden de 40% a 45%, y que la administración de biotina restaura la actividad enzimática (Dakshinamurti y Cheah-Tan, 1968a).

Estudios posteriores mostraron que las anomalías en el metabolismo de carbohidratos en ratas deficientes de biotina se debían a la disminución de la actividad de la glucocinasa hepática, enzima clave en la captación posprandial de glucosa por el hígado. El efecto de la biotina sobre la glucocinasa hepática se produce a través de un aumento en la transcripción del gen de la glucocinasa hepática (Chauhan y Dakshinamurti, 1991). También se demostró que la administración de biotina disminuye la transcripción de la enzima gluconeogénica fosfoenolpiruvato carboxicinasa, PEPCCK (Chauhan y Dakshinamurti, 1991). La biotina tiene un efecto semejante a la insulina, al favorecer el catabolismo de la glucosa aumentando el RNA mensajero de la glucocinasa y disminuyendo el RNA mensajero de la PEPCCK (Dakshinamurti y Li, 1994). En mamíferos, ésta es la primera vitamina hidrosoluble de la que se sabe que modifique, tanto en forma positiva como negativa, la transcripción de enzimas críticas para el metabolismo de carbohidratos.

Se ha observado que la deficiencia de biotina afecta el metabolismo del islote pancreático. Estudios realizados en nuestro laboratorio con ratas deficientes de biotina mostraron que la carencia de la vitamina produce una disminución tanto de la actividad como de la abundancia del ARNm de la glucocinasa pancreática, enzima clave en el proceso que permite a la célula β secretar insulina en respuesta a glucosa. Nuestros estudios también revelaron que los islotes pancreáticos aislados de ratas deficientes de biotina presentan una secreción disminuida de insulina en respuesta a glucosa (Romero-Navarro et al, 1999). Asimismo, se sabe que la expresión del gen de la insulina y la secreción de esta hormona en respuesta a glucosa se incrementan con el tratamiento con biotina (Furukawa et al, 1995).

3.2. Efecto de la biotina en condiciones fisiológicas normales

El metabolismo de carbohidratos también sufre alteraciones por la biotina aún cuando no haya deficiencia de esta vitamina. La administración de concentraciones farmacológicas de biotina en ratas cuyo estatus de biotina es suficiente, incrementa la actividad de la

glucocinasa hepática (Dakshinamurti y Cheah-Tan, 1968b). Este efecto se observó tanto en el estado posprandial, situación en la que la glucocinasa se encuentra normalmente aumentada, como en condiciones en las que la actividad de la glucocinasa se encuentra normalmente disminuida, tales como el ayuno o la dieta rica en grasas (Dakshinamurti et al, 1970).

Además, se ha observado en estudios *in vitro* que la biotina altera la expresión genética. En hepatocitos aislados de ratas normales, la biotina incrementa la actividad de la glucocinasa, y, como fue señalado anteriormente en el apartado 2.1, dicho aumento se encuentra precedido por un incremento en las concentraciones intracelulares de GMPc (Spence y Koudelka, 1984). Por otra parte, estudios en nuestro laboratorio demostraron que en cultivos primarios de islotes de ratas normales, el tratamiento con biotina aumenta la actividad y la expresión de la glucocinasa pancreática (Romero-Navarro et al, 1999).

También se ha observado en levaduras que la biotina afecta el metabolismo de carbohidratos. En cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* se encontró que en un medio con alto contenido de biotina aumentan las actividades de la piruvato carboxilasa y de la isocitrato liasa, lo que sugiere que el efecto de la biotina sobre el metabolismo apareció desde etapas tempranas de la evolución (Pejin y Rzamovski, 1996).

3.3. Efecto de la biotina en modelos de diabetes

Diversos estudios han encontrado que la administración de concentraciones farmacológicas de biotina disminuye la hiperglucemia. Pacientes con diabetes tipo 1 tratados durante una semana con biotina, sin recibir insulina exógena, disminuyeron sus concentraciones de glucosa en ayuno (Coggeshall et al, 1985). En un estudio hecho con pacientes diabéticos tipo 2, se encontró que la administración oral diaria de 9 mg de biotina durante un mes disminuyó las concentraciones sanguíneas de glucosa, lactato y piruvato (Maebashi et al, 1993). Nuestro grupo ha encontrado que en pacientes diabéticos tipo 2, el tratamiento con 15 mg de biotina durante 28 días disminuye el área de las curvas de tolerancia a la glucosa (Baez-Saldaña et al, 2004). En modelos de diabetes en animales, como los ratones KK y las

ratas OLETF, también se ha reportado que la biotina disminuye la hiperglucemia (Reddi et al, 1998; Zhang et al, 1996 y 1997).

3.4. Resumen

El estado nutricional de biotina afecta el metabolismo de carbohidratos. La deficiencia de biotina produce hiperglucemia en tanto que concentraciones farmacológicas de biotina revierten la hiperglucemia. Este efecto concuerda con la acción estimulante de la biotina sobre la expresión de genes que favorecen la captación y el catabolismo de glucosa, como la glucocinasa hepática y pancreática, la insulina y el receptor de insulina; en contraste, la biotina disminuye la expresión de la fosfoenol piruvato carboxicinasas, enzima de acción hiperglucemiante que regula la gluconeogénesis.

4. Efecto de la biotina sobre el metabolismo de lípidos

Se ha observado que, en condiciones no deficientes de biotina, el tratamiento con concentraciones farmacológicas de dicha vitamina puede modificar las concentraciones de lípidos en sangre. En la cepa de ratas BHE con predisposición genética para desarrollar hiperglucemia e hiperlipidemia, el tratamiento con biotina disminuyó las concentraciones plasmáticas de lípidos totales (Marshall et al, 1976). En pacientes con aterosclerosis e hipercolesterolemia, la administración de 5 mg de biotina durante 28 días produjo un decremento significativo de las concentraciones de colesterol total; también se observó una disminución, aunque no significativa, de las concentraciones de LDL (Dokusova y Krivoruchenko, 1972). La administración de 900 µg de biotina durante 71 días, en hombres y mujeres sanos, redujo las concentraciones plasmáticas de lípidos totales (Marshall et al, 1980). Nuestro grupo de investigación encontró que el tratamiento con 15 mg de biotina durante 28 días disminuye las concentraciones plasmáticas de triglicéridos totales en pacientes con hipertrigliceridemia (Revilla-Monsalve et al, 2006).

Existe poca información acerca del papel que la biotina pudiera tener como regulador genético del metabolismo de lípidos. El grupo de Stephens encontró que en la línea celular

de adipocitos 3T3-L1, un compuesto derivado de biotina llamado CABI (*chloroacetylated biotin*) inhibe la actividad de la enzima lipogénica ACC-1 y reduce la expresión de los factores de diferenciación PPAR- γ , STAT 1 y STAT 5A, factores transcripcionales que se expresan durante la adipogénesis. Esto sugiere que la biotina podría regular el metabolismo de lípidos a nivel transcripcional (Levert et al, 2002).

5. Efecto de otras vitaminas hidrosolubles sobre la expresión genética en eucariontes

Con el fin de contextualizar el conocimiento de las acciones de la biotina dentro de la información existente acerca del efecto de otras vitaminas hidrosolubles, se hizo una revisión de la influencia de dichas vitaminas sobre la expresión genética, ya que si bien se ha publicado una enorme cantidad de artículos acerca de la manera en que las vitaminas liposolubles afectan la fisiología, y en particular de las vitaminas A y D como reguladores de la expresión genética (Pfahl y Chytil, 1996; Clagett-Dame y DeLuca, 2002; Christakos et al, 2003), son muy escasas las revisiones sobre efectos genéticos de las vitaminas hidrosolubles.

5.1. Ácido fólico

Los folatos son vitaminas hidrosolubles del complejo B, que actúan como cofactores en reacciones necesarias para la biosíntesis de bases púricas y pirimídicas, la síntesis de metionina y la formación de eritrocitos. Su deficiencia está ligada a enfermedades cardiovasculares y degenerativas, anemia megaloblástica, displasia cervical, cáncer, defectos en el desarrollo como paladar hundido y defectos en la formación del tubo neural (Jhaveri et al, 2001; Courtemanche et al, 2004; Katula et al, 2007).

En un primer estudio de microarreglos, hecho con células humanas KB de carcinoma nasofaríngeo, se encontró que la deficiencia de ácido fólico provocó la modificación de ocho genes relacionados con adhesión celular, ciclo celular y formación de citoesqueleto. Dicho estudio consideró únicamente la expresión de oncogenes (Jhaveri et al, 2001).

En otro estudio de microarreglos con linfocitos T humanos, se encontró que la deficiencia de ácido fólico aumentó la expresión de genes que codifican proteínas integrantes de la cadena respiratoria mitocondrial, como son la citocromo c oxidasa, la NADH deshidrogenasa y diversas subunidades de la ATPasa (Courtemanche et al, 2004).

En otro estudio más de microarreglos hecho para observar las consecuencias de la deficiencia de ácido fólico sobre la expresión genética, usando como modelo células normales de fibroblasto humano, los autores publicaron alteraciones en la expresión de 61 genes, donde predominan genes relacionados con señalización celular, formación de citoesqueleto y matriz extracelular. Se observó que la deficiencia de ácido fólico también aumentó la expresión del gen que codifica para la monoglicérido lipasa, enzima del metabolismo de lípidos (Katula et al, 2007).

Así, puede observarse que la deficiencia de ácido fólico provoca cambios en la expresión de genes relacionados con el metabolismo energético, además de su papel tradicional relacionado con la proliferación celular y la síntesis de ADN y ARN.

5.2. Ácido ascórbico (vitamina C)

El ácido ascórbico es necesario para la biosíntesis de colágena (Kurata et al, 1993). En ratas ODS, mutantes con un defecto hereditario en la biosíntesis de esta vitamina, se encontró que dicha deficiencia disminuye las concentraciones del ARNm de la apolipoproteína A1 en el hígado, una proteína que participa en el transporte de colesterol (Ikeda et al, 1996).

También se ha observado que, en cultivos celulares, la vitamina C puede modular la acción de factores transcripcionales sensibles a estrés oxidativo, como AP-1 y NF- κ B. Este efecto no es sorprendente, dado que la vitamina C es considerada el principal antioxidante de origen hidrosoluble (Zhou et al, 2001).

Se ha evaluado la influencia del ácido ascórbico sobre la expresión genética por medio de microarreglos. En un estudio acerca de la diferenciación de células madre a neuronas, se

encontró que esta vitamina induce la expresión de genes relacionados con la neurogénesis, la maduración neuronal y la neurotransmisión (Shin et al, 2004). En otro estudio de microarreglos para estudiar la diferenciación neuronal, se encontró que la vitamina C aumenta la expresión de genes que codifican para proteínas de unión a hierro (ferritina y transferrina), y genes que forman parte de la respuesta celular a especies reactivas de oxígeno, como glutatión peroxidasa (Yu et al, 2004).

Así, los estudios con cultivos celulares han demostrado que el ácido ascórbico puede afectar la expresión genética, sobretodo a través de sus efectos redox. Algunos procesos biológicos que afecta incluyen la respuesta celular al estrés oxidativo, la diferenciación celular, la proliferación celular y la reparación del ADN. Se han estudiado poco los efectos de la vitamina C en la expresión genética *in vivo*. En un artículo acerca del efecto de dicha vitamina sobre la expresión genética del hígado de rata sometido a choque séptico, se encontró que el ácido ascórbico es capaz de inhibir o atenuar el aumento en los niveles del RNA mensajero de proteínas como TNF- α , la sintetasa de óxido nítrico, la hemo oxigenasa 1 y la ciclo oxigenasa 2, cuyo aumento en la transcripción es provocado por el choque séptico (Kim y Lee, 2004). Se ha sugerido que la vitamina C puede modular el factor NF- κ B *in vivo*, factor transcripcional conocido como activador de genes durante la respuesta inmune e inflamatoria (Duarte y Lunec, 2005).

5.3. Tiamina (vitamina B₁)

El difosfato de tiamina sirve como cofactor para varias enzimas participantes en el catabolismo de carbohidratos, como la piruvato deshidrogenasa, la transcetolasa y la α -cetoglutarato deshidrogenasa. Estas enzimas participan en el ciclo de Krebs y en la vía de las pentosas, siendo muy importantes en la biosíntesis de diversos constituyentes celulares como el NADPH y los neurotransmisores acetilcolina y GABA. Pekovich et al (1998) han sugerido que la tiamina y sus derivados fosforilados pueden afectar la expresión de los genes que codifican estas proteínas. Estudiando condiciones de deficiencia y suficiencia de tiamina en cultivos de fibroblastos, linfoblastos y células de neuroblastoma de tejidos humanos, encontraron que la deficiencia de tiamina provoca una disminución en

los RNAs mensajeros de la transcetolasa y la subunidad E1 β de la piruvato deshidrogenasa. Esto indica que la tiamina pudiera regular la expresión de algunos genes que codifican enzimas que utilizan a la tiamina como cofactor (Pekovich et al, 1998).

5.4. Riboflavina (vitamina B₂)

Esta vitamina es necesaria para la formación de coenzimas como el FAD. La deficiencia de riboflavina en rata provoca una disminución acentuada en las actividades de las acil-CoA deshidrogenasas de cadena corta, media y larga (enzimas participantes en la oxidación de ácidos grasos), así como de la flavoproteína de la transferencia de electrones. Nagao y Tanaka (1992) estudiaron los efectos de la deficiencia de riboflavina y demostraron que el FAD regula a estas proteínas por un mecanismo de retroalimentación, aumentando la cantidad del RNA mensajero en la deficiencia de riboflavina. La deficiencia de riboflavina también afecta la traducción, por lo que en dicha condición se observa una disminución, a nivel general, en la síntesis de proteínas (Nagao y Tanaka, 1992).

5.5. Nicotinamida (vitamina B₃)

La nicotinamida es esencial en la formación de las coenzimas NADH o NADPH, necesarias para muchos procesos redox. En células Jurkat tratadas con ácido nicotínico y nicotinamida, se encontró un aumento en el RNA mensajero de las enzimas gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) (Yan et al, 1999). Esto sugiere que los precursores del NADH pueden proteger contra el estrés oxidativo y el daño al DNA, regulando positivamente genes que responden a estrés como GAPDH y G6PDH (Yan et al, 1999).

5.6. Piridoxina (vitamina B₆)

Esta vitamina en su forma activa, fosfato de piridoxal (PLP), tiene un papel crítico en el metabolismo intermediario y es esencial para el crecimiento y el desarrollo normales.

Interviene en numerosas reacciones bioquímicas como transaminación y descarboxilación. Más de cien enzimas requieren PLP como cofactor (Tully et al, 1994, Oka, 1999).

Se sabe que la vitamina B₆ puede servir como un modulador de la acción de hormonas esteroides y como un regulador de la expresión genética de un sin número de proteínas. Concretamente, los niveles intracelulares de PLP alteran la respuesta transcripcional a hormonas esteroides tales como glucocorticoides, progesterona, andrógenos o estrógenos (Tully et al, 1994; Rodríguez-Meléndez, 2002).

También se sabe que la vitamina B₆ desregula la expresión del gen de la glicoproteína humana IIb (Chang et al, 1999). Esta glicoproteína constituye una subunidad del receptor de membrana GPIIb/IIIa en plaquetas, importante en la coagulación. El efecto del fosfato de piridoxal sobre la expresión genética de dicha glicoproteína se traduce en una acción anticoagulante por parte de esta vitamina (Chang et al, 1999). Además, se ha encontrado que el PLP modula negativamente la expresión genética de la albúmina *in vitro*. El PLP inactiva factores transcripcionales hepáticos como HNF-1 y C/EBP en extractos nucleares de hígado de rata (Oka et al, 1995).

5.7. Cobalamina (vitamina B₁₂)

Esta vitamina es necesaria para la función de tres enzimas, la metilmalonil CoA mutasa, la leucina mutasa, y la metionina sintetasa, enzimas relacionadas con el metabolismo de aminoácidos. Se ha demostrado que la cobalamina regula la síntesis de un agente neurotrófico fisiológico, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), en el sistema nervioso central de la rata (Scalabrino et al, 1999). La deficiencia de cobalamina disminuye el RNA mensajero del EGF, mientras que el tratamiento con dicha vitamina restaura los niveles normales del RNA mensajero del EGF y de su proteína correspondiente. También se demostró que la cobalamina inhibe la síntesis de TNF, un agente neurotóxico fisiológico. Es decir, parece que la cobalamina tiene un papel regulador sobre el SNC, importante para el balance entre agentes neurotróficos y neurotóxicos (Rodríguez-Meléndez, 2002).

Como puede observarse en los ejemplos descritos, las vitaminas hidrosolubles tienen diversos efectos sobre la regulación de la expresión genética de varias proteínas. Estos efectos pueden darse a nivel transcripcional y traduccional, abarcando también a proteínas distintas de las enzimas que utilizan a estas vitaminas como cofactores.

6. Metabolismo de lípidos

El tejido adiposo es el órgano con mayor capacidad para almacenar energía. Dicha energía es almacenada en forma de triglicéridos, que pueden provenir de la dieta, o bien, ser sintetizados a partir de otros metabolitos, principalmente azúcares, a través del proceso de lipogénesis. Cuando se requiere de energía, los triglicéridos son hidrolizados por la vía metabólica denominada lipólisis. Estos procesos están regulados por hormonas y por señales energéticas (Frayn, 1998).

6.1. Lipogénesis

La biosíntesis de ácidos grasos *de novo* (lipogénesis) es una actividad metabólica fundamental en la homeostasis energética de los animales. La glándula mamaria, el músculo, el hígado y el tejido adiposo efectúan el proceso de lipogénesis; pero es en estos dos últimos tejidos donde dicha vía metabólica tiene como fin la regulación del balance energético del organismo. La lipogénesis varía entre los mamíferos. En los seres humanos, el hígado es quien tiene un papel central en la síntesis de lípidos; en los roedores, el hígado y el tejido adiposo participan en su síntesis; mientras que en otras especies, como conejos, cerdos, perros, gatos, ovejas y ganado vacuno, el tejido adiposo es el sitio primario de la lipogénesis (Bergen y Mersmann, 2005).

La lipogénesis a partir de carbohidratos utiliza la glucólisis para producir piruvato, que en la mitocondria es convertido a acetil-CoA mediante la piruvato deshidrogenasa, y subsecuentemente en citrato. A través de un acarreador en la membrana mitocondrial, el citrato sale del organelo hacia el citoplasma donde es transformado por la enzima ATP-liasa, en acetil-CoA. La enzima acetil-CoA carboxilasa (ACC-1) adiciona un grupo

carboxilo, y transforma a este compuesto de dos átomos de carbono en un compuesto de tres átomos de carbono, malonil-CoA, molécula que constituye el bloque básico en la síntesis de los ácidos grasos. El malonil-CoA se conjuga con una molécula de acetil-CoA mediante la acción catalítica de otra enzima clave en este proceso, la sintetasa de ácidos grasos (conocida como FAS por sus iniciales en inglés, *fatty acid synthase*). El producto de esta reacción es el acetoacetil-ACP, el cual forma un ácido graso con un mayor número de átomos de carbono, a través del proceso de β -reducción y de la posterior conjugación con otra molécula de malonil-CoA. Este paso se repite hasta formar ácidos grasos de cadena larga (como el palmitato). En esta serie de reacciones se requiere de poder reductor dado por el NADPH, que proviene de la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), enzima de la vía de las pentosas. Las dos enzimas reguladoras principales de la β -reducción son ACC-1 y FAS (Nguyen et al, 2008). Sin embargo, dado que la glucólisis participa en la lipogénesis a partir de glucosa, ciertas proteínas críticas en la glucólisis hepática (como el transportador de glucosa GLUT2, la glucocinasa y la piruvato cinasa) tienen también un papel regulador de la síntesis *de novo* de ácidos grasos. En el adipocito, el transportador de glucosa GLUT4, la hexocinasa II, la piruvato cinasa y la piruvato carboxilasa son parte importante de la vía lipogénica (Large et al, 2004). La figura 3 presenta un esquema de la lipogénesis.

Según Smith y Wood (1998), la biosíntesis de ácidos grasos tiene lugar en dos etapas:

1. La producción de ácidos grasos a partir de precursores sencillos.

El palmitato es el producto principal de estas reacciones, la vía *de novo*, también conocida como β -reducción. Uno de los principales precursores empleados es la glucosa, cuya oxidación a acetil-CoA constituye un paso previo a la formación de palmitato, por lo que la glucólisis es el primer paso en la biosíntesis de ácidos grasos. Por lo tanto, la lipogénesis puede considerarse como una extensión de la glucólisis, y este concepto es apoyado por la observación experimental de que una dieta alta en carbohidratos favorece la lipogénesis.

2. Las modificaciones posteriores de estos ácidos grasos recién producidos.

Los cambios incluyen el alargamiento o acortamiento de cadenas, y la introducción de uno o más enlaces dobles en el ácido graso.

Después de su síntesis, tres moléculas de ácidos grasos de cadena larga se esterifican con una molécula de glicerol para formar triacilglicerol, comúnmente llamado triglicérido. Los triglicéridos sintetizados en el hígado son transportados al tejido adiposo por las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Algunos ácidos grasos sintetizados por el hígado son transportados por la albúmina (Large et al, 2004).

El objetivo de esta tesis es estudiar la influencia de la biotina en la primera etapa, la producción de ácidos grasos a partir de precursores sencillos. La segunda etapa, las modificaciones que sufren los ácidos grasos una vez producidos, o la esterificación de los ácidos grasos con el glicerol para la formación de triglicéridos, no formarán parte de nuestro objeto de estudio.

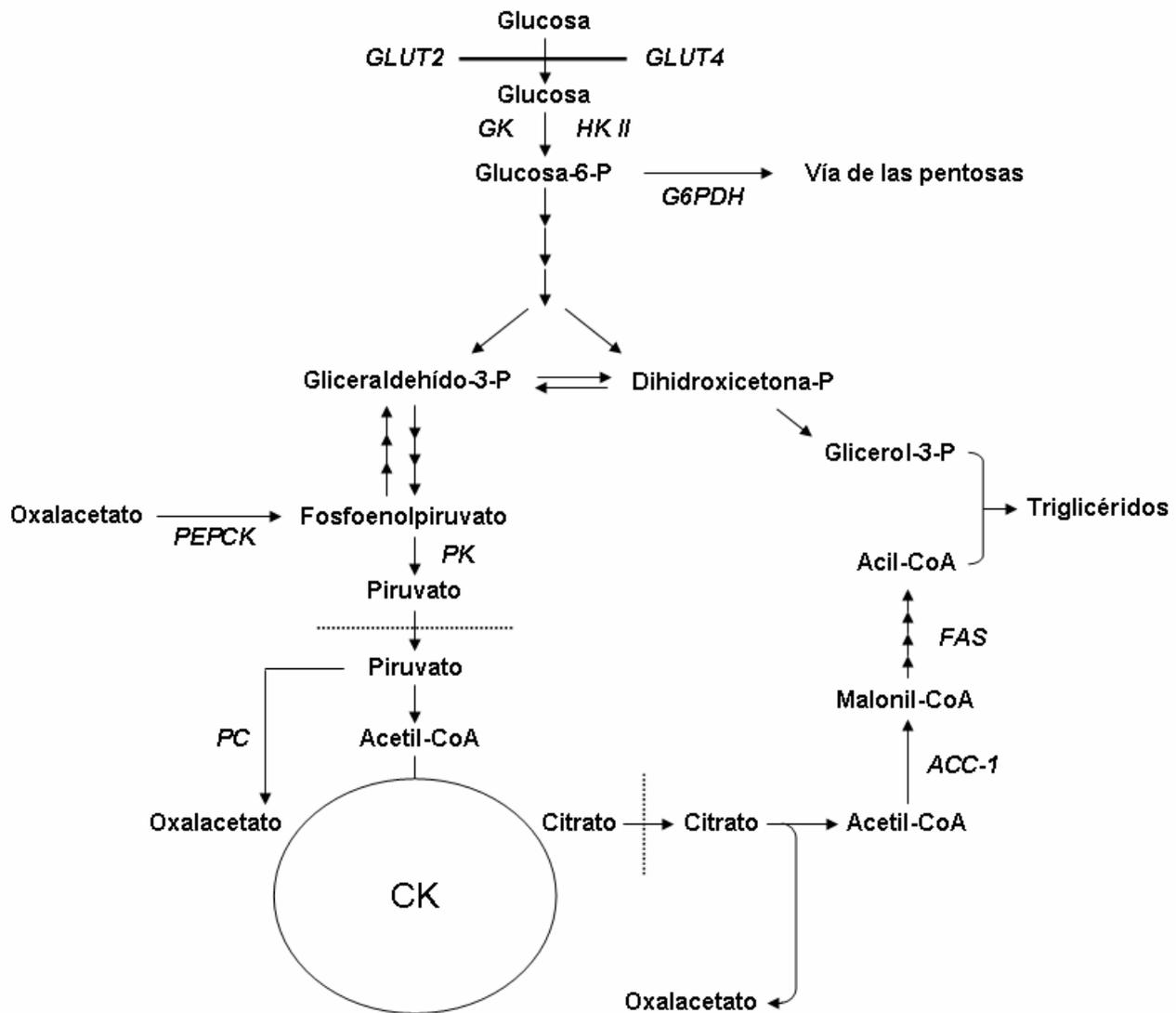


Figura 3. Esquema metabólico de la lipogénesis. En la β -reducción de ácidos grasos se señalan las enzimas reguladoras de esta vía: la acetil-coenzima A carboxilasa citosólica (*ACC-1*) y la sintetasa de ácidos grasos (*FAS*). En el esquema se muestran con letra cursiva otras enzimas: glucocinasa (*GK*), hexocinasa II (*HK II*), piruvato cinasa (*PK*), piruvato carboxilasa (*PC*), fosfoenolpiruvato carboxilasa (*PEPCK*), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (*G6PDH*); y los transportadores de glucosa *GLUT 2* y *GLUT 4*. Las enzimas *ACC-1* y *PC* son carboxilasas dependientes de biotina.

6.2. Factores transcripcionales del metabolismo de lípidos

Se sabe que la lipogénesis es regulada por factores hormonales y nutrimentales como la insulina y ciertos ácidos grasos; además, se ha demostrado que dicha regulación es ejercida a nivel de la expresión genética por factores transcripcionales, entre los que destacan la familia de proteínas SREBP (*sterol regulatory element binding protein*) y la familia de receptores nucleares PPAR (*peroxisome proliferator activated receptor*) (Lee y Evans, 2003; Nguyen et al, 2008).

SREBP-1c. Es un factor transcripcional clave en la lipogénesis. Se expresa en la mayoría de los tejidos, principalmente en hígado, tejido adiposo, músculo y cerebro (Eberlé et al, 2004). SREBP-1c actúa como mediador de la insulina en la expresión de genes del metabolismo de carbohidratos y de lípidos, habiéndose identificado sitios de unión para SREBP-1c en los promotores de enzimas críticas en la síntesis de triglicéridos como la acetil-CoA carboxilasa 1 (ACC-1), la sintetasa de ácidos grasos (FAS), la ATP-citrato liasa, la glicerol-fosfato acil-transferasa, entre otras (Foufelle y Ferré, 2002).

HNF-4alfa. HNF-4 α (*hepatic nuclear factor 4 α*) es indispensable para una adecuada fisiología hepática; además, tiene un papel fundamental en la producción de triglicéridos. HNF-4 α regula la expresión de genes críticos del metabolismo de carbohidratos y de lípidos, como GLUT 2, aldolasa B, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y piruvato cinasa (Stoffel y Duncan, 1997).

PPAR-gama. PPAR- γ se expresa abundantemente en el tejido adiposo y en menor proporción en el hígado (Lazar, 2005). En el hígado, induce genes lipogénicos como la ácido graso sintetasa, la ATP citrato liasa y la acil-CoA sintetasa (Way et al, 2001). En el tejido adiposo tiene un papel fundamental en la diferenciación del adipocito y en la expresión de genes de las diferentes vías del metabolismo de lípidos (Rosen y Spiegelman, 2001). A través de PPAR- γ actúan las tiazolidinedionas (rosiglitazona, pioglitazona), ligandos sintéticos usados terapéuticamente como agentes sensibilizadores a la insulina (Lee y Evans, 2003; Lazar, 2005).

PPAR-alfa. PPAR- α se expresa abundantemente en el hígado y el músculo esquelético. Aumenta directamente la expresión de genes participantes en la captación y oxidación de ácidos grasos (β -oxidación, ω -oxidación), como la acil-CoA oxidasa, la acil-CoA sintetasa y diversas apolipoproteínas (Alemán et al, 2004). Es el blanco molecular de la acción de los fibratos (gemfibrozil, bezafibrato, fenofibrato), agentes terapéuticos que disminuyen los triglicéridos séricos e incrementan moderadamente las lipoproteínas HDL en pacientes con hiperlipidemia (Watts y Dimmit, 1999; Lee y Evans, 2003).

Foxo1. Pertenece a la familia de proteínas *Forkhead box*, de donde proviene su nombre. Este factor transcripcional tiene un papel importante en la homeostasis de glucosa. Favorece la expresión de genes gluconeogénicos como PEPCK, y suprime la expresión de genes glucolíticos y lipogénicos, como glucocinasa y FAS (Zhang et al, 2006; Gross et al, 2008).

Foxa2. Anteriormente llamado HNF-3 β , es un factor transcripcional que también pertenece a la familia de proteínas *Forkhead box*. Foxa2 regula en forma positiva la expresión de genes glucolíticos como glucocinasa y piruvato cinasa, genes lipogénicos como ACC-1 y FAS, y los factores transcripcionales HNF-4 α y Ppar- γ (Wolfrum et al, 2004; Kulkarni y Kahn, 2004).

Foxa1. Otro miembro de la familia *Forkhead box*, es un factor que se ha estudiado muy poco. Actúa como represor de HNF-4 α , GLUT 2 y PK (Duncan et al, 1998; Lantz y Kaestner, 2005).

ANTECEDENTES DIRECTOS DE ESTE PROYECTO

En estudios recientes (Velasco-González et al, 2008) hemos encontrado que ratones que recibieron una dieta suplementada con concentraciones farmacológicas de biotina (97.7 mg biotina libre / kg alimento) durante ocho semanas, presentaron una disminución del 35% en las concentraciones plasmáticas de triglicéridos totales respecto a los ratones que recibieron una dieta control con concentraciones suficientes de biotina (1.75 mg biotina libre / kg alimento). Los niveles plasmáticos de triglicéridos totales en el grupo control o suficiente fueron de 74.2 ± 5.9 mg/ml, mientras que el grupo experimental o suplementado mostró niveles de 48.3 ± 3.6 mg/ml. El efecto hipotrigliceridémico de la biotina, observado en este modelo, coincide con los resultados de otros autores que han encontrado que concentraciones farmacológicas de biotina reducen las concentraciones de triglicéridos en sangre (véase el apartado 4 de la introducción).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Diversos estudios hechos por nosotros y por otros autores han encontrado que la administración de concentraciones farmacológicas de biotina reduce los niveles de triglicéridos en sangre; sin embargo, se desconoce cuáles son los mecanismos que participan en dicho efecto. En este trabajo estudiamos el efecto de la administración de concentraciones farmacológicas de biotina sobre la expresión de genes lipogénicos.

HIPÓTESIS

El efecto hipotrigliceridémico de la biotina podría estar ligado a una reducción en la expresión de genes que participan en la lipogénesis.

OBJETIVO GENERAL

Analizar la influencia de la biotina sobre la expresión de diversos genes lipogénicos en hígado y tejido adiposo de ratón.

OBJETIVO PARTICULAR

Analizar cambios en la abundancia del ARN mensajero de genes lipogénicos, debido a la administración de concentraciones farmacológicas de biotina.

MÉTODOS

Modelo experimental

Ratones de la cepa BALBc/AnN de 21 días de nacidos se dividieron en dos grupos. El grupo control (suficiente) recibió una dieta que contiene 4 mg biotina total por kg de alimento (equivalente a 1.75 mg biotina libre por kg de alimento) (TD-01362, Harlan Teklad)¹. El grupo experimental (suplementado) recibió una dieta similar en composición de todos los nutrientes (TD-02458, Harlan Teklad), pero cuya cantidad de biotina fue de 100 mg biotina total por kg de alimento (equivalente a 97.75 mg biotina libre por kg de alimento)². La duración de las dietas fue de ocho semanas. En la tabla 1 se presenta la composición de ambas dietas.

Componente	Suficiente TD-01362 (g/kg alim)	Suplementada TD-02458 (g/kg alim)	Calorías (cal/kg alim)	Proteínas (g/kg alim)
Sólidos de clara de huevo	300	300	141	270
Dextrosa monohidratada	537.39	537.39	2149.56	
Aceite de maíz	100	100	904.58	
Celulosa	20	20		
Mezcla de minerales	35	35		
Fosfato dibásico de calcio	3.41	3.41		
Color vegetal rojo	0.1	0		
Biotina	0.004 total (0.00175 libre)	0.100 total (0.0977 libre)		
Vitamina B12	0.030	0.030		
Pantotenato de calcio	0.066	0.066		
Dihidrógeno citrato de colina	3.497	3.497		
Acido fólico	0.002	0.002		
Menadiona	0.050	0.050		
Niacina	0.099	0.099		
Piridoxina HCl	0.022	0.022		
Riboflavina	0.022	0.022		
Tiamina HCl	0.022	0.022		
Palmitato seco de vitamina A	0.040	0.040		
Vitamina D3 (colecalfiferol)	0.004	0.004		
DL-Alfa Tocoferil Acetato	0.242	0.242		

Tabla 1. Composición de la dieta.

¹ Las concentraciones suficientes se definen como las concentraciones de biotina en el alimento que satisfacen los requerimientos fisiológicos de esta vitamina (4 mg biotina total / kg peso alimento, equivalente a 1.75 mg biotina libre / kg peso alimento). Las concentraciones farmacológicas se definen como las concentraciones de biotina en el alimento que mantienen niveles séricos farmacológicos de esta vitamina (100 mg biotina total / kg peso alimento, equivalente a 97.7 mg biotina libre / kg peso alimento).

² Ambas dietas contienen 300 g de clara de huevo por kilogramo de alimento, lo que aporta 150 mg de avidina por kilogramo de alimento. Se considera que 1 mg de avidina se une a 15 µg de biotina. Entonces, 150 mg de avidina se unen a 2.25 mg de biotina. Por lo tanto, la dieta suficiente TD-01362, con 4 mg de biotina total por kilogramo de alimento, contiene 1.75 mg de biotina libre por kilogramo de alimento, cantidad que cumple con los requisitos diarios de la vitamina (Báez-Saldaña y Ortega, 2004). De manera similar, la dieta suplementada TD-02458, con 100 mg de biotina por kilogramo de alimento, contiene 97.75 mg de biotina libre por kilogramo de alimento.

Extracción de RNA y obtención de cDNA

Al final del período de tratamiento se aisló el RNA total con Trizol® como se describirá en el siguiente párrafo. El material empleado fue previamente esterilizado y tratado con dietilpicrocarbonato (DEPC) para evitar la degradación del RNA.

Se homogenizaron 50-100 mg del tejido en 1 mL de Trizol® (Invitrogen) por 20 segundos, en un baño de hielo. El homogenado se transfirió a un tubo eppendorf, se incubó la muestra por 5 minutos a temperatura ambiente con agitación, se agregó cloroformo y se agitó vigorosamente 15 segundos, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente sin agitación, se centrifugó 15 minutos a 11,000 rpm. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo, se le añadió isopropanol, se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente para precipitar el RNA total, se centrifugó 10 minutos a 11,000 rpm, se removió el sobrenadante, se lavó el pellet de RNA con etanol al 75%, se centrifugó 5 minutos a 8,800 rpm, se retiró el etanol, se disolvió el RNA en agua tratada con DEPC, y se almacenó a -70° C.

La cantidad y pureza del RNA fue determinada por espectrofotometría, la integridad del RNA fue analizada por electroforesis en gel de agarosa con formaldehído. En el caso de la espectrofotometría, se considera que si la muestra tiene un cociente de valores de absorbancia $A_{260}/A_{280} > 1.6$, es aceptable la pureza del RNA obtenido. Para verificar que el RNA no esté degradado, en la electroforesis con gel de agarosa deben observarse las bandas correspondientes a los RNAr 18S y 28S, y que la banda del 28S sea mayor en tamaño e intensidad que la banda del 18S.

A partir del RNA total del tejido a estudiar, se obtuvo el cDNA mediante transcripción inversa. Se hizo una reacción con un volumen final de 20 μ L que contiene 500 ng de RNA, desoxinucleótidos, DTT, oligo dT y la enzima transcriptasa reversa (Invitrogen); se incubó a 37° C una hora. El cDNA obtenido se guardó a -20° C.

PCR en tiempo real

Applied Biosystems fabrica ensayos estandarizados para cuantificar la expresión genética por PCR en tiempo real (TaqMan® Gene Expression Assays). Estos ensayos permiten medir la síntesis de productos de PCR mediante fluorescencia, cada ensayo contiene dos oligonucleótidos de inicio y una sonda marcada con un fluoróforo. En la tabla 2 se presentan los ensayos utilizados en este trabajo, que pueden solicitarse mediante su identificación a Applied Biosystems.

Gen de interés (símbolo)	Identificación en Applied Biosystems (<i>Assay ID</i>)	Número de acceso en GenBank
ACC-1	Rn00672936_g1	NM_022193.1
FAS	Mm00662303_g1	NM_007988.3
FOXA1	Mm00484713_m1	NM_008259.2
FOXA2	Mm00839704_mH	NM_010446.2
FOXO1	Mm00490672_m1	NM_019739.2
G6PDH	Rn00566576_m1	NM_017006.1
GLUT 2	Rn00563565_m1	NM_012879.2
GK	Rn00561265_m1	NM_012565.1
HNF-4 α	Mm00433964_m1	NM_008261.2
PC	Mm00500992_m1	NM_008797.1
PEPCK	Mm00440636_m1	NM_011044.1
PFK-1	Rn00566132_m1	NM_013190.4
PK	Mm00443090_m1	NM_013631.2
PPAR- α	Mm00440939_m1	NM_011144.6
PPAR- γ	Mm00440945_m1	NM_013124.1
RNAr 18S	Part No. 4319413E	X03205.1

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

La mezcla de reacción, con un volumen final de 12 μ L, contiene 25 a 100 ng de cDNA de la muestra, 6 μ L de solución amortiguadora (TaqMan® Universal PCR Master Mix) y 600 nL del ensayo (TaqMan® Gene Expression Assays).

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

Análisis de expresión relativa

Se calculó la expresión relativa de cada gen con el método de la doble diferencia del parámetro C_T . Este método sirve para calcular la expresión de un gen de interés en relación a otro gen que funge como control interno. El C_T se define como el ciclo del PCR en el cual la señal del fluoróforo alcanza un umbral determinado arbitrariamente (C_T significa *cycle threshold*, es decir, umbral de ciclos) (Schmittgen y Livak, 2008). La expresión relativa (ER) se calcula de acuerdo a la ecuación 1, cuya deducción puede consultarse en las referencias (Livak y Schmittgen, 2001; Applied Biosystems, “User Bulletin No. 2”):

$$ER = 2^{-\Delta\Delta C_T} \quad (1)$$

Esta ecuación permite comparar la expresión genética de dos muestras (muestra A y B). En este trabajo se utilizó el gen correspondiente al RNAr 18S como control interno, ya que su expresión no cambia debido a la biotina. La muestra A corresponde al grupo suplementado de ratones, la muestra B corresponde al grupo suficiente de ratones. Así, la doble diferencia del C_T de la ecuación 1 puede escribirse en su forma completa:

$$\Delta\Delta C_T = (C_T \text{ gen de interés} - C_T \text{ control interno})_A - (C_T \text{ gen de interés} - C_T \text{ control interno})_B$$

Por ejemplo, si tenemos los siguientes valores de C_T para dos muestras de hígado:

Muestra	C_T (18 S)	C_T (FAS)
A (SUP)	12.14	19.79
B (SUF)	11.93	18.65

Podemos calcular cambios en la expresión relativa del gen de la enzima FAS (ácido graso sintetasa). La doble diferencia del C_T se calcula como sigue:

$$\Delta\Delta C_T = (C_T \text{ gen de interés} - C_T \text{ control interno})_A - (C_T \text{ gen de interés} - C_T \text{ control interno})_B$$

$$\Delta\Delta C_T = (C_T \text{ FAS} - C_T \text{ 18S})_A - (C_T \text{ FAS} - C_T \text{ 18S})_B$$

$$\Delta\Delta C_T = (19.79 - 12.14) - (18.65 - 11.93)$$

$$\Delta\Delta C_T = 0.93$$

Y la expresión relativa se calcula de acuerdo a la ecuación 1:

$$ER = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

$$ER = 2^{-0.93}$$

$$ER = 0.52$$

Lo que significa que la expresión relativa de FAS de la muestra obtenida del ratón suplementado es de 0.52 respecto a la expresión relativa de la muestra obtenida del ratón suficiente. Es decir, en el ratón suplementado la expresión de FAS disminuye a la mitad respecto a su expresión en el ratón suficiente. En una gráfica lo representaríamos de esta manera:

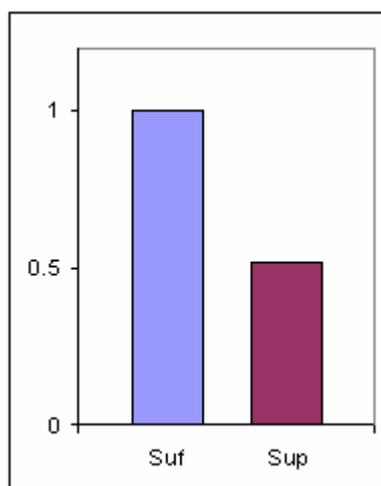


FIGURA 4. Ejemplo. Expresión relativa del RNA mensajero de la enzima FAS en hígado, debido a la suplementación con biotina ($n = 1$).

Análisis estadístico

Todos los datos se presentan como media \pm error estándar, en donde n indica el número de sujetos evaluados. Las diferencias significativas se evaluaron por la prueba t de Student, usando el programa Microcal Origin versión 6. El nivel de significancia fue de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Con el fin de determinar el mecanismo por el cuál la administración de concentraciones farmacológicas de biotina reduce los triglicéridos plasmáticos, se evaluó por PCR cuantitativo en tiempo real la expresión de genes que codifican factores transcripcionales y enzimas cuya importancia es crítica en la lipogénesis.

1. EXPRESIÓN DE GENES EN EL HÍGADO

1.1. METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS

1.1.1. Enzimas glucolíticas

La comparación en la expresión de la abundancia del ARNm de las enzimas glucolíticas, entre los animales que recibieron la dieta control y los que recibieron la dieta suplementada con biotina, reveló una marcada disminución del ARNm de la fosfofructocinasa (PFK-1) en el hígado de los ratones que recibieron la dieta suplementada con biotina con respecto al grupo control (0.38 ± 0.05). También se encontraron reducciones significativas en la abundancia del ARNm de piruvato cinasa (PK) (0.64 ± 0.10). No hubo diferencias significativas en la expresión de la glucocinasa (GK) (1.04 ± 0.16) [FIGURA 5].

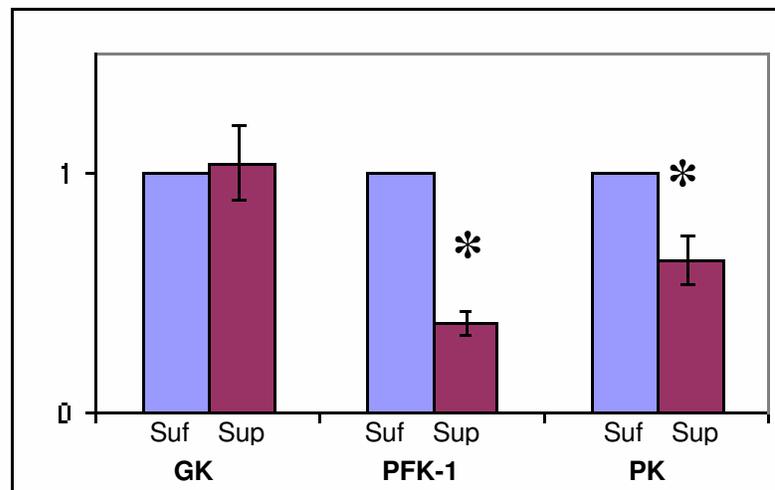


FIGURA 5

Expresión relativa del ARN mensajero de tres enzimas glucolíticas, en función del tratamiento con biotina (Suf = dieta suficiente, Sup = dieta suplementada). Enzimas: GK, glucocinasa; PFK-1 fosfofructocinasa 1; PK, piruvato cinasa. $n = 6 - 12$ muestras, *: $p < 0.01$

1.1.2. Enzimas gluconeogénicas

En nuestro modelo experimental de suplementación de biotina, no encontramos cambio alguno en la abundancia del ARN mensajero de la enzima PEPCK respecto al grupo control (0.93 ± 0.10). En cambio, los resultados muestran una disminución en la abundancia del ARN mensajero de la enzima PC (0.62 ± 0.10) [FIGURA 6].

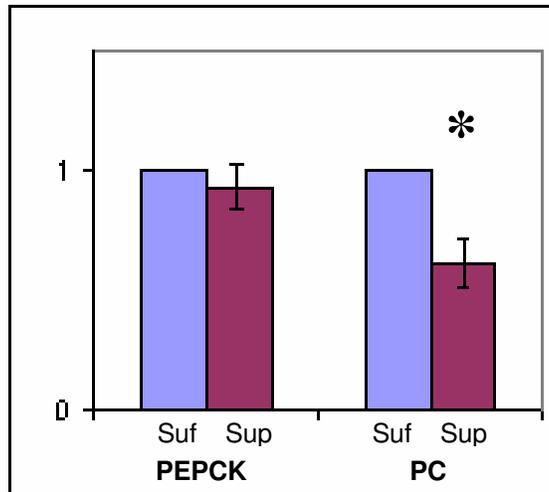


FIGURA 6

Expresión relativa del ARN mensajero de dos enzimas gluconeogénicas, en función del tratamiento con biotina. PEPCK, fosfoenolpiruvato carboxilasa; PC, piruvato carboxilasa. $n = 9 - 12$ muestras, *: $p < 0.01$

1.1.3. Transportador de glucosa

Finalmente, se evaluó la expresión relativa del ARN mensajero de GLUT2, proteína que en el hígado participa tanto en la captación de glucosa, como primer paso de la glucólisis, como en la liberación de la glucosa, último paso de la gluconeogénesis. Los resultados demostraron que la suplementación de biotina disminuye la expresión relativa de GLUT2 (0.47 ± 0.11) [FIGURA 7].

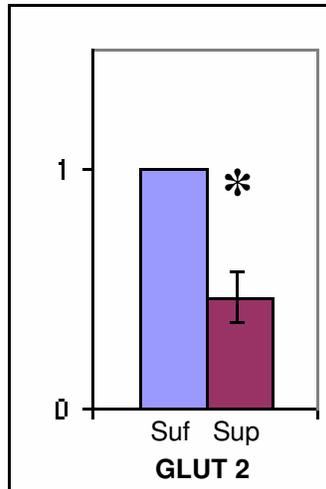


FIGURA 7

Expresión relativa del ARN mensajero del transportador de glucosa en hígado GLUT2, en función del tratamiento con biotina. $n = 7$ muestras, *: $p < 0.01$

1.2. METABOLISMO DE LÍPIDOS

Evaluamos la expresión relativa de tres enzimas reguladoras de la β -reducción, para determinar el efecto de la biotina sobre la abundancia del ARN mensajero.

1.2.1. Enzimas de la β -reducción

Analizamos el efecto de la suplementación de biotina sobre la acetil-coenzima A carboxilasa 1 (ACC-1), enzima reguladora de la lipogénesis. No se observaron cambios en la expresión relativa de esta enzima debido al tratamiento con biotina (0.91 ± 0.06) [FIGURA 8]. Se encontró disminuída la abundancia del ARN mensajero de la siguiente enzima reguladora de la lipogénesis, la sintasa de ácidos grasos (FAS) (0.63 ± 0.06) [FIGURA 8].

También se midió la abundancia del ARN mensajero de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH), primera enzima de la vía de las pentosas fosfato que también participa en la β -reducción de ácidos grasos, a través de la formación del NADPH, sustrato necesario para la lipogénesis. La abundancia del ARN mensajero de G6PDH se encontró

aumentada (1.86 ± 0.34) significativamente en el grupo experimental que recibió la dieta suplementada con biotina [FIGURA 8].

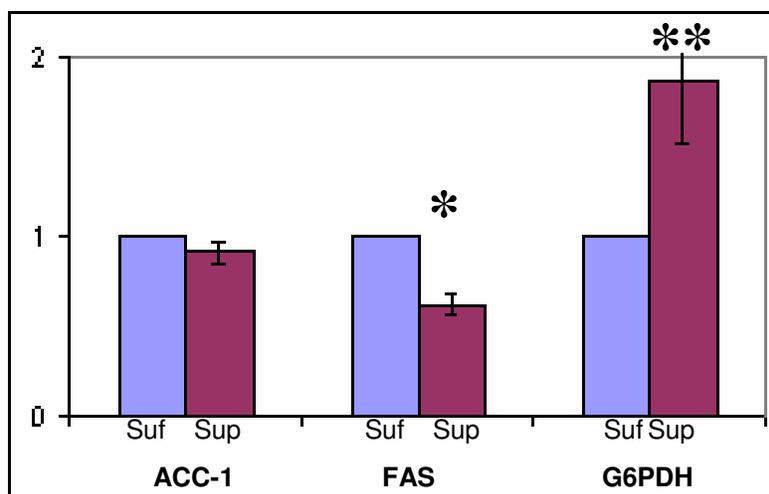


FIGURA 8

Expresión relativa del ARN mensajero de enzimas, en función del tratamiento suplementado con biotina. ACC-1: acetil coenzima A carboxilasa 1, FAS: sintasa de ácidos grasos, G6PDH: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. $n = 13, 12$ y 20 muestras respectivamente; *: $p < 0.01$, **: $p < 0.05$

1.3. FACTORES TRANSCRIPCIONALES DEL METABOLISMO DE LÍPIDOS Y CARBOHIDRATOS

También se analizó la abundancia de factores transcripcionales críticos en el metabolismo de carbohidratos y lípidos. Se observaron reducciones significativas ($P < 0.05$) en la expresión de Srebp-1c (0.57 ± 0.09), HNF-4 α (0.73 ± 0.07), Foxa1 (0.64 ± 0.09) y Foxa2 (0.61 ± 0.05) [FIGURA 9]. En contraste, no se observaron cambios en la expresión relativa de los factores transcripcionales PPAR-alfa (1.06 ± 0.16), PPAR-gama (0.97 ± 0.11) y Foxo1 (1.03 ± 0.09) [FIGURA 10].

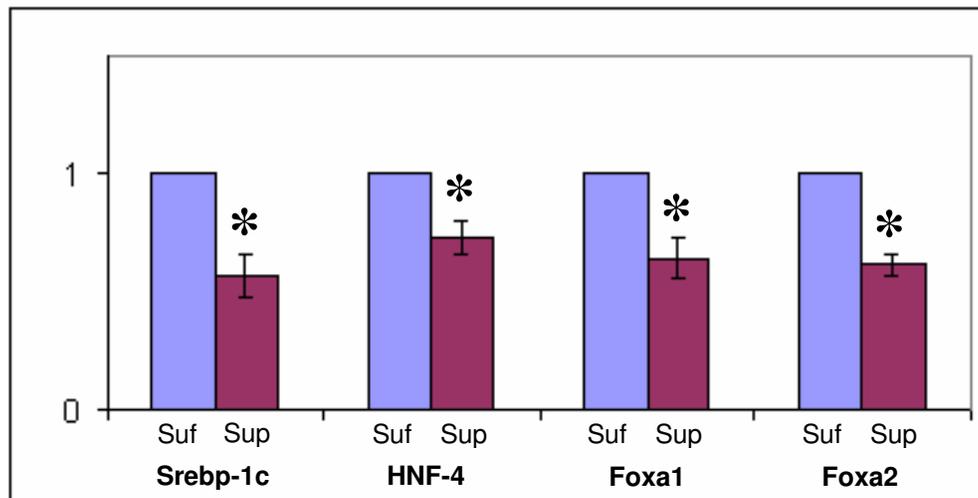


FIGURA 9

Expresión relativa de factores transcripcionales en hígado aislado de ratones bajo suplementación de biotina. Todos estos factores presentan una disminución significativa en su expresión respecto al grupo de ratones con dieta suficiente de biotina, cuya expresión está normalizada a 1. Sterol element binding protein 1c (Srebp-1c), Forkhead box a2 (Foxa2), Hepatic nuclear factor 4 α (HNF-4), Forkhead box a1 (Foxa1), sterol element binding protein 2 (Srebp-2). $n = 8 - 9$ muestras, *: $p < 0.01$

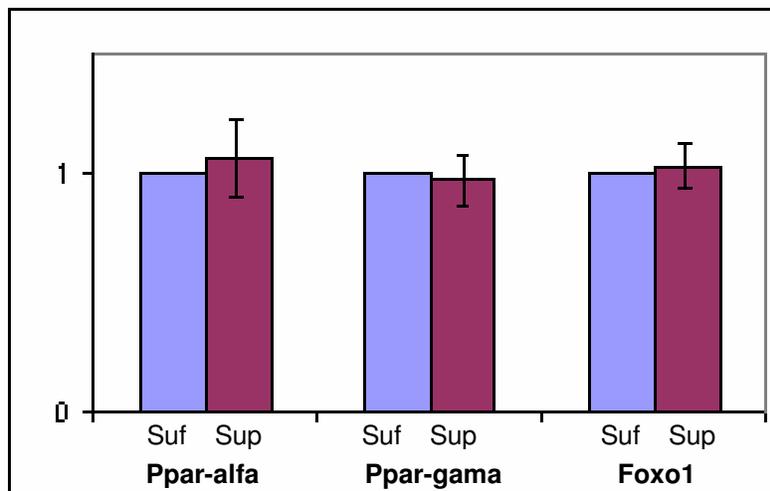


FIGURA 10

Expresión relativa de factores transcripcionales en hígado aislado de ratones bajo suplementación con biotina: Forkhead box o1 (Foxo1), Peroxisome proliferator receptor alpha (Ppar-alfa), Peroxisome proliferator activated receptor gamma (Ppar-gama). $n = 8 - 9$ muestras.

2. EXPRESIÓN DE GENES EN EL TEJIDO ADIPOSO

2.1. FACTORES TRANSCRIPCIONALES DEL METABOLISMO DE LÍPIDOS Y CARBOHIDRATOS

En los ratones sometidos a tratamiento suplementado, se observaron disminuciones en la expresión de los factores transcripcionales Srebp-1c (0.58 ± 0.11), PPAR-alfa (0.47 ± 0.05) y Ppar-gama (0.73 ± 0.10). El factor transcripcional HNF-4 α mostró una tendencia a disminuir que no es significativa (0.63 ± 0.18) ($P > 0.05$) [FIGURA 11].

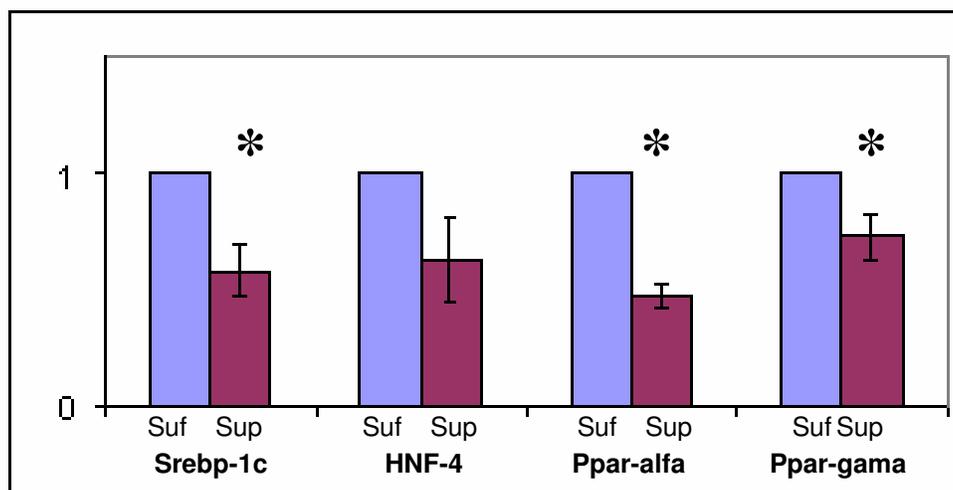


FIGURA 11

Expresión relativa de factores transcripcionales en tejido adiposo aislado de ratones bajo suplementación con biotina. Sterol element binding protein 1c (Srebp-1c), Hepatic nuclear factor 4 α (HNF-4), Peroxisome proliferator activated receptor -alfa o -gama (Ppar-alfa, Ppar-gama). $n = 4 - 5$ muestras, *: $p < 0.01$

2.2. ENZIMAS DE LA β -REDUCCIÓN

El análisis de la abundancia de los ARN mensajeros de los genes conocidos por ser regulados por Srebp-1c, reveló una disminución significativa en su expresión. Dicha disminución se observó en la expresión relativa de los genes que codifican las enzimas ACC-1 (0.44 ± 0.05), FAS (0.48 ± 0.14) y G6PDH (0.65 ± 0.10) [FIGURA 12].

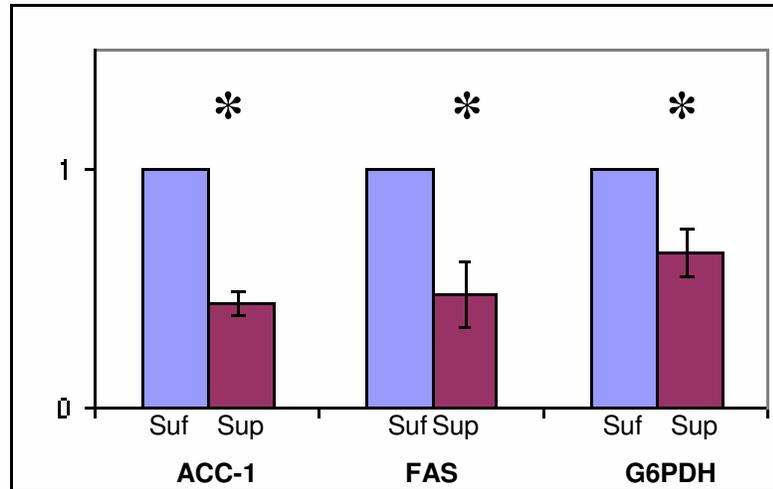


FIGURA 12

Expresión relativa de enzimas de la β -reducción en tejido adiposo: Acetil coenzima A carboxilasa 1 (ACC-1), sintasa de ácidos grasos (FAS), glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH).
 $n = 4 - 5$ muestras, *: $p < 0.01$

2.3. ENZIMAS GLICERONEOGENICAS

Además, se observó una disminución significativa en la expresión del ARN mensajero que codifica dos enzimas reguladoras de la gliceroneogénesis: fosfoenolpiruvato carboxicinas (0.59 \pm 0.08) y piruvato carboxilasa (0.68 \pm 0.11) [FIGURA 13].

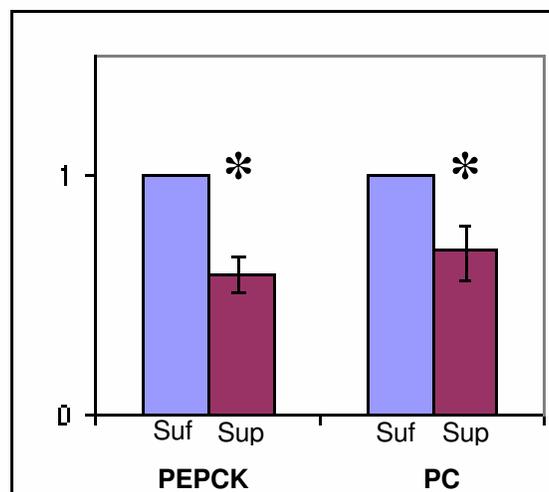


FIGURA 13

Expresión relativa de enzimas gliceroneogénicas en tejido adiposo obtenido de ratones suplementados con biotina: fosfoenolpiruvatocarboxicinas (PEPCK) y piruvato carboxilasa (PC)
 $n = 5$ muestras, *: $p < 0.01$

DISCUSIÓN

Diversos estudios han revelado una correlación entre el uso de concentraciones farmacológicas de biotina y la disminución de las concentraciones plasmáticas de triglicéridos (Revilla-Monsalve et al, 2006; Velasco-González et al, 2008). Sin embargo, se desconocen los mecanismos moleculares mediante los cuáles esta vitamina produce dicho efecto. Nuestro grupo de investigación observó con anterioridad que la administración durante ocho semanas de una dieta con concentraciones farmacológicas de biotina redujo 35% las concentraciones plasmáticas de triglicéridos en ratones BalbC (Velasco-González et al, 2008). En este trabajo investigamos los cambios en la expresión de diferentes enzimas que participan en el metabolismo de lípidos, particularmente en la lipogénesis. Acorde con el efecto hipotrigliceridémico de la vitamina, los resultados obtenidos en este trabajo revelaron que concentraciones farmacológicas de biotina disminuyeron la abundancia del ARNm de enzimas y factores transcripcionales que participan en esta vía.

En nuestros estudios se encontró que en el hígado, la abundancia del ARNm del factor transcripcional lipogénico SREBP-1c disminuyó en respuesta a la vitamina. SREBP-1c es un factor transcripcional indispensable para la lipogénesis, ya que induce la expresión de genes como PK, FAS, GLUT2 y ACC-1 (Foufelle y Ferré, 2002; Ferré y Foufelle, 2007). Acorde con su reducción, el ARNm de FAS, GLUT2, PK, proteínas cuya expresión se sabe que está regulada por este factor, se encontró disminuido, lo que sugiere una inhibición de la lipogénesis debido al tratamiento con concentraciones farmacológicas de biotina. De manera interesante, otras enzimas lipogénicas que son transcripcionalmente dependientes de SREBP-1c, como ACC-1 y G6PDH, no decrecieron su expresión. No acorde con la disminución del ARNm de SREBP-1c, observamos un marcado aumento en la expresión de la G6PDH, una enzima que, a diferencia de otras enzimas lipogénicas, también participa en procesos biológicos como la protección al estrés oxidativo y el crecimiento (Salati y Amir-Ahmady, 2001), y por ende es regulada por diversas hormonas y factores (Kletzien et al, 1994). Además, a diferencia de otros genes lipogénicos cuya expresión depende fuertemente de la regulación de su transcripción, en la expresión de esta enzima también participa la eficiencia en el procesamiento de su ARNm (Salati y Amir-Ahmady, 2001).

Estas características particulares de la G6PDH, con respecto a otras enzimas lipogénicas, podrían explicar la discrepancia entre la reducción en la expresión del factor transcripcional SREBP-1c y el aumento observado en su ARNm. La falta de efecto de concentraciones farmacológicas de biotina sobre la expresión de ACC-1 observada en nuestros estudios se discutirá más adelante.

También analizamos la expresión de enzimas glucolíticas que forman parte de la lipogénesis *de novo*. Encontramos que la ingesta de concentraciones farmacológicas de biotina durante ocho semanas no modificó la abundancia del ARNm de la glucocinasa. En contraste, se observó una marcada disminución de la fosfofructocinasa-1 (PFK-1) y la piruvato cinasa hepática (PK). Estos cambios difieren del efecto sobre la actividad y la abundancia del ARNm de estas enzimas reportado por otros autores, que utilizan distintos modelos experimentales, y que a continuación se mencionan. En el hígado de ratas diabéticas se encontró que, a las veinticuatro horas de la administración aguda de una dosis única de biotina (1-2 mg/kg peso), se produjo un aumento de las actividades de la glucocinasa, de la fosfofructocinasa-1 y de la piruvato cinasa (Dakshinamurti et al, 1970). En ratas normales en ayuno, condición en la cual la expresión de la glucocinasa se encuentra disminuida, se observó que la administración intraperitoneal de biotina (2 mg/kg) incrementó la abundancia del ARN mensajero de glucocinasa. Dicho aumento fue aparente únicamente durante las primeras dos horas después de la inyección de biotina, no observándose diferencias en tiempos posteriores, en tanto que bajo estas mismas condiciones, se mantuvo por veinticuatro horas el efecto de la biotina sobre la actividad de la glucocinasa (Chauhan y Dakshinamurti, 1991). El efecto positivo de la biotina también se observó en hepatocitos de rata cultivados (Spence y Koudelka, 1984). Las discrepancias observadas en los efectos de concentraciones farmacológicas de biotina, entre los estudios hechos por otros autores y los reportados en este trabajo, podrían explicarse por las siguientes razones. Primera: diferencias en la administración de la biotina. La ingesta de biotina en nuestros ratones fue de aproximadamente 16.6 mg/kg de peso al día durante ocho semanas de dieta, en tanto que en los otros estudios se administró una dosis única intraperitoneal de 1-2 mg/kg peso. Segunda: diferente sensibilidad a los efectos sistémicos de la biotina entre especies y cepas. Diversos estudios han encontrado que los ratones son

menos sensibles a los efectos de concentraciones suprafisiológicas de biotina que las ratas (Watanabe y Endo, 1989). Tercera: distinta regulación de estas enzimas entre especies. Estudios por Ureta et al (1971) encontraron diferencias en la regulación de la glucocinasa entre las ratas albinas y los ratones BalbC. En contraste con el aumento de la glucocinasa en respuesta a una dieta rica en carbohidratos en las ratas, la actividad de la glucocinasa no se vio modificada en los ratones BalbC. De igual manera, en los ratones, la ingesta de una dieta alta en grasas y baja en carbohidratos produce una menor reducción en la actividad de la glucocinasa que la observada en las ratas. Cuarta: diferencias en el estado metabólico del modelo experimental. Es posible que la diferencia en la regulación de estos genes esté ligada a la presencia de insulina, la cuál podría enmascarar el efecto de la biotina. Por ejemplo, estudios hechos por Dakshinamurti observan diferencias entre el efecto de la biotina sobre la expresión del ARNm de la PEPCK, en animales diabéticos (Dakshinamurti y Li, 1994) y no diabéticos (Chauhan y Dakshinamurti, 1991). Esta razón podría también explicar porqué en nuestros experimentos en ratones no diabéticos no observamos cambios en la abundancia del ARNm de la PEPCK en respuesta a la dieta suplementada con biotina.

Nuestros resultados muestran disminuciones en la expresión de Foxa2 y HNF-4 α , dos factores transcripcionales críticos en el funcionamiento del hígado. Foxa2 regula en forma positiva la expresión de genes glucolíticos como glucocinasa y piruvato cinasa, genes lipogénicos como ACC-1 y FAS, y los factores transcripcionales HNF-4 α y Ppar- γ (Wolfrum et al, 2004; Kulkarni y Kahn, 2004). HNF-4 α tiene un papel fundamental en la producción de triglicéridos, de manera independiente a la lipogénesis estimulada por Srebp-1c (Hayhurst et al, 2001). HNF-4 α también regula la expresión de genes críticos del metabolismo de carbohidratos, como GLUT2, aldolasa B, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (1,3-BGD) y piruvato cinasa (Stoffel y Duncan, 1997); y genes del metabolismo de lípidos, como la acil-CoA deshidrogenasa de cadena media (MCAD), la proteína microsomal de transferencia de triglicéridos (MTP) y siete distintas apolipoproteínas (Hayhurst et al, 2001). En nuestro estudio, la reducción en la expresión de HNF-4 α se encuentra acorde con la disminución en la expresión de Foxa2. Asimismo, la reducción de HNF-4 α y de Foxa2 podría estar ligada a la disminución en la expresión de

GLUT2 y PK. Esta última enzima además está regulada por Srebp-1c, factor transcripcional cuya expresión también disminuye por acción de la biotina.

El tratamiento con biotina también disminuyó la abundancia del ARN mensajero de Foxa1, un regulador crítico de la homeostasis metabólica, cuyo papel en el hígado se ha estudiado muy poco. El grupo de Stoffel ha sugerido que Foxa1 es un represor de HNF-4 α , GLUT2 y PK (Duncan et al, 1998; Lantz y Kaestner, 2005). En nuestros resultados encontramos una disminución significativa en la abundancia del ARNm de Foxa1, pero esto no se traduce en un aumento en la abundancia del ARNm de HNF-4 α , GLUT2 y PK; ya que estas proteínas mostraron una disminución en la abundancia de su ARN mensajero.

Foxo1 es un factor transcripcional que favorece la expresión de genes gluconeogénicos y suprime la expresión de genes de enzimas glucolíticas y lipogénicas (Zhang et al, 2006; Gross et al, 2008). En nuestro estudio no hubo diferencias en la expresión hepática de Foxo1 entre el grupo control y el grupo suplementado con biotina. La falta de efecto observada en la expresión del ARN mensajero de Foxo1 difiere de la reducción de este factor producida por la administración de biotina en ratas tratadas con estreptozotocina, observada por Sugita y colaboradores (2008). Como se señaló anteriormente, es posible que las diferencias encontradas en el efecto de la biotina, sobre la expresión de genes en modelos diabéticos y no diabéticos, estén ligadas a un enmascaramiento de las acciones de la vitamina debido a la presencia de insulina. Por otro lado, nosotros especulamos que, dado que Foxo1 es regulador positivo de PEPCK (Zhang et al, 2006) y represor de la glucocinasa (Hirota et al, 2008; Gross et al, 2008), en nuestro modelo experimental, la falta de efecto de la biotina sobre estas dos enzimas podría estar ligada a la ausencia de efecto sobre Foxo1.

La piruvato carboxilasa (PC) es una enzima anaplerótica que participa en procesos biosintéticos como la gluconeogénesis y la lipogénesis (Wallace et al, 1998). Nuestros resultados muestran una disminución en la expresión relativa de la piruvato carboxilasa debido a la suplementación con biotina. Si bien el papel más conocido de piruvato carboxilasa es como enzima reguladora de la gluconeogénesis, proceso no alterado en

nuestro modelo experimental debido a la suplementación de biotina, es posible que la disminución en la expresión de la piruvato carboxilasa sea una respuesta al tratamiento que forma parte de la inhibición de la lipogénesis. Esto explicaría porqué no cambia la expresión de PEPCK hepática, enzima que en el hígado únicamente regula la gluconeogénesis, mientras que sí hay cambio en la expresión de piruvato carboxilasa hepática, enzima que además participa en la lipogénesis.

Como se señaló anteriormente, SREBP-1c y Foxa2 regulan positivamente la expresión de ACC-1. La ausencia de efecto de la suplementación de biotina sobre la expresión del ARNm de la ACC-1, a pesar de la reducción de la expresión de estos factores transcripcionales, es enigmática. Sin embargo, podría explicarse mediante un efecto positivo directo de la biotina a través de elementos de respuesta a la vitamina, como los existentes en genes de levadura (Pirner y Stolz, 2006), o alternativamente, por efectos sobre otros factores transcripcionales no estudiados en este trabajo.

PPAR- γ y PPAR- α son factores transcripcionales que tienen un papel importante en el metabolismo de lípidos. PPAR- γ se expresa abundantemente en el tejido adiposo y en menor proporción en el hígado (Lazar, 2005). Es el blanco molecular de las tiazolidinedionas, fármacos que mejoran la sensibilidad a insulina (Lee y Evans, 2003). En el hígado, induce genes lipogénicos como la ácido graso sintetasa, la ATP citrato liasa y la acil-CoA sintetasa (Way et al, 2001); y disminuye la expresión de genes participantes en la gluconeogénesis, la cetogénesis y la β -oxidación de ácidos grasos (Way et al, 2001). PPAR- α se expresa abundantemente en el hígado, en donde aumenta directamente la expresión de genes participantes en la captación y oxidación de ácidos grasos; y es el blanco molecular de la acción de los fibratos, agentes terapéuticos que disminuyen los triglicéridos séricos en pacientes con hiperlipidemia (Watts y Dimmit, 1999). En nuestros resultados no se encontraron efectos sobre la expresión de estos factores transcripcionales en el hígado, lo que sugiere que el efecto hipotrigliceridémico de la biotina no se efectúa mediante cambios en la expresión de estos factores transcripcionales.

En resumen, la administración de una dieta suplementada con concentraciones farmacológicas de biotina durante ocho semanas, redujo la expresión en el hígado del ARNm de GLUT2, PFK-1, PK, PC y FAS, así como la expresión de los factores transcripcionales SREBP-1c, HNF-4 α , Foxa1 y Foxa2. No hubo cambios en la expresión de glucocinasa, PEPCK, ACC-1, Foxo1, PPAR- α y PPAR- γ , en tanto que hubo un pronunciado aumento en la expresión de la G6PDH.

Hasta la fecha no existen reportes acerca del efecto de la biotina sobre la expresión genética del tejido adiposo, excepto un artículo que se comentará más adelante (Levert et al, 2002). En dicho tejido, nosotros encontramos que la biotina produce importantes reducciones en la expresión de genes lipogénicos, y que estos efectos difieren de los observados en el hígado.

SREBP-1c es un regulador maestro de la lipogénesis en los tejidos correspondientes (Eberlé et al, 2004), en tanto que la acción de PPAR- γ es específica de cada tipo celular (Lazar, 2005). En el tejido adiposo, PPAR- γ favorece principalmente la expresión de genes que participan en la lipogénesis, el metabolismo de carbohidratos, el transporte de ácidos grasos y el depósito de lípidos (Way et al, 2001). En conformidad con su efecto hipolipidémico, los resultados de esta tesis señalan que la biotina redujo la expresión de SREBP-1c y PPAR- γ en el tejido adiposo. Es interesante señalar que Levert et al (2002) encontraron reducciones en la expresión de PPAR- γ en adipocitos 3T3-L1 tratados con un compuesto análogo de biotina (CABI).

Acorde con la disminución de la expresión de SREBP-1c en el tejido adiposo, nuestros resultados indican que las enzimas lipogénicas ACC-1, FAS y G6PDH, también sufrieron disminuciones en su expresión. Estos resultados difieren del efecto observado en el hígado, en donde no encontramos cambios en la abundancia del ARNm de ACC-1 y observamos un marcado incremento del ARNm de G6PDH. La desigualdad observada en los efectos de concentraciones farmacológicas de biotina sobre la ACC-1 y la G6PDH, entre el tejido adiposo y el hígado, podría explicarse por ciertas diferencias en la regulación de estas enzimas en ambos tejidos (López-Casillas et al, 1991; Hodge et al, 1998). Otra posible explicación podría estar ligada a la disminución producida por la biotina sobre PPAR- γ en

el tejido adiposo, ya que este factor regula positivamente la expresión de ACC-1 en dicho tejido, pero no regula la expresión de la misma enzima en el hígado (Way et al, 2001).

En el tejido adiposo, las enzimas PC y PEPCK tienen un papel muy activo en la síntesis de lípidos, donde precursores gluconeogénicos como el piruvato son transformados para formar el esqueleto de glicerol (estructura base de los triacilgliceroles) en un proceso denominado gliceroneogénesis (Beale et al, 2002). Nuestros resultados muestran que, de acuerdo con el efecto hipotrigliceridémico de la biotina, la dieta suplementada con esta vitamina disminuyó la expresión de ambas enzimas en el tejido adiposo.

A diferencia de la ausencia de cambio en la expresión de los factores transcripcionales PPAR- α y PPAR- γ en el hígado, debido a la dieta suplementada con biotina, en el tejido adiposo observamos una disminución en la expresión de ambos factores transcripcionales. Ppar- α estimula la oxidación de ácidos grasos en el tejido adiposo (Alemán et al, 2004), por lo que es posible que dicho proceso catabólico se encuentre afectado en los ratones suplementados. Además, PPAR- α induce la expresión de la enzima PEPCK en el tejido adiposo (Alemán et al, 2004), por lo que posiblemente la disminución en su expresión esté relacionada con el descenso en la expresión de PEPCK. En ratones *knockout*, la carencia de PPAR- α en el tejido adiposo produce un notable aumento de los depósitos de grasa subcutánea y visceral debido a un incremento en el número y tamaño de los adipocitos (Knauf et al, 2006). Ya que la reducción de PPAR- α producida por la biotina en el tejido graso podría afectar su morfología, otros miembros de nuestro laboratorio se encuentran estudiando el efecto de esta vitamina sobre la morfología del tejido adiposo.

En resumen, los efectos de la biotina sobre la expresión de genes en el tejido adiposo son más amplios que en el hígado, afectando la lipogénesis a través del factor transcripcional SREPB-1c (y de las enzimas ACC-1, FAS y G6PDH) y de la gliceroneogénesis (mediante las enzimas PEPCK y PC). También se observaron cambios en PPAR- α y PPAR- γ , factores transcripcionales que participan en la oxidación de grasos y en la adipogénesis.

CONCLUSIONES

Se ha reportado anteriormente que la administración de una dieta suplementada con concentraciones farmacológicas de biotina en ratones BalbC, durante ocho semanas, redujo las concentraciones plasmáticas de triglicéridos (Velasco-González et al, 2008).

Es posible que este efecto esté relacionado con cambios en la expresión de enzimas y factores transcripcionales que regulan la lipogénesis. En hígado de ratón se observó que la dieta suplementada con concentraciones farmacológicas de biotina disminuyó la abundancia del ARN mensajero de los factores transcripcionales HNF-4 α , SREBP-1c, Foxa1 y Foxa2, así como de la enzima FAS. También disminuyó la expresión de PK, PFK-1, PC y GLUT2. No se observaron cambios en la expresión de ACC-1 y se observó un aumento en la expresión de G6PDH. En el tejido adiposo, los ratones que recibieron la dieta suplementada con concentraciones farmacológicas de biotina mostraron una disminución en la expresión de los factores transcripcionales SREBP-1c, PPAR- α y PPAR- γ , así como de las enzimas ACC-1, FAS, G6PDH, PEPCK y PC.

En este trabajo se estudia, por primera vez, las bases moleculares del efecto hipotriglicéridémico de la biotina, sugiriendo que dicha vitamina podría ayudar al tratamiento de padecimientos metabólicos como la hipertriglicéridemia.

REFERENCIAS

Alemán G, Torres N, Tovar AR. “Los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) en el desarrollo de obesidad y resistencia a la insulina”. *Rev Inv Clin* 56: 351-367 (2004).

Applied Biosystems. “User Bulletin No. 2” (Part No. 5303859).

Applied Biosystems de México. Sistema de PCR en tiempo real ABI PRISM 7000 SDS. Manual de entrenamiento para usuarios.

Báez-Saldaña A, Ortega E. “Biotin deficiency blocks thymocyte maturation, accelerates thymus involution, and decreases nose-rump length in mice”. *J Nutr* 134: 1970-1977 (2004).

Báez-Saldaña A, Zendejas-Ruíz I, Revilla-Monsalve C, Islas-Andrade S, Cárdenas A, Rojas-Ochoa A, Vilches A, Fernández-Mejía 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: 238-243 (2004).

Bailey LM, Ivanov RA, Wallace JC, Polyak SW. “Artifactual detection of biotin on histones by streptavidin”. *Anal Biochem* 373: 71-77 (2008).

Beale EG, Hammer RE, Antoine B, Forest C. “Glyceroneogenesis comes of age”. *FASEB J* 16: 1695-1696 (2002).

Bergen W, Mersmann H. “Comparative aspects of lipid metabolism: Impact on contemporary research and use of animal models”. *J Nutr* 135: 2499-2502 (2005).

Chang SJ, Chuang HJ, Chen HH. “Vitamin B6 down-regulates the expression of human GPIIb gene”. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 45: 471-479 (1999).

Chapman-Smith A, Cronan JE Jr. “The enzymatic biotinylation of proteins: a post-traslational modification of excepcional specificity”. *Trends Biochem Sci* 24: 359-363 (1999)

Chauhan J, Dakshinamurti K. “Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats”. *J Biol Chem* 266: 10035-10038 (1991).

Christakos S, Dhawan P, Liu Y, Peng X, Porta A. “New insights into the mechanisms of vitamin D action”. *J Cell Biochem* 88: 695-705 (2003).

Clagett-Dame M, DeLuca HF. “The role of vitamin A in mammalian reproduction and embryonic development”. *Annu Rev Nutr* 22: 347-381 (2002).

Coggeshall JC, Heggors JP, Robson MC, Beker H. "Biotin status and plasma glucose in diabetes". *Ann NY Acad Sci* 447: 389-392 (1985).

Courtemanche C, Huan AC, Elson-Schwab IE, Kerry N, Ng BY, Awes BN. "Folate deficiency and ionizing radiation cause DNA breaks in primary human lymphocytes: a comparison". *FASEB J* 18: 209-211 (2004).

Crisp SE, Griffin JB, White BR, Toombs CF, Camporeale G, Said HM, Zempleni J. "Biotin supply affects rates of cell proliferation, biotinylation of carboxylases and histones, and expression of the gene encoding the sodium-dependent multivitamin transporter in JAR choriocarcinoma cells". *Eur J Nutr* 43:23-31 (2004).

Dakshinamurti K, Cheah-Tan C. "Liver glucokinase of the biotin deficient rat". *Can J Biochem* 46:75-80 (1968a).

Dakshinamurti K, Cheah-Tan C. "Biotin-mediated synthesis of hepatic glucokinase in the rat". *Arch Biochem Biophys* 127: 17-21 (1968b).

Dakshinamurti K, Hong HC. "Regulation of key hepatic glycolytic enzymes". *Enzymol Biol Clin (Basel)* 11:423-428 (1970).

Dakshinamurti K, Li W. "Transcriptional regulation of liver phosphoenolpyruvate carboxykinase by biotin in diabetic rats". *Mol Cell Biochem* 132: 127-132 (1994).

De la Vega L, Stockert R. "Regulation of the insulin and asialoglycoprotein receptors via cGMP-dependent protein kinase". *Am J Physiol- Cell Physiol* 279: C2037-C2042 (2000).

Dokusova OK, Krivoruchenko IV. "The effect of biotin on the level of cholesterol in the blood of patients with atherosclerosis and essential hyperlipidemia". *Kardiologiya* 12: 113 (1972).

Duarte TL, Lunec J. "When is an antioxidant not an oxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C". *Free Radical Research* 39: 671-686 (2005).

Duncan SA, Navas MA, Dufort D, Rossant J, Stoffel M. "Regulation of a transcription factor network required for differentiation and metabolism". *Science* 281: 692-695 (1998).

Eberlé D, Hegarty B, Bossard P, Ferré P, Fougère P. "SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis". *Biochimie* 86: 839-848 (2004).

Ferré P, Fougère F. "SREBP-1c transcription factor and lipid homeostasis: Clinical perspective". *Horm Res* 68: 72-82 (2007).

Fougère F, Ferré P. "New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for Srebp-1c". *Biochem J* 366: 377-391 (2002).

Foufelle F, Hegarty B, Bobard A, Hainault I, Bossard P, Ferré P. “Un nouveau rôle de l’insuline dans la régulation du métabolisme glucido-lipidique hépatique”. *Medecine/Sciences* 21: 569-571 (2005).

Frayn K. *Regulación del metabolismo. Una perspectiva humana*. Barcelona, Omega, 1998.

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).

Gross DN, van den Heuvel APJ, Birnbaum MJ. “The role of FoxO in the regulation of metabolism”. *Oncogene* 27: 2320-2336 (2008).

Hassan YI, Zempleni J. “Epigenetic regulation of chromatin structure and gene function by biotin”. *J Nutr* 136: 1763-1765 (2006).

Hayhurst GP, Lee YH, Lambert G, Ward JM, Gonzalez FJ. “Hnf4a is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis”. *Mol Cell Biol* 21: 1393-1403 (2001).

Hirota K, Sakamaki J, Ishida J, Shimamoto Y, Nishihara S, Kodama N, Ohta K, Yamamoto M, Tanimoto K, Fukamizu A. “A combination of HNF-4 and Foxo1 is required for reciprocal transcriptional regulation of glucokinase and glucose-6-phosphatase genes in response to fasting and feeding”. *J Biol Chem* 283: 32432-32441 (2008).

Hodge DL, Charron T, Stabile LP, Klautky SA, Salati LM. “Structural characterization and tissue-specific expression of the mouse glucose-6-phosphate dehydrogenase gene”. *DNA Cell Biol* 17: 283-291 (1998).

Hymes J, Fleischhauer K, Wolf B. “Biotinylation of histones by human serum biotinidase: assessment of biotinyl-transferase activity in sera from normal individuals and children with biotinidase deficiency”. *Biochem Mol Med* 56: 76-83 (1995).

Ikeda S, Horio F, Yoshida A, Kakinuma A. “Ascorbic acid deficiency reduces hepatic apolipoprotein A-I mRNA in scurvy-prone ODS rats”. *J Nutr* 126:2505-2511 (1996).

Jhaveri MS, Wagner C, Trepel B. “Impact of extracellular folate levels on global gene expression”. *Mol Pharmacol* 60: 1288-1295 (2001).

Katula KS, Heinloth AN, Pawles RS. “Folate deficiency in normal human fibroblasts leads to altered expression of genes primarily linked to cell signaling, the cytoskeleton and extracellular matrix”. *J Nutr Biochem* 18: 541-552 (2007).

Kim JY, Lee SM. “Effect of ascorbic acid on hepatic vasoregulatory gene expression during polymicrobial sepsis”. *Life Sci* 75: 2015-2026 (2004).

Kletzien RF, Harris PK, Foellmi LA. "Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a "housekeeping" enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress". *FASEB J* 8: 174-181 (1994).

Knauf C, Rieusset J, Foretz M, Cani PD, Uldry M, Hosokawa M, et al. "Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-null mice have increased white adipose tissue glucose utilization, GLUT4, and fat mass: Role in liver and brain". *Endocrinology* 147: 4067-4078 (2006).

Kögl F. "Biotin enzymes". *Chem Ber* 68: A16 (1935).

Kothapalli N, Camporeale G, Kueh A, Chew YC, Oommen AM, Griffin JB, Zemleni J. "Biological functions of biotinylated histones". *J Nutr Biochem* 16: 446– 448 (2005).

Kulkarni RN, Kahn RC. "HNFs – Linking the liver and pancreatic islets in diabetes". *Science* 303: 1311-1312 (2004).

Kurata S, Senoo H, Hata R. "Transcriptional activation of type I collagen genes by ascorbic acid 2-phosphate in human skin fibroblasts and its failure in cells from a patient with alpha 2(I)-chain-defective Ehlers-Danlos syndrome". *Exp Cell Res* 206: 63-71 (1993).

Lamhonwah AM, Quan F, Gravel RA. "Sequence homology around the biotin-binding site of human propionyl-CoA carboxylase and pyruvate carboxylase". *Arch Biochem Biophys* 254: 631-636 (1987).

Lantz KA, Kaestner KH. "Winged-helix transcription factors and pancreatic development". *Clinical Science* 108: 195-204 (2005).

Large V, Peroni O, Letexier D, Ray H, Beylot M. "Metabolism of lipids in human white adipocyte". *Diabetes Metab* 30: 294-309 (2004).

Lazar M. "PPARgamma, 10 years later". *Biochimie* 87: 9-13 (2005).

Lee CH, Evans RM. "Minireview: Lipid metabolism, metabolic diseases and peroxisome proliferator-activated receptors". *Endocrinology* 144: 2201-2207 (2003).

Lehninger A, Nelson DL, Cox MM. *Principios de Bioquímica*. Barcelona, Omega, 2001.

León-Del-Río A, Leclerc D, Akerman B, Wakamatsu N, Gravel RA. "Isolation of a cDNA encoding human holocarboxylase synthetase by functional complementation of a biotin auxotroph of *Escherichia coli*". *Proc Natl Acad Sci* 92: 4626-4630 (1995).

Lever KL, Waldrop GL, Stephens JM. "A biotin analog inhibits acetyl-CoA carboxylase activity and adipogenesis". *J Biol Chem* 277: 16347-16350 (2002).

Livak KJ, Schmittgen TD. "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method". *Methods* 25: 402-408 (2001).

López-Casillas F, Ponce-Castañeda MV, Kim KH. "In vivo regulation of the activity of the two promoters of the rat acetyl coenzyme-A carboxylase gene". *Endocrinology* 129: 1049-1058 (1991).

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 dependent diabetes mellitus". *J Clin Biochem Nutr* 14: 211-218 (1993).

Manthey KC, Griffin JB, Zampleni J. "Biotin supply affects expression of biotin transporters, biotinylation of carboxylases and metabolism of interleukin-2 in Jurkat cells". *J Nutr* 132: 887-892 (2002).

Marshall MW, Haubrich M, Washington VA, Chang MW, Young CW, Wheeler MA. "Biotin status and lipid metabolism in adult obese hypercholesterolemic inbred rats". *Nutr Metab* 20: 41-61 (1976).

Marshall MW, Kliman PG, Washington VA, Mackin JF, Weinland BT. "Effects of biotin on lipids and other constituents of plasma of healthy men and women". *Artery* 7: 330-351 (1980).

Melo V, Cuamatzi O. *Bioquímica de los procesos metabólicos*. México, Reverté-UAM, 2004.

Nagao M, Tanaka K. "FAD-dependent regulation of transcription, translation, post-translational processing, and post-processing stability of various mitochondrial acyl-CoA dehydrogenases and of electron transfer flavoprotein and the site of holoenzyme formation". *J Biol Chem* 267: 17925-17932 (1992).

Narang MA, Dumas R, Ayer LM, Gravel RA. "Reduced histone biotinylation in multiple carboxylase deficiency patients: a nuclear role for holocarboxylase synthetase". *Hum Mol Genet* 13: 15-23 (2004).

Nguyen P, Leray V, Diez M, Serisier S, Le Bloc'h J, Siliart B, Dumon H. "Liver lipid metabolism". *J Animal Physiol Animal Nutr* 92: 272-283 (2008).

Oka T, Komori N, Kuwahata M, Okada M, Natori Y. "Vitamin B6 modulates expression of albumin gene by inactivating tissue-specific DNA-binding protein in rat liver". *Biochem J* 309 (Pt 1): 243-248 (1995).

Oka T. "Vitamin B6". *Nippon Rinsho* 57: 2199-2204 (1999).

Pacheco-Álvarez D, León del Río A. "La biotina, una vitamina multifuncional". *TIP Rev Esp Cienc Quím Biol* 5(1): 39-46 (2002).

Pejin D, Rzamovski R. "Continuous cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* at different biotin concentrations in nutrient media". *J Appl Bacteriol* 80: 53-55 (1996).

Pekovich SR, Martin PR, Singleton CK. "Thiamine deficiency decreases steady-state transketolase and pyruvate dehydrogenase but not alpha-ketoglutarate dehydrogenase mRNA levels in three human cell types". *J Nutr* 128: 683-687 (1998).

Peters DM, Griffin JB, Stanley JS, Beck MM, Zempleni J. "Exposure to UV light causes increased biotinylation of histones in Jurkat cells". *Am J Physiol Cell Physiol* 283: C878-84 (2002).

Pfahl M, Chytil F. "Regulation of metabolism by retinoic acid and its nuclear receptors". *Annu Rev Nutr* 16: 257-283 (1996).

Pirner HM, Stolz J. "Biotin sensing in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by a conserved DNA element and requires the activity of biotin-protein ligase". *J Biol Chem* 281: 12381-13899 (2006).

Reddi A, DeAngelis B, Frank O, Lasker N, Baker H. "Biotin supplementation improves glucose and insulin tolerances in genetically diabetic KK mice". *Life Sci* 42:1323-1330 (1988).

Revilla-Monsalve C, Zendejas-Ruiz I, Islas-Andrade S, Báez-Saldaña A, Palomino-Garibay MA, Hernández-Quiróz PM, Fernández-Mejía C. "Biotin supplementation reduces plasma triacylglycerol and VLDL in type 2 diabetic patients and in nondiabetic subjects with hypertriglyceridemia". *Biomed Pharmacother* 60: 182-185 (2006).

Rodríguez MR. "Importancia del metabolismo de la biotina". *Rev Inv Clin* 52: 194-199 (2000).

Rodríguez-Meléndez R, Cano S, Méndez ST, Velázquez A. "Biotin regulates the genetic expression of holocarboxylase synthetase and mitochondrial carboxylases in rats". *J Nutr* 131: 1909-1913 (2001).

Rodríguez-Meléndez R. "Importancia de las vitaminas hidrosolubles como factores reguladores de la expresión génica". *Rev Inv Clin* 54: 77-83 (2002).

Rodríguez-Meléndez R, Zempleni J. "Regulation of gene expression by biotin". *J Nutr Biochem* 14: 680-690 (2003).

Rodríguez-Meléndez R, Camporeale G, Griffin JB, Zempleni J. "Interleukin-2 receptor γ -dependent endocytosis depends on biotin in Jurkat cells". *Am J Physiol Cell Physiol* 284: C415-421 (2003).

Rodríguez-Meléndez R, Griffin JB, Zempleni J. "The expression of genes encoding ribosomal subunits and eukaryotic translation initiation factor 5A depends on biotin and bisnorbiotin in HepG2 cells". *J Nutr Biochem* 17: 23-30 (2006).

Romero-Navarro G, Cabrera-Valladares G, German MS, Matschinsky FM, Wang J, Fernández-Mejía C. “Biotin regulation of pancreatic glucokinase and insulin in primary cultured rat islets and in biotin deficient rats”. *Endocrinology* 140: 4595-4600 (1999).

Rosen ED, Spiegelman BM. “PPARgamma: a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth”. *J Biol Chem* 276: 37731-37734 (2001)

Salati LM, Amir-Ahmady B. “Dietary regulation of expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase”. *Annu Rev Nutr* 21: 121-140 (2001).

Scalabrino G, Nicolini G, Buccellato FR, Peracchi M, Tredici G, Manfredi A, Pravettoni G. “Epidermal growth factor as a local mediator of the neurotrophic action of vitamin B(12) (cobalamin) in the rat central nervous system”. *FASEB J* 13: 2083-2090 (1999).

Scheerger SB, Zempleni J. “Expression of oncogenes depends on biotin in human small cell lung cancer cells NCI-H69”. *Int J Vitam Nutr Res* 73: 461-467 (2003).

Schmittgen TD, Livak KJ. “Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method”. *Nat Prot* 3: 1101-1108 (2008).

Shin DM, Ahn JI, Lee KH, Lee YS, Lee YS. “Ascorbic acid responsive genes during neuronal differentiation of embryonic stem cells”. *Neuroreport*. 15: 1959-1963 (2004).

Smith CA, Wood EJ. *Biosíntesis*. México, Addison-Wesley Iberoamericana, 1998.

Solórzano-Vargas S, Pacheco-Álvarez D, Leon-Del-Río A. “Holocarboxylase synthetase is an obligate participant in biotin-mediated regulation of its own expression and of biotin-depend carboxylases mRNA levels in human cells”. *PNAS* 99: 5325-5330 (2002).

Spence JT, Koudelka AP. “Effects of biotin upon the intracellular level of cGMP and the activity of glucokinase in cultured rat hepatocytes”. *J Biol Chem* 259: 6393-6396 (1984).

Stanley JS, Griffin JB, Zempleni J. “Biotinylation of histones in human cells: Effects of cell proliferation”. *Eur J Biochem* 268: 5424-5429 (2001).

Stoffel M, Duncan SA. “The MODY1 transcription factor HNF4 regulates expression of genes required for glucose transport and metabolism”. *Proc Natl Acad Sci* 94: 13209-13214 (1997).

Sugita Y, Shirakawa H, Sugimoto R, Furukawa Y, Komai M. “Effect of biotin treatment on hepatic gene expression in streptozotocin-induced diabetic rats”. *Biosci Biotechnol Biochem* 72:1290-1298 (2008).

Tully DB, Allgood VE, Cidlowski JA. “Modulation of steroid receptor-mediated gene expression by vitamin B6”. *FASEB J* 8: 343-349 (1994).

Ureta T, González C, Lillo S, Niemeyer H. "Comparative studies on glucose phosphorylating isoenzymes of vertebrates. I. The influence of fasting and the nature of the diet on liver glucokinase and hexokinases of rodents". *Comp Biochem Physiol B*. 40: 71-80 (1971).

Velasco-González FA, Rojas-Ochoa A, Larrieta-Carrasco E, Vital-Becerra P, López-Aceves T, Fernández-Mejía C. "Efecto de la biotina sobre la hipertrigliceridemia y la regulación del metabolismo de lípidos". México, Memorias del XIV Congreso de Carteles "Lino Díaz de León" (2008).

Vesely D. "Biotin enhances guanylate cyclase activity". *Science* 216: 1329-1330 (1982).

Vilches-Flores A, Fernández-Mejía C. "Efecto de la biotina sobre la expresión genética y el metabolismo". *Rev Invest Clin* 57: 716-724 (2005).

Wallace JC, Jitrapakdee S, Chapman-Smith A. "Pyruvate carboxylase". *Int J Biochem Cell Biol* 30: 1-5 (1998).

Watanabe T, Endo A. "Species and strain differences in teratogenic effects of biotin deficiency in rodents". *J Nutr* 119: 255-261 (1989).

Watts GF, Dimmit SB. "Fibrates, dyslipoproteinaemia and cardiovascular diseases". *Curr Opin Lipidol* 10: 561-574 (1999).

Way JM, Harrington WW, Brown KK, Gottschalk WK, Sundseth SS, Ramachandran RK, Wilson TM, Kliewer SA. "Comprehensive messenger ribonucleic acid profiling reveals that Ppar-Gamma activation has coordinate effects on gene expression in multiple insulin-sensitive tissues". *Endocrinology* 142: 1269-1277 (2001).

Wolfrum C, Asilmaz E, Luca E, Friedman JM, Stoffel M. "Foxa2 regulates lipid metabolism and ketogenesis in the liver during fasting and in diabetes". *Nature* 432: 1027-1032 (2004).

Wiedmann S, Rodríguez-Meléndez R, Ortega-Cuéllar D, Zemleni J. "Clusters of biotin-responsive genes in human peripheral blood mononuclear cells". *J Nutr Biochem* 15: 433-439 (2004).

Yan Q, Briehl M, Crowley CL, Payne CM, Bernstein H, Bernstein C. "The NAD⁺ precursors, nicotinic acid and nicotinamide upregulate glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase mRNA in Jurkat cells". *Biochem Biophys Res Commun* 255: 133-136 (1999).

Yu DH, Lee KH, Lee JY, Kim S, Shin DM, Kim JH, Lee YS, Oh SK, Moon SY, Lee SH, Lee YS. "Changes of gene expression profiles during neuronal differentiation of central nervous system precursors treated with ascorbic acid". *J Neurosci Res* 78: 29-37 (2004).

Zempleni J, Mock DM. "Biotin biochemistry and human requirements". *J Nutr Biochem* 10: 128–138 (1999).

Zempleni J, Helm RM, Mock DM. "In vivo biotin supplementation at a pharmacologic dose decreases proliferation rates of human peripheral blood mononuclear cells and cytokine release". *J Nutr* 131: 1479-1484 (2001).

Zempleni, J. "Uptake, localization, and noncarboxylase roles of biotin". *Annu Rev Nutr* 25: 175-196 (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 (Tokyo)* 42: 517-526 (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 (Tokyo)* 43: 271-280 (1997).

Zhang W, Patil S, Chauhan B, Guo S, Powell DR, Le J, Klotsas A, Matika R, et al. "FoxO1 regulates multiple metabolic pathways in the liver: effects on gluconeogenic, glycolytic, and lipogenic gene expression". *J Biol Chem* 281: 10105-10117 (2006).

Zhou LZ, Johnson AP, Rando TA. "NF kappa B and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells". *Free Radic Biol Med* 31: 1405–1416 (2001).