



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

DOCTORADO
en
**CIENCIAS
BIOMÉDICAS**

**EFFECTO DE LA BIOTINA SOBRE DIFERENTES VIAS METABÓLICAS DE LOS
LÍPIDOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A:

M. en C. ASDRÚBAL AGUILERA MÉNDEZ

DIRECTOR DE TESIS: DRA MARIA CRISTINA FERNÁNDEZ MEJÍA

MÉXICO, D.F

2012



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.

R E C O N O C I M I E N T O S

COMITÉ TUTORAL:

Dra. Enrique Piña Garza

Departamento de Bioquímica

Facultad de Medicina

UNAM

Dr. Armando Tovar Palacio

Departamento de Fisiología de la Nutrición

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Este trabajo se realizó en el:

Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM /

Instituto Nacional de Pediatría INP: en el laboratorio de biología molecular de enfermedades metabólicas asociadas a la diabetes, en la unidad de genética de la nutrición, en el cuarto piso de la torre de investigación del INP.

La realización de la tesis fue posible gracias al apoyo de:

Consejo Nacional de la Ciencia y la Tecnología (CONACYT),

Registro/beca: 91634/23541. Programa de Mejoramiento del Profesorado (PPROMEP),

beca: UMSNH-208. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo UMSNH, cumplimiento de la cláusula 97 del contrato colectivo de trabajo.

Se agradece el apoyo técnico de:

M. en C. Alberto Rojas Ochoa, L.N. Lilian Esparza Rosales y Dra. Silvia Ivonne Mora Herrera, Unidad de Genética de la Nutrición del Instituto de Investigaciones Biomédicas

Agradecimientos

A la Dra. María Cristina Fernández Mejía por su invaluable orientación, dedicación, disposición y actitud para la realización de este proyecto Doctoral. Además, de que siempre estuvo dispuesta a permitirme acomodar mi situación especial de constantes viajes los fines de semana, gracias Dra por su sensibilidad, mi agradecimiento infinito.

A mi comité tutorial, Dr. Enrique Piña Garza y Dr. Armando Tovar Palacio por sus acertadas observaciones y disponibilidad para ayudarme en mi proyecto.

A la Dra. Karla Guadalupe Carvajal Aguilera por su asesoría en varias técnicas, comentarios que enriquecieron mi proyecto y su gran disposición a siempre enseñar con la mejor actitud.

Al M.en C. Alberto Rojas por su ayuda técnica, al igual que a la Dra. Silvia Ivonne Mora, quienes siempre estuvieron con la disposición de ayudar y me brindaron su desinteresada amistad que espero conservar siempre.

A mis compañeros del laboratorio: Lilian, Maria Luisa, Elena, Maura, Wilma, Gustavo, Karen y especialmente a mi "compadre" honorario Daniel Boone, con los cuales compartí innumerables horas de trabajo, pláticas, tristezas, alegrías, bromas y grandes momentos de convivencia. Y a mis vecinos de laboratorio Daniel Ortega, Liz Moreno, Sasil y Sandra con quienes entable buena amistad. Siempre los tendré presentes.

Dedicatorias

A Dios por haberme permitido tener tanta dicha, salud y amor, por permitirme tener a mi lado a mi Esposa, hijos, Papás, hermanos y amigos y a quien siempre agradezco su gracia y amor infinito.

A mis padres María Luisa Méndez Romero y José Francisco Aguilera Macias, quienes siempre han estado a mi lado, orientándome y dándome todo su cariño y amor. Con ellos a mi lado mis logros son completos y mis penas son insignificantes. Siendo pilares imprescindibles en mi vida.

A mis hermanas Paulina y Liliana con quienes he compartido y comparto mi vida, por siempre estar juntos y apoyarnos. A mis queridos sobrinos Mildred, Edgar y Dianita, los cuales adoro casi como si fueran mis propios hijos.

A mis entrañables amigos de toda la vida, Mario, Ramón, Arnulfo y Memo, con quienes he compartido toda una vida y prácticamente son mis hermanos.

A mis queridos suegros Francis y Esaú que siempre se ha portado de maravilla y me han dado su cariño y afecto. A mi querida y preferida cuñada Naye, por compartir tantos momentos de convivencia familiar y a mis cuñados Moni y Asbel por estar ahí. A mis lindos sobrinos Esau, Naye y Mari por ser tan cariñosos y tiernos.

A mis cuñados Salvador, José Luis rebollo y José Luis Sandoval quienes son parte de mi familia y siempre estamos y estaremos juntos.

A mi Esposa Ceci, quien es literalmente mi media naranja, mi otro yo, parte de mí, mi universo y todo en mí vida, sin ella jamás hubiera hecho este proyecto y ningún otro. A mis hijos Karel y Gael, los cuales son nuestro mejor proyecto de vida.

ÍNDICE

I. ABREVIATURAS	
II. LISTA DE FIGURAS	
III. RESUMEN	
IV. ABSTRACT	
1. INTRODUCCIÓN	
1.1. La biotina.....	1
1.2. La suplementación con biotina regula la expresión de genes.....	5
1.2.1. Mecanismos moleculares del efecto de la biotina sobre la expresión génica.....	6
1.2.1.1. Biotinilación de histonas.....	7
1.2.1.2. Vía de señalización de la guanilato ciclasa soluble/proteína cinasa G (GC/PKG).....	7
1.3. Efecto de la biotina en el metabolismo de los lípidos.....	9
1.4. Metabolismo de lípidos.....	11
1.4.1. Lipogénesis.....	13
1.4.2. Oxidación de ácidos grasos.....	15
1.4.3. Sistema de transporte de carnitinas en la oxidación.....	17
1.4.4. Regulación de la lipogénesis y la oxidación.....	18
1.4.4.1. Regulación por enzimas y metabolitos.....	18
1.4.4.1.1. En la lipogénesis.....	18
1.4.4.1.2. En la oxidación.....	19
1.4.4.2. Por vías de señalización.....	20
1.4.4.2.1. Señalización por insulina vía proteína cinasa B (PKB/AKT).....	20
1.4.4.2.2. Señalización por proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs).....	21
1.4.4.2.3. Señalización por glucagon y catecolaminas vía la proteína cinasa A (PKA).....	21
1.4.4.2.4. Señalización por cambios en el contenido energético vía la cinasa activada por AMP (AMPK).....	22
1.4.4.2.5. Señalización por la vía de guanilato ciclasa, GMP cíclico y proteína cinasa G (GC/GMPc /PKG).....	24
1.4.4.3. Por factores transcripcionales.....	25
1.4.4.3.1. SREBP-1c.....	26
1.4.4.3.2. PPAR- α	27
1.4.4.3.3. PGC1- α y PGC1- β	28
2. JUSTIFICACIÓN.....	29
3. HIPÓTESIS.....	30
4. OBJETIVO GENERAL.....	30
5. OBJETIVOS PARTICULARES.....	30
6. MATERIALES.....	31

6.1.	Dietas para ratones.....	31
6.2.	Reactivos y soluciones.....	31
	A) Extracción de triglicéridos de tejido hepático.....	31
	B) Estuche de reactivos para la cuantificación de triglicéridos.....	31
	C) Estuche de reactivos para la cuantificación de ácidos grasos libres.....	31
	D) Extracción y visualización de ARN total.....	31
	E) Retrotranscripción y PCR en tiempo real.....	32
	F) Extracción de proteínas totales.....	32
	G) Electroforesis de SDS-PAGE.....	33
	H) Transferencia en cámara húmeda.....	33
	I) Tinción de membrana con rojo de Ponceau.....	33
	J) Inmunodetección.....	33
	K) Análisis de acilcarnitinas por espectrometría de masas en tándem.....	34
7.	MÉTODOS.....	35
	7.1. Modelo experimental.....	35
	7.2. Concentraciones séricas de triglicéridos.....	36
	7.3. Contenido de triglicéridos hepáticos.....	36
	7.4. Contenido de ácidos grasos en suero.....	36
	7.5. Análisis de la abundancia de ARNm.....	37
	7.6. Determinación de la concentración proteica por el método de Bradford.....	38
	7.7. Western Blot.....	38
	7.8. Cuantificación de GMPc en tejido hepático.....	40
	7.9. Extracción y cuantificación de carnitinas de músculo.....	40
	7.10. Análisis estadístico.....	41
8.	RESULTADOS.....	42
	8.1. Peso corporal, ingesta de alimentos y glucosa.....	42
	8.2. Concentración de triglicéridos en suero e hígado.....	43
	8.3. Concentración de ácidos grasos libres en suero.....	43
	8.4. Abundancia de la proteína del factor SREBP-1c en el hígado.....	44
	8.5. Abundancia de la masa total de la sintasa de ácidos grasos en el hígado.....	45
	8.6. Abundancia de la masa total y fosforilada de la acetil-CoA carboxilasa-1 en el hígado.....	46
	8.7. Abundancia de la masa fosforilada de la proteína cinasa activada por AMP en el hígado.....	47
	8.8. Contenido de GMP cíclico en el hígado.....	48
	8.9. Cuantificación del ARNm de la carboxilasa ACC-2 en músculo.....	49
	8.10. Cuantificación de ACC-2 total y fosforilada en el músculo.....	50
	8.11. Cuantificación de carnitinas en el músculo.....	51
	8.12. Cuantificación del ARNm de la carnitina palmitoil transferasa 1 en músculo.....	53
	8.13. Cuantificación de la abundancia del receptor activado por proliferador de peroxisomas alpha en el músculo.....	53

8.14. Cuantificación de la masa total y fosforilada de las cinasas reguladas por señales extracelulares en el músculo.....	54
9. DISCUSIÓN.....	56
10. CONCLUSIONES.....	63
11. PERSPECTIVAS.....	65
12. REFERENCIAS.....	66
13. ANEXO 1 (Publicación).....	78
14. OTRAS PUBLICACIONES.....	86

ABREVIATURAS

ACC	Acetil-CoA carboxilasa
ACS	Acil-CoA sintetasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AG	Ácidos grasos
AGPAT	Acil glicerol fosfato acil transferasa
AICAR	5-amino-1-β-D-ribofuranosil-imidazol-4-carboxamida
AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	Proteína cinasa activada por AMP
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
CABI	Cloroacetilado de biotina
CACT	Carnitina:acil carnitina translocasa
cADN	ADN complementario
CamKII	Proteína cinasa II dependiente de Ca ²⁺ /calmodulina
CAT	Carnitina acetiltransferasa
ChREBP	Proteína de unión a elementos de respuesta a carbohidratos
CL	Citrato liasa
CoA-SH	Coenzima A libre y reducida
COPI	Proteína coatomérica complejo I
COT	Carnitina octanoiltransferasa
CPT-1	Carnitina palmitoiltransferasas
DAG	Diacilglicerol
DGAT	Diacil glicerol acil transferasa
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
EGTA	Ácido etilenglicol-bis (aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
ERK1/2	Cinasas reguladas por señales extracelulares (1 y 2)
FABP	Proteína de unión a ácidos grasos libres
FADH ₂	Flavin adenin dinucleótido reducido
FAS	Ácido graso sintasa
FOXO 1	Forkhead box O1
FXR	Receptor X del farnesoide
GC	Guanilato ciclasa
GLUT 2	Transportador de glucosa tipo 2
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GPAT	Glicerol fosfato acil tranferasa
HCS	Holocarboxilasa sintetasa

HEPES	Ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etanosulfónico
HNF4- α	Factor nuclear del hepatocito
kDa	kiloDalton
LCACoA	Acil-CoA de cadena larga
LCAS	Sintetasa de acilos-CoA de cadena larga
LXR	Receptor X del hígado
M	Molar (mol/l)
mA	Miliamperios
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MCC	Metilcrotonil-CoA carboxilasa
MCD	Malonil-CoA descarboxilasa
ME	Enzima mítica
MGAT	Monoacil glicerol acil transferasa
min	Minuto
ml	Mililitro
MS/MS	Espectrometría de masas en tandem
NADH+H	Nicotinamida adenin dinucleótido (forma reducida)
NADPH	Nicotinamida adenin dinucleótido (forma reducida y fosforilada)
NEFA	Ácidos grasos no esterificados
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PC	Piruvato carboxilasa
PCC	Propionil-CoA carboxilasa
PDH	Complejo piruvato deshidrogenasa
PEPCK	Fosfoenol piruvato carboxinasa
PGC-1	Coactivador γ del receptor activado por proliferadores de peroxisomas
PI3K	Fosfoinositol-3-fosfato quinasa
PKB	Proteína cinasa B
PKG	Proteína cinasa dependiente de GMPc
PPAR	Receptor activado por proliferadores de peroxisomas
PPRE	Elemento de respuesta a proliferadores de peroxisomas
rLDL	Receptor de lipoproteínas de baja densidad
RXR	Receptor X del ácido retinóico
SDC	Estearil-CoA desaturasa
SDS	Sodio dodecilsulfato
SE	Error estándar
SMVT	Transportador múltiple de vitaminas dependiente de sodio
SREBP-1	Proteína de unión a elementos de respuesta a esteroides 1
STAT	Transductor de señales y activador de la transcripción
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
TG	Triacilgliceroles
TH	Hormona tiroidea
Tris-base	Tris (hidroximetil) aminometano
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Formula química de la biotina
- Figura 2.** Reacciones catalizadas por las carboxilasas
- Figura 3.** Biotinilación de las apocarboxilasas
- Figura 4.** Mecanismo de acción de la biotina a través de la vía de GC/GMPc/PKG
- Figura 5.** Síntesis, exportación, captación y oxidación de lípidos en el hígado
- Figura 6.** Principales órganos que regulan la homeostasis lipídica
- Figura 7.** Lipogénesis hepática *de novo*
- Figura 8.** Oxidación de ácidos grasos
- Figura 9.** Concentraciones de triacilglicérols en suero e hígado
- Figura 10.** Concentración de ácidos grasos libres en suero
- Figura 11.** Abundancia de la forma madura de SREBP-1c
- Figura 12.** Abundancia de la enzima FAS
- Figura 13.** Abundancia en la masa total y fosforilada de la enzima ACC-1 en el hígado
- Figura 14.** Abundancia de la masa fosforilada de la cinasa AMPK
- Figura 15.** Concentración hepática de GMPc
- Figura 16.** Cuantificación del ARN mensajero de ACC-2 en músculo
- Figura 17.** Abundancia de la carboxilasa ACC-2 total y fosforilada en el músculo
- Figura 18.** Cuantificación de carnitina libre (C0) y acilcarnitina (C2) en el músculo
- Figura 19.** Cuantificación de acilcarnitinas de cadena media en el músculo
- Figura 20.** Cuantificación de acilcarnitinas de cadena larga en el músculo
- Figura 21.** Expresión relativa del ARN mensajero de la proteína CPT-1
- Figura 22.** Abundancia de la masa total de PPAR- α en el músculo
- Figura 23.** Abundancia de la masa total y fosforilada de las cinasas ERK1/2 en músculo

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La biotina es una vitamina hidrosoluble del complejo B que participa como cofactor de las carboxilasas. Se ha encontrado que a concentraciones farmacológicas la biotina modifica la expresión génica y tiene múltiples efectos en procesos sistémicos. Se han propuesto dos mecanismos para explicar el efecto de la biotina sobre la expresión génica: 1) la biotilación de histonas y 2) la vía de señalización de la guanilato ciclasa soluble/proteína cinasa G. Varios estudios han demostrado que las concentraciones farmacológicas de biotina reducen la hipertrigliceridemia en humanos y en modelos experimentales animales. En un estudio previo nuestro laboratorio reportó que este efecto está relacionado con la disminución en la expresión de genes lipogénicos. En el presente trabajo, analizamos vías de señalización y mecanismos postranscripcionales que participan en los efectos hipotrigliceridémicos de la biotina sobre dos diferentes vías metabólicas de los lípidos: la lipogénesis en el hígado y la oxidación de los ácidos grasos en el músculo. **METODOLOGÍA:** Utilizamos ratones machos BALB/cAnN Hsd que fueron alimentados con una dieta control o una dieta suplementada con biotina (1.76 o 97.7 mg de biotina/kg dieta, respectivamente) durante 8 semanas después del destete. Determinamos las concentraciones séricas de triacilglicérols y ácidos grasos, el contenido hepático de triacilglicérols y de GMP cíclico. También en el hígado analizamos la abundancia proteica de SREBP-1c en su forma madura, FAS, ACC-1 total y fosforilada y la cinasa AMPK fosforilada. En el músculo analizamos la abundancia de las proteínas ERK 1/2 y ACC-2 total y fosforilada; PPAR- α y AMPK fosforilada. También se determinó la expresión del ARN mensajero de las proteínas CPT-1 y ACC-2 y el contenido muscular de carnitina libre y acilcarnitinas. **RESULTADOS Y DISCUSIÓN:** Comparado con el grupo control, los ratones suplementados con biotina tuvieron menor concentración en suero de triacilglicérols y ácidos grasos, así como una disminución en el contenido total de triacilglicérols intra-hepáticos. El análisis de la abundancia de diferentes proteínas en el hígado reveló incrementos en la masa fosforilada de ACC-1 y de AMPK y una disminución de la abundancia de la forma madura de SREBP-1c y FAS. Aunado a estos efectos se encontró un aumento en el contenido hepático de GMPc. En el músculo encontramos que, comparados con el grupo control, los ratones que recibieron la dieta suplementada con biotina mostraron un aumento en la abundancia proteica de PPAR- α , las formas fosforiladas de AMPK, y de ACC-2, en tanto que se observó una disminución en la masa fosforilada de las ERK1/2, sin cambio en su masa total. Además, encontramos un aumento en el mensajero de la enzima CPT-1 pero no en el de ACC2. Análisis de las concentraciones de acil-carnitinas revelaron que la suplementación con biotina disminuyó las acilcarnitinas (C2-C18) pero no la concentración de carnitina libre muscular. Nuestros datos indican que, en el hígado, las concentraciones farmacológicas de biotina disminuyen la lipogénesis mediante un mecanismo que involucra un aumento de GMPc y activación de AMPK, lo que ocasiona aumentos en la fosforilación de ACC-1 y disminuciones en la expresión de la forma madura de SREBP-1c y FAS. En el músculo, los resultados indican que la suplementación con biotina incrementa la oxidación de los ácidos grasos a través de un mecanismo en que participa la fosforilación de AMPK y ACC-2; así como aumentos en la expresión de genes que regulan la β -oxidación como PPAR-alfa y CPT-1. La inactivación de las proteínas de señalización ERK 1/2, posiblemente mediada por aumento en la actividad de AMPK, también parece estar involucrada en los efectos farmacológicos de la biotina.

CONCLUSIONES: Nuestros resultados demuestran por primera vez que AMPK participa en los efectos hipotriglicéridémicos de la biotina, regulando dos vías importantes del metabolismo de lípidos (negativamente la lipogénesis hepática y positivamente la oxidación muscular). Estos datos ofrecen nuevos conocimientos del mecanismo molecular de la biotina sobre la regulación del metabolismo lipídico, estos conocimientos podrían llevar a nuevas estrategias en el desarrollo de agentes terapéuticos y su posible uso en dislipidemias o padecimientos asociados al metabolismo de lípidos.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Biotin is a water-soluble vitamin that acts as a covalently bound coenzyme of carboxylases. In addition, pharmacologic concentrations of biotin modify gene expression and have manifold effects on systemic processes. Two mechanisms have been proposed to explain its pharmacologic effects: 1) histone biotinylation, and 2) soluble guanylate cyclase/protein G kinase signaling cascade. Several studies have shown that pharmacological doses of biotin reduce hypertriglyceridemia in humans and animal experimental models. In a previous study our laboratory reported that this effect is related to the decrease in lipogenic gene expression. In this thesis, we analyzed signaling pathways and posttranscriptional mechanisms involved in the hypotriglyceridemic effects of biotin on two different lipid metabolic pathways: liver lipogenesis and muscle fatty acid oxidation. **METHODOLOGY:** Male BALB/cAnN Hsd mice were fed a control or a biotin-supplemented diet (1.76 or 97.7 mg of free biotin/kg diet, respectively) over 8 weeks post-weaning. We determined the serum triglyceride and fatty acid concentrations, as well as the hepatic levels of triglycerides and cyclic GMP (cGMP). We also analyzed in the liver the abundance of mature sterol regulatory element-binding protein (SREBP-1c), fatty-acid synthase (FAS), acetyl-CoA carboxylase-1 (ACC-1) and its phosphorylated form, and AMP-activated protein kinase (AMPK) were evaluated in the liver. In the muscle we analyzed the total and phosphorylated protein abundance of ERK1 / 2 and ACC-2, phosphorylated, and the protein abundance of PPAR- α and phosphorylated AMPK. As well, the mRNA expression of CPT-1 and ACC-2, and free carnitine and acylcarnitines content were measured. **RESULTS AND DISCUSSION:** Compared to the control group, biotin-supplemented mice had lower triglyceride and fatty acid concentrations, as well as hepatic triglyceride content. In the liver, biotin supplementation increased the phosphorylated forms of AMPK and ACC-1, whereas decreased the abundance of the mature form of SREBP-1c and FAS. Along with these effects hepatic cGMP content was increased. In the muscle, we found that biotin supplementation increased protein expression of PPAR-alpha, AMPK and ACC-2 phosphorylation. We also observed decreased phosphorylated ERK1/2 protein mass, without change in its total mass. In addition, increased CPT-1 mRNA but no changes in ACC-2 mRNA, were found in the supplemented group. Acyl-carnitine concentration analysis revealed decreased (C2-C18) acyl-carnitine concentrations but no changes were observed in the concentration of free carnitine. Our data indicate that, in the liver, pharmacologic concentrations of biotin reduced lipogenesis by a mechanism that involves an increase in cGMP content and activation of AMPK, leading to augmented ACC-1 phosphorylation and decreased levels of both the mature form of SREBP-1c and FAS expression. In the muscle, the results suggest that pharmacologic concentrations of biotin increase fatty acid oxidation by a mechanism that involve AMPK and ACC-2 phosphorylation, as well as increased expression of genes that regulate beta-oxidation such as PPAR- α and CPT-1. The inactivation of signal transduction protein ERK 1/2, possibly due to increased AMPK activity, also appears to be involved in the pharmacological effect of biotin. **CONCLUSIONS:** Our results demonstrate for the first time that AMPK participates in the effects of biotin supplementation regulating negatively hepatic lipogenesis and positively fatty acid oxidation in the muscle. These data offer new insights into the mechanisms of biotin-mediated hypotriglyceridemic effects and may lead to new strategies in the development of therapeutic agents.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1. LA BIOTINA

La biotina (vitamina B7) es una vitamina hidrosoluble del complejo B, esencial para la homeostasis metabólica y el crecimiento celular (Zempleni, 2005). También se le conoce como vitamina H (del alemán *haut*, piel) debido a su rol protectora contra síntomas de dermatitis y alopecia (Melo y Cuamatzi, 2004). Fue descubierta por Boas en 1927 (Boas, 1927) y caracterizada por Kogl y Tonnis como un factor indispensable para el crecimiento de levaduras (Kogl y Tonnis, 1932). Químicamente la biotina es un compuesto heterocíclico, con un anillo de imidazolidona enlazado a un anillo de tetrahidrotiofeno y éste unido a una cadena lateral de ácido valérico (Figura 1). Es soluble en agua, insoluble en disolventes orgánicos y estable entre un rango de pH 5 a 8 (Sarawut y Wallace, 2003). La rol más conocida es la de participar como grupo prostético de las carboxilasas: acetil-CoA carboxilasa (ACC) (E.C. 6.4.1.2), piruvato carboxilasa (PC) (E.C. 6.4.1.1); propionil-CoA carboxilasa (PCC) (E.C. 6.4.1.3) y metilcrotonil-CoA carboxilasa (MCC) (E.C.6.4.1.4) (Figura 2). Las carboxilasas son sintetizadas como apocarboxilasas en el citoplasma y participan en diversos procesos metabólicos como la gluconeogénesis, la lipogénesis, oxidación lipídica y el catabolismo de aminoácidos (Sarawut y Wallace, 2003).

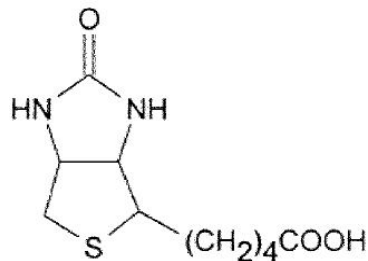


Figura 1. Formula química de la biotina. Es un compuesto heterocíclico, con un anillo de imidazolidona unido a un anillo de tetrahidrotiofeno y con un ácido valérico unido lateralmente.



Figura 2. Reacciones catalizadas por las carboxilasas. ACC, acetil-CoA carboxilasa; PC, Piruvato carboxilasa; PCC, Propionil-CoA carboxilasa; MCC, Metilcrotonil-CoA carboxilasa (Modificado de Zemleni y Mock, 2001).

La acetil-CoA carboxilasa (ACC) cataliza la carboxilación del acetil-CoA para formar malonil-CoA. Está integrada por tres subunidades (Tanabe et al., 1975) y se han identificado dos isoformas: ACC 1 (~265 kDa) y ACC 2 (~280 kDa) como productos de distintos genes (Ha et al., 1994). La ACC-1 es citosólica y se expresa fundamentalmente en tejidos lipogénicos (hepático y adiposo), donde tiene un papel primordial en la síntesis de ácidos grasos (Kim et al, 1989). La ACC-2 está asociado a la cara citoplásmica de la mitocondria (Abu-Elheiga et al, 2000), se expresa principalmente en tejidos oxidativos (músculo e hígado) y es importante en la oxidación de los ácidos grasos (Abu-Elheiga et al., 1997; Abu-Elheiga et al., 2001). Se ha propuesto que la ACC-2 también juega una rol importante en el almacenamiento de biotina (John et al., 1989).

La piruvato carboxilasa (PC) (E.C. 6.4.1.1) se expresa en una amplia gama de tejidos (Ashman et al, 1972). Está compuesta por cuatro subunidades idénticas de aproximadamente 120-130 kDa y esta localizada en la mitocondria. Cataliza la carboxilación de piruvato a oxalacetato, el cual es un importante intermediario en el ciclo de Krebs. Además, se utiliza en distintas vías biosintéticas, como la gluconeogénesis, síntesis de ácidos grasos y la biosíntesis de neurotransmisores (Sarawut y John, 1999; Wallace et al, 1998).

La propionil-CoA carboxilasa (PCC) (E.C. 6.4.1.3) es una enzima mitocondrial heteropolimérica compuesta por subunidades α y β . (Gravel et al, 1980). Participa en el catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada, de ácidos grasos de cadena impar y del colesterol. El propionil-CoA, un producto de las rutas anteriores, es carboxilado por la PCC para formar metilmalonil-CoA, que a su vez se convierte en succinil-CoA y entra en el ciclo de Krebs. (Sarawut y Wallace, 2003).

La 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa (MCC) [E.C. 6.4.1.4] se compone de seis heterodímeros de cadenas α y β (Cochran y Fall, 1980). La enzima cataliza el cuarto paso en la degradación del aminoácido de cadena ramificada leucina para formar 3-metilglutaconil-CoA. La MCC es una enzima mitocondrial y se expresa fundamentalmente en el riñón y el hígado (Cochran et al, 1980).

La biotina participa directamente en la transferencia de grupos carboxilos (Jitrapakdee y Wallace, 2003) y se une covalentemente a las apoenzimas carboxilasas por medio de la enzima holocarboxilasa sintetasa (HCS). Esta reacción se realiza en dos etapas: 1) la biotina se activa al reaccionar con una molécula de ATP, formando el intermediario biotinil-5'-AMP. El grupo biotinilo se transfiere a la apoenzima formándose un enlace semipeptídico con un residuo de lisina (Figura 3), localizada dentro de una secuencia Met-Lys-Met altamente conservada en todas las apocarboxilasas (Lamhonwah et al., 1987). Las carboxilasas dependientes de biotina requieren un ion divalente libre (Mg^{+2}) en exceso para formar el complejo de la primera reacción parcial (Knowles, 1989).

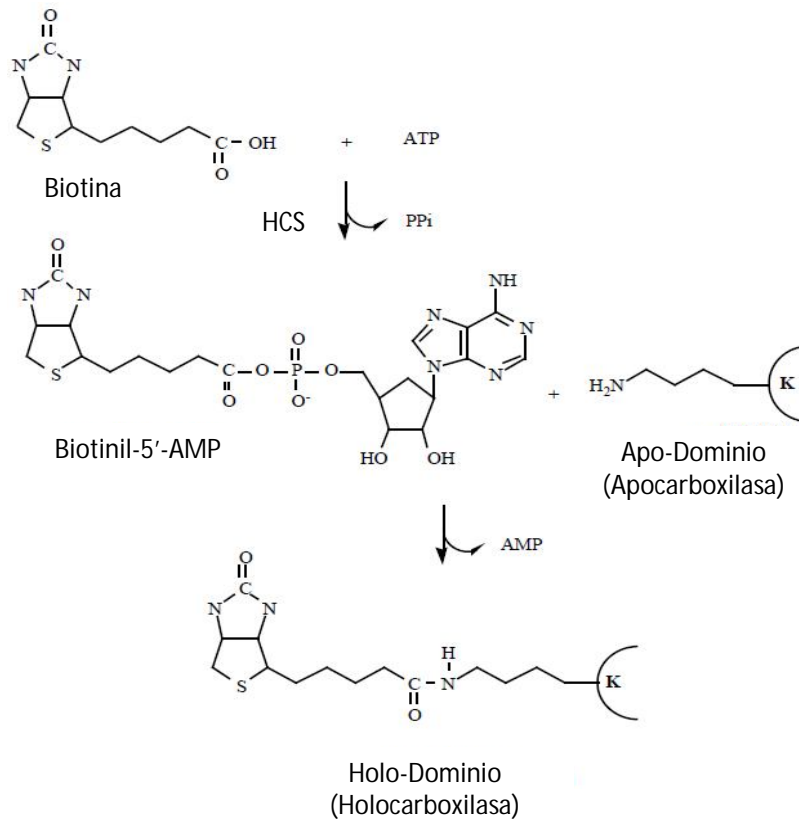


Figura 3. Biotinilación de las apocarboxilasas. La activación de las carboxilasas se produce por la adición de una molécula de biotina a un residuo de Lys específico en la cadena del polipéptido. Esta reacción es catalizada por holocarboxilasa sintetasa (HCS) y necesita de ATP (Modificado de Sarawut et al., 1999).

La proteólisis de las holocarboxilasas libera residuos de lisina unidos covalentemente a la biotina (biocitina). Este enlace se rompe por acción de la biotinidasa y la biotina puede ser reciclada e integrarse a nuevas carboxilasas sintetizadas, o puede catabolizarse formando productos derivados y excretarse como bisnorbiotina, tetranorbiotina sulfóxido y biotina sulfona (Fernández, 2005; Cristina y Maria-Luisa, 2010). Los mamíferos no pueden sintetizar biotina, por lo que es necesario consumirla en la dieta diaria. Se encuentra en los alimentos principalmente unida al grupo ε-amino de una lisina formando el dímero biocitina, péptidos biotinilados o en forma libre (Dakshinamurti y Chauhan, 1994). También se puede obtener del aporte de las bacterias de la flora intestinal (Melo y Cuamatzi, 2004). La biotina que se encuentra unida a péptidos deber ser hidrolizada para su absorción, rompiendo el enlace semipeptídico por la acción de la biotinidasa pancreática (Hymes y Wolf, 1996). La biotina libre se absorbe por los

enterocitos de la porción distal del duodeno y proximal del yeyuno y posteriormente pasa al torrente sanguíneo. La entrada a las células se lleva a cabo a través de un transportador múltiple de vitaminas dependiente de sodio (SMVT) que reconoce principalmente la porción del ácido valérico de la biotina. El SMVT es una proteína transmembranal que funciona como simportador electroneutro, introduciendo a la biotina y al ácido pantoténico junto con el sodio, a favor de un gradiente de concentración (Cohen y Tomas, 1982; Chatterjee et al., 1999).

La ingesta adecuada de biotina es 30 µg/d para adultos, en mujeres embarazadas y durante la lactancia, es de 35 µg/d y para bebés (0-5 meses) de 5 µg/d. Estas recomendaciones se basan principalmente en dos estudios, en donde encontraron que dosis diarias de 60 µg (Innis y Allardyce, 1983) y 28 a 42 µg (Chatterjee et al., 1998) de biotina en adultos no dieron ningún indicio de insuficiencia de biotina. En ratones adultos los requerimientos diarios de biotina se basan principalmente en las dietas de bioterio y son de 1.76 mg/kg dieta o 35 µg/diarios para ratones de 20 g de peso (Baez Saldaña y Ortega., 2004).

1.2. LA SUPLEMENTACIÓN CON BIOTINA REGULA LA EXPRESIÓN DE GENES

Estudios en los años 60' mostraron que concentraciones farmacológicas de biotina aumentan la actividad de la glucocinasa hepática (Dakshinamurti y Cheah-Tan, 1968; Dakshinamurti y Chong, 1970) en ratas y en hepatocitos en cultivo (Spence y Koudelka, 1984). Posteriormente, en la década de 1990 se demostró que éste efecto se produce por un aumento en la transcripción del gen de la glucocinasa (Chauhan y Dakshimamurt, 1991). También se reportó que en ratas con diabetes experimental inducida por aloxana, la actividad de las enzimas glucolíticas: fosfofructocinasa y piruvato cinasa en el hígado se incrementan en respuesta a dosis farmacológicas de biotina (2mg/Kg) (Dakshinamurti y Ho, 1970). En contraposición con el efecto positivo de la biotina sobre enzimas de la glucólisis, otros estudios encontraron que la administración aguda de biotina (1mg/kg peso) en ratas diabéticas redujo la abundancia del

ARNm de la fosfoenolpiruvato carboxilasa, enzima de acción hiperglucemiante (Dakshinamurti y Li, 1994).

En un estudio de microarreglos en personas adultas sanas, se encontró que la administración de 2.15 mg al día de biotina durante 21 días en individuos sanos modificó positivamente la expresión de 139 genes, mientras que disminuyó la de 131 en células mononucleadas de sangre periférica (Wiedmann et al., 2004). Esto indicó un amplio efecto en la expresión génica. Otros estudios identificaron que la biotina regula a nivel transcripcional la abundancia del ARNm de proteínas que la requieren como grupo prostético y sustrato, como la holocarboxilasa sintetasa (HSC) (Rodríguez et al., 2001), las carboxilasas (PC y PCC) (Solozarno et al., 2002) y el transportador múltiple de vitaminas dependiente de sodio (SMVT) (Pacheco et al., 2004). Así como de proteínas que no la requieren como cofactor: la interleucina 2 y su receptor (Rodríguez et al., 2003), los factores transcripcionales NF-kB (Rodríguez y Zemleni, 2003), N-myc, c-myc, N-ras, raf (Scheerger y Zemleni, 2003) y SERCA 3 (Griffin et al., 2006), también se modifican en respuesta a concentraciones farmacológicas de biotina.

A nivel traduccional se encontró que también regula a varias proteínas. En estudios de proteómica encontraron que en la línea celular HepG2, aproximadamente 40 proteínas cambiaron al menos 25% su abundancia en respuesta a la suplementación con cantidades farmacológicas de la vitamina (Rodríguez et al., 2005).

1.2.1. MECANISMOS MOLECULARES DEL EFECTO DE LA BIOTINA SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA

A pesar de que existen varios estudios sobre el efecto de la biotina en la modulación de la expresión en una amplia gama de genes, los mecanismos moleculares por los cuales se producen sus efectos son desconocidos. Hasta el momento se han propuesto dos mecanismos (Rodríguez y Zemleni, 2003; Zemleni, 2005). Uno de ellos está ligado a la vía de señalización de la guanilato

ciclase soluble/proteína cinasa G (GC/PKG) y el otro a la biotilación de histonas. Estos dos mecanismos no son necesariamente excluyentes, por lo que podrían coexistir.

1.2.1.1. Biotilación de histonas

Varios estudios han demostrado que la biotina se une a proteínas de histonas de manera específica en varios tipos de celulares y sugiere que podría modificar la expresión génica a este nivel molecular (Hassan y Zemleni, 2006). Entre las funciones relacionadas con la biotilación de histonas esta un decremento de linfocitos polimorfonucleares durante la proliferación celular (Zemleni et al., 2001), cambios durante el ciclo celular de células de sangre periférica humana (Stanley et al., 2001), incremento en la biotilación de histonas por luz ultravioleta en células jukarts (Peters et al., 2002) y cambio en el patrón de biotilación de histonas en *Drosophila m.* (Hoi et al., 2007). Sin embargo, estudios recientes han cuestionado el papel de la biotilación de histonas como mediador de los efectos de la biotina (Bailey et al., 2008; Healy et al., 2009).

1.2.1.2. Vía de señalización de la guanilato ciclase soluble/proteína cinasa G (GC/PKG)

Estudios pioneros en 1982 demostraron que la adición de biotina en líneas celulares aumentaba la actividad de la guanilato ciclase soluble (GCs) (Vesely, 1982). En otros estudios en ratas de Spence y Koudelka, encontraron que en sus hepatocitos aumentó la actividad de la glucocinasa hepática producido por biotina (1mg/kg de peso) y este aumento estaba precedido por un incremento en las concentraciones intracelulares de guanósín monofosfato cíclico (GMPc). Sugiriendo que la biotina en concentraciones farmacológicas ejercía su efecto génico a través de este segundo mensajero. A partir de entonces, pocos pero sólidos 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 GCs, la elevación de las concentraciones de GMPc intracelular y la participación de PKG. Se ha propuesto que en el mecanismo de activación de la

GCs participa el biotil-5'-AMP, producto catalítico de la holocarboxilasa sintetasa, quién por un mecanismo aún desconocido aumenta la actividad de la GCs (Solorzano et al., 2002) (Figura 4). Entre los genes cuya expresión se ha demostrado se encuentran regulados mediante esta vía, están las carboxilasas (ACC-1 y PCC) (Solorzano et al., 2002), el transportador múltiple de vitaminas (SMVT) (Pacheco et al., 2004), el receptor de asialoglicoproteínas (Stocker, 1990; Stocker y Ren, 1997), el receptor de insulina (De la Vega y Stocker, 2000) y la glucocinasa pancreática (Vilches et al., 2010). Además, recientemente se encontró que la biotina reduce la hipertensión arterial y que este efecto está relacionado con la vía de CGs/PKG (Watanabe et al., 2008).

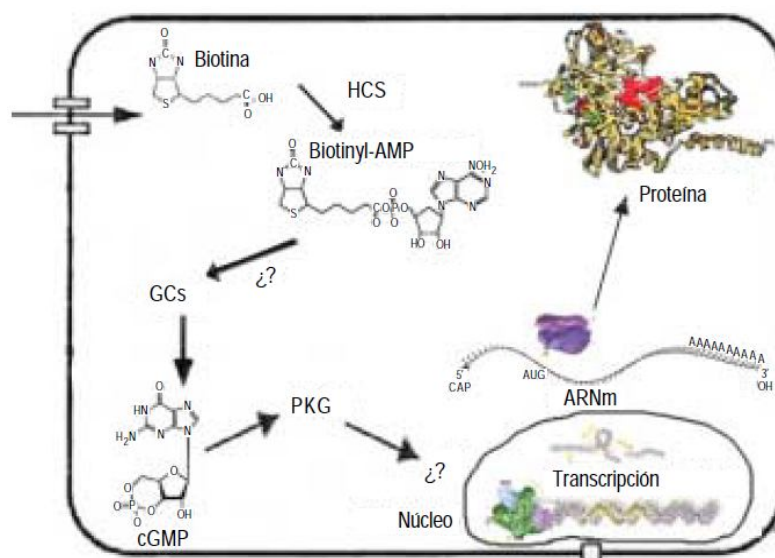


Figura 4. Mecanismo de acción de la biotina a través de la vía de GC/GMPc/PKG. La holocarboxilasa sintetasa (HCS) produce el intermediario biotil-AMP, éste por un mecanismo aún desconocido aumenta la actividad de la guanilato ciclasa soluble (GC). El incremento de las concentraciones de GMPc intracelular activan a la proteína cinasa G (PKG), la cual puede fosforilar diferentes proteínas que participan en la regulación de la expresión genética.

Existen dos estudios que han abordado los mecanismos de la biotina sobre la expresión de genes más allá de la participación de PKG. En nuestro laboratorio se demostró que en el islote pancreático (Vilches et al., 2010), la vía de señalización de GC/PKG es necesaria para desencadenar un aumento de ATP. Lo que induce la secreción de insulina y su acción autocrina a través de la vía de señalización de Akt, produciendo un aumento en la transcripción del gen de la

glucocinasa pancreática. Otros estudios efectuados por el grupo de Stockert encontraron que la activación de PKG conduce a un aumento en la fosforilación y activación de la subunidad α -COP, una proteína coatomérica asociada a un complejo de la traducción en la región *TRANS* de la membrana del Golgi. (De la Vega, 1999). Ésta es hasta el momento la única proteína identificada cuya fosforilación se produce en respuesta a la biotina.

1.3. EFECTO DE LA BIOTINA EN EL METABOLISMO DE LOS LÍPIDOS

Existen menos conocimientos del efecto de concentraciones farmacológicas de biotina sobre el metabolismo de lípidos, que los existentes sobre el de carbohidratos (glucosa). Dado que la biotina interviene directamente como cofactor de ACC (1 y 2), enzimas cruciales en la síntesis y oxidación de ácidos grasos, existe una relación directa entre esta vitamina y el metabolismo de lípidos (Dakshinamurti y Desjardins 1968, Suchy y Wolf, 1986). Se ha reportado que el tratamiento con dosis farmacológicas de la biotina puede modificar de manera benéfica las concentraciones de triacilgliceroles y colesterol.

En estudios hechos en 1960 por Steigerwal y Bohele, encontraron que 30 minutos después de la inyección de 10 mg de biotina en adultos sanos se produjo un decremento en la concentración de lípidos séricos totales (Steigerwal y Bohele, 1960). En otro estudio, la administración de 5 mg de biotina durante 4 semanas en pacientes con aterosclerosis e hipercolesterolemia, produjo un decremento en las concentraciones de colesterol total (Dokusova y Krivoruchenko, 1972). En voluntarios sanos se encontró que la administración de 0.9 mg/día de biotina produjo modificaciones en los niveles de lípidos plasmáticos, las cuales variaron dependiendo del tiempo de administración, encontrándose que durante las primeras dos semanas se incrementaron las concentraciones de lípidos totales, fosfolípidos y lipoproteínas alfa y beta. Posterior a este período, se produjo una disminución en las concentraciones lipídicas y estas variaciones fueron mayores en los individuos que presentaron hiperlipidemia (Marshall et al., 1980). En nuestro laboratorio (Báez-Saldaña et al., 2004; Revilla-Monsalve et al., 2006)

encontraron que el tratamiento con 5mg de biotina tres veces al día en pacientes diabéticos y no diabéticos, disminuyó las concentraciones de triacilgliceroles plasmáticos. La disminución fue más pronunciada en pacientes cuyas concentraciones de triacilgliceroles se encontraban por arriba de los límites normales de triacilgliceroles sanguíneos.

En estudios con animales de experimentación también se encontró que la biotina modifica la hiperlipidemia. En la cepa de ratas BHE con predisposición genética para desarrollar elevadas concentraciones sanguíneas de glucosa y lípidos (Marshall et al., 1969), el tratamiento con biotina disminuyó las concentraciones de lípidos séricos (Marshall et al., 1976). Levert y colaboradores encontraron que en la línea celular de adipocitos 3T3-L1 un análogo cloroacetilado de biotina (CABI), inhibe la actividad de ACC-1 y reduce la expresión de los factores STAT-1, STAAT-5a y PPAR- γ , factores transcripcionales que juegan un papel muy importante en el metabolismo de lípidos (Levert et al., 2002). Estas evidencias sugieren que el mecanismo de acción por el cual la biotina afecta al metabolismo de los lípidos está relacionado con la modulación en la expresión de genes.

Nuestro laboratorio ha estudiado cuál es el efecto de la biotina sobre la expresión de genes del metabolismo de lípidos en diferentes modelos animales. En ratones sanos encontramos que una dieta suplementada con biotina durante 8 semanas, disminuyó los niveles séricos de triacilgliceroles; esta disminución se encontró asociada a una menor expresión del ARNm de enzimas y factores transcripcionales lipogénicos. En el tejido adiposo, la abundancia del ARNm de SREBP-1c, ACC-1, FAS y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PDH) fue menor que lo observado en los ratones control. En el hígado de los ratones suplementados con biotina, se observó reducción en la abundancia del ARNm de SREBP-1c, así como de FAS, PC y el transportador de glucosa (GLUT2); pero no en el ARNm de ACC-1. No encontraron diferencias entre los grupos en la abundancia del ARNm del factor PPAR- γ en hígado, pero sí en tejido adiposo en los tratados con biotina. En tanto que el ARNm de PPAR- α no se modificó ni en hígado ni en tejido adiposo (Larrieta et al., 2010).

También encontramos que el efecto hipotriglicéridémico de la biotina se produce en ratas hipertriglicéridémicas. En este modelo se observó que el tratamiento con biotina (2 mg/kg) durante 28 días a decrementó las concentraciones de triacilglicérols sanguíneos y la expresión en el tejido adiposo de genes lipogénicos como factor SREBP-1c y de las enzimas ACC-1 y FAS, cuya expresión está regulada de manera positiva por SREBP-1c. Igualmente la biotina redujo la expresión PPAR- γ así como de de enzimas que participan en la producción de glicérol *de novo*, fosfoenol piruvato carboxinasa (PEPCK) y piruvato carboxilasa (PC) (Vital et al., 2006). En tanto que en el hígado no encontraron diferencias significativas en la abundancia del ARNm de ninguno de estos genes (Vital et al., 2006).

Por otro lado, existen comercialmente medicamentos disponibles que contienen cantidades farmacológicas de biotina (2mg) en combinación con el picolinato de cromo (600 μ g), los cuales producen una reducción significativa de triacilglicérols totales en suero y de la proporción de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y aumenta las lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Albarracín et al. 2007).

1.4. METABOLISMO DE LÍPIDOS

El término lípido se utiliza de manera genérica para nombrar a diversas biomoléculas de estructuras muy diferentes, pero que tienen en común el ser hidrofóbicas. Los lípidos tienen diversas funciones en los seres vivos, entre ellas están las estructurales, de señalización y como fuentes de energía. Los triacilglicérols son la principal fuente de energía, ya que aportan el mayor valor energético de todos los nutrimentos (David y Michael, 2000). También sirven como depósito de ácidos grasos esenciales y no esenciales que se utilizan como precursores en la síntesis de fosfolípidos estructurales y funcionales en todas las células (Gibbons et al., 2000). Además, los triacilglicérols atenúan la señalización por diacilglicérol (DAG), ya que la elevación sostenida de sus niveles se relaciona con la transformación maligna en varios tipos celulares (Coleman y Lee, 2004).

Al hígado se le considera el principal órgano involucrado en la regulación del metabolismo de lípidos, ya que participa en su síntesis, exportación, captación y oxidación (Abou-Rjaili et al., 2010) (Figura 5). Todos estos procesos son regulados de diferentes maneras que incluyen mecanismos alostéricos, transcripcionales y postraduccionales, los cuales son mediados por hormonas y metabolitos (Nguyen et al., 2008; Coleman y Lee, 2004).

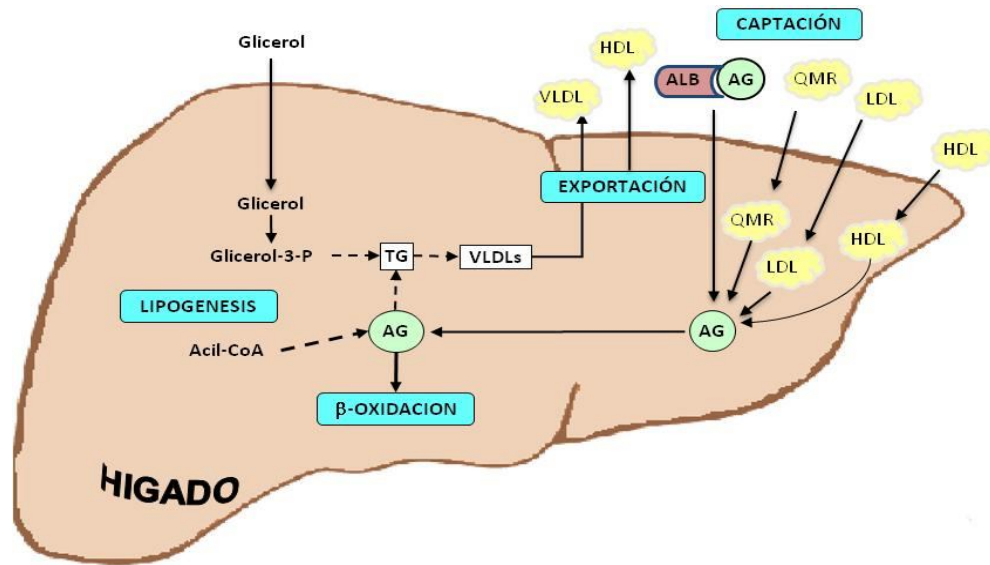


Figura 5. Síntesis, exportación, captación y oxidación de lípidos en el hígado. El hígado es el órgano más importante en la homeostasis lipídica por la cantidad de vías metabólicas en las que participa: lipogénesis, β -oxidación, exportación y captación. ALB (Albumina); QMR (Quilomicrones remanentes); LDL (Lipoproteínas de baja densidad); HDL (Lipoproteínas de alta densidad); AG (Ácidos grasos); TG (Triglicéridos).

Los lípidos provienen de la dieta o son sintetizados *de novo*, como por ejemplo los triacilgliceroles a partir de azúcares mediante el proceso denominado lipogénesis y son almacenados en el tejido adiposo cuando hay un exceso. Cuando se requiere de energía, éstos son hidrolizados en ácidos grasos y glicerol por la vía metabólica denominada lipólisis. Estos metabolitos son oxidados en otros tejidos, para la obtención de energía. En la oxidación de ácidos grasos participan principalmente el tejido muscular y en menor grado el hígado produciendo cuerpos cetónicos en periodos de ayuno prolongado (Figura 6).

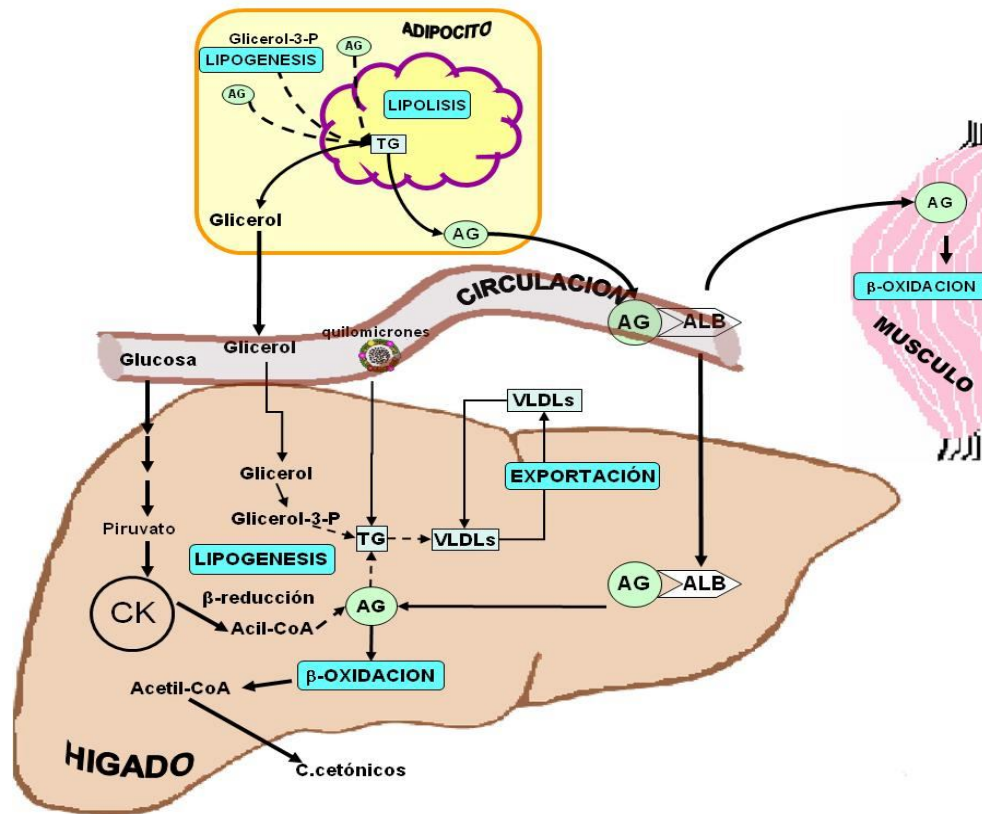


Figura 6. Principales órganos que regulan la homeostasis lipídica. Los lípidos pueden provenir de la dieta o ser sintetizados *de novo*. Estos se almacenan en el tejido adiposo en forma de triglicéridos y en condiciones de ayuno, los triglicéridos se hidrolizan (lipólisis) y liberan para ser utilizados como fuente de energía principalmente el músculo y en menor grado en el hígado. En periodos prolongados de ayuno el hígado produce cuerpos cetónicos como fuente de energía. ALB (Albúmina); AG (ácidos grasos); TG (Triglicéridos); VLDLs (Lipoproteínas de muy baja densidad); CK (Ciclo de Krebs).

1.4.1. LIPOGÉNESIS

La lipogénesis es un proceso en que participan la síntesis de ácidos grasos (β -reducción) y su conjugación con el glicerol para formar triacilgliceroles (esterificación). En los humanos el hígado tiene el principal rol en éstos dos procesos (Nguyen et al., 2008). La síntesis *de novo* a partir de carbohidratos utiliza la vía glucolítica para formar estos productos. El producto final de esta vía, el piruvato, mediante la acción enzimática del complejo piruvato deshidrogenasa (PDH)

se convierte en acetil-CoA y subsecuentemente en citrato en la mitocondria. El citrato sale del organelo hacia el citoplasma donde es hidrolizado por la citrato liasa (CL), en acetil-CoA y oxalacetato. La carboxilasa ACC-1 transforma este compuesto en malonil-CoA, molécula que constituye el bloque básico en la síntesis de los ácidos grasos. El malonil-CoA mediante la enzima ácido graso sintasa (FAS) se conjuga con una molécula de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA, que a su vez se conjuga con el bloque básico, el malonil-CoA, formando un ácido graso con mayor número de carbonos; este paso se repite hasta formar ácidos grasos de cadena larga (Bergen y Mersmann, 2005).

Durante el proceso de síntesis de ácidos grasos es necesario del cofactor NADPH, el cual proviene de la vía de las pentosas y de la conversión en el citosol de piruvato a malato por la enzima málica (ME). Además, los ácidos grasos sintetizados pueden ser desaturados antes de ser incorporados al esqueleto de glicerol, por la estearil-CoA desaturasa (SDC) (Pawel et al., 2010). Las dos primeras enzimas en la síntesis de ácidos grasos, ACC-1 y FAS, regulan la velocidad de la vía, pero es la ACC-1 la enzima paso limitante. La esterificación se realiza al unirse tres ácidos grasos de cadena larga con una molécula de glicerol, por medio de las enzimas glicerol fosfato acil transferasa (GPAT), acil glicerol fosfato acil transferasa (AGPAT), monoacil glicerol acil transferasa (MGAT) y diacil glicerol acil transferasa (DGAT) para formar triacilgliceroles o triacilgliceroles (Coleman et al., 2000). Los triacilgliceroles sintetizados en el hígado son exportados por medio de lipoproteínas a otros tejidos y en particular al tejido adiposo donde son almacenados (Figura 7) (Abou-Rjaili et al., 2010).

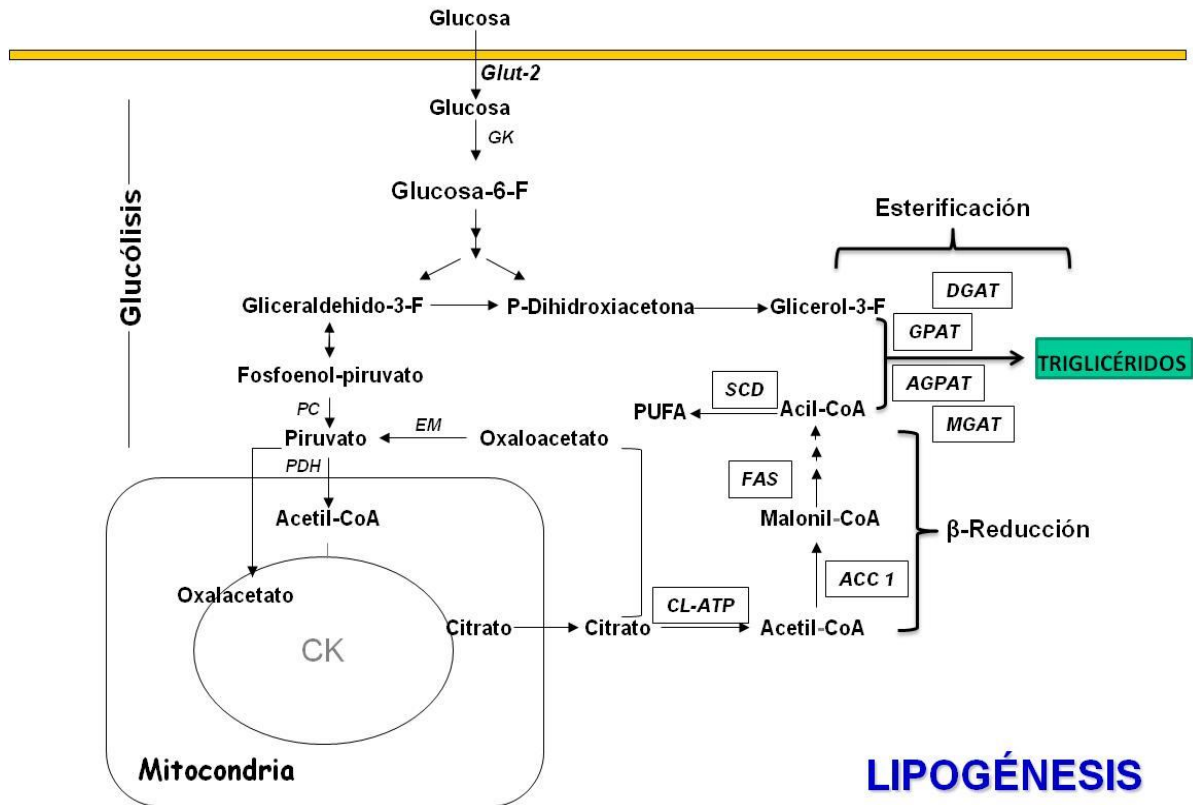


Figura 7. Lipogénesis hepática *de novo*. La síntesis *de novo* de ácidos grasos (β -reducción) se realiza en el citosol a partir de carbohidratos y utiliza la vía de la glucolítica para formar estos productos y la esterificación se realiza a unirse 3 ácidos grasos con una molécula de glicerol para formar triacilglicéridos. PDH (Complejo piruvato deshidrogenasa); CL-ATP (Citrato liasa); ACC-1 (acetil-CoA carboxilasa 1); FAS (ácido graso sintasa); acil-CoA (ácido graso de cadena larga-CoA); PUFA (ácidos grasos poliinsaturados); SDC (estearil-CoA desaturasa); GPAT (glicerol fosfato acil transferasa); AGPAT (acil glicerol fosfato acil transferasa); MGAT (monoacil glicerol acil transferasa); DGAT (diacil glicerol acil transferasa); CK (Ciclo de Krebs).

1.4.2. OXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

Los ácidos grasos se oxidan principalmente en el tejido muscular, pero también son una fuente de energía muy importante para el hígado y la corteza renal. Durante el ayuno prolongado la oxidación de lípidos representa casi un 70% de la energía necesaria (Large et al., 2004). Los ácidos grasos son oxidados en el proceso denominado β -oxidación, principalmente en la mitocondria y una pequeña fracción en los peroxisomas. La β -oxidación peroxisomal no proporciona energía directamente, pero es capaz de acortar los ácidos grasos de cadena muy

larga, preparándolos para su posterior β -oxidación mitocondrial. Los ácidos grasos de cadena larga entran a la mitocondria mediante el sistema de transporte de carnitinas y los de cadena corta no requieren de proteínas transportadoras para entrar.

La regulación de la β -oxidación en el músculo esquelético es compleja y está controlada a diferentes niveles: 1) la tasa de transporte a través de la membrana celular de los ácidos grasos, 2) su capacidad de transporte dentro del citoplasma, 3) su velocidad de transporte a través de la membrana mitocondrial, 4) la capacidad oxidativa mitocondrial en términos del contenido y actividad enzimática, 5) retroalimentación por intermediarios de la vía oxidativa, y 6) la relativa disponibilidad de carbohidratos como fuente de energía. La importancia de cada nivel de regulación puede variar dependiendo el estado celular, es decir, el paso limitante bajo cierta circunstancia no necesariamente es el paso limitante bajo otra circunstancia (Thomson y Winder, 2009). Se ha propuesto que el sitio más importante en la regulación de la oxidación de los ácidos grasos es el transporte de los acil-CoA de cadena larga del citosol a la matriz mitocondrial (Ruderman et al., 1999). La enzima paso limitante en este proceso es la CPT-1 y en el músculo esquelético la ACC-2 juega un importante rol en su regulación produciendo malonil-CoA que inhibe alostéricamente a CPT-1 (McGarry y Brown, 1997).

Posterior a su entrada a la mitocondria, el ácido graso-CoA (acil-CoA) formado por la acil-CoA-sintetasa, es oxidado en una espiral de reacciones que incluyen a las enzimas acil-CoA deshidrogenasa, la 2-3 enoil-CoA hidratasa, la 3-hidroxiacil CoA deshidrogenasa y la β -cetoacil-CoA tiasa. El acetil-CoA generado se metaboliza subsecuentemente en el ciclo de Krebs. Finalmente, de los equivalentes reductores flavin adenina dinucleótido reducido (FADH_2) y nicotinamida adenina dinucleótido reducido ($\text{NADH}+\text{H}$), producidos en las reacciones del ciclo de Krebs se obtiene energía por medio de la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa (Figura 8) (Simon et al., 1996).

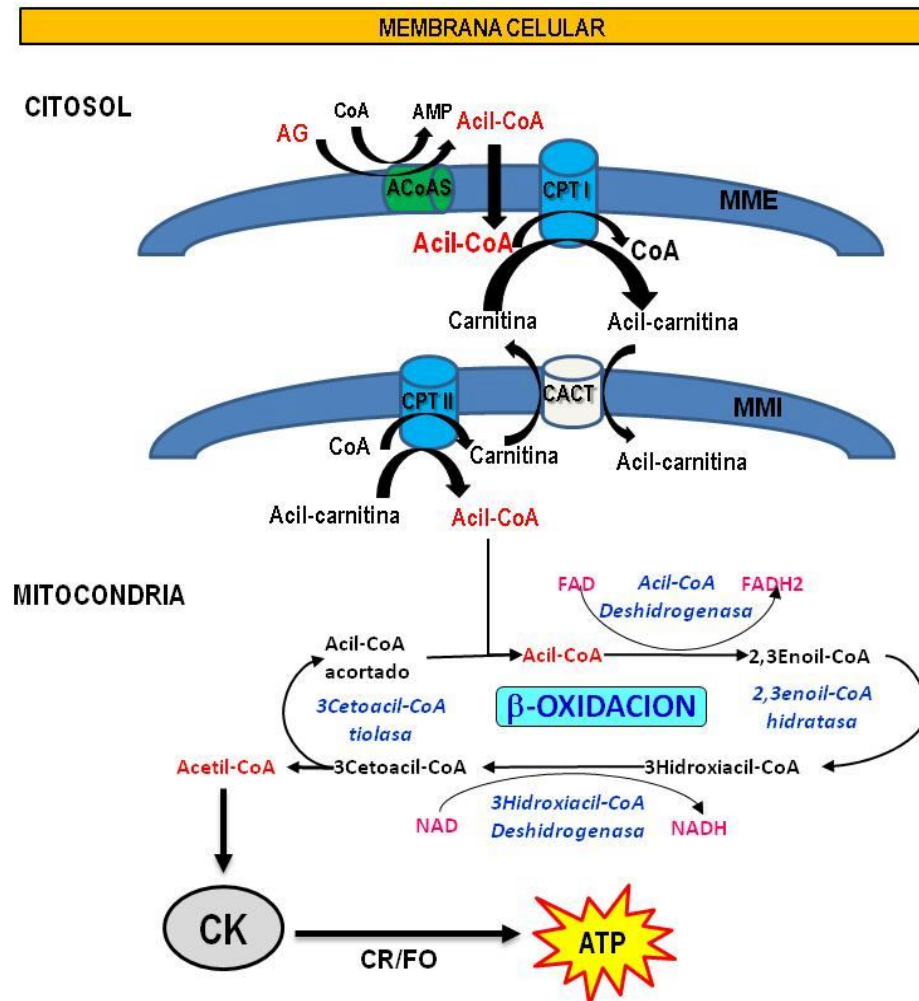


Figura 8. Oxidación de ácidos grasos. En la mitocondria, los ácidos grasos se conjugan con CoASH y se metabolizan por medio de varios ciclos de oxidación, en los cuales se producen equivalentes reductores FADH_2 y $\text{NADH}+\text{H}$ que se oxidan en la cadena respiratoria/fosforilación oxidativa. El producto final de la β -Oxidación, el acetil-CoA, se metaboliza en el ciclo de Krebs. ACoAS (acil-CoA-sintasa); CPT I y II (Carnitina palmitoiltransferasa, I, II); MME (Membrana mitocondrial externa); MMI (Membrana mitocondrial interna); CACT (carnitina acilcarnitina translocasa); FADH_2 (flavin adenin dinucleótido reducido); $\text{NADH}+\text{H}$ (nicotinamida adenin dinucleótido reducido) CR/FO (Cadena respiratoria y fosforilación oxidativa).

1.4.3. SISTEMA DE TRANSPORTE DE CARNITINAS EN LA OXIDACIÓN

Los grupos acil-CoA son imprescindibles en la oxidación de ácidos grasos. Debido a su alta actividad biológica se mantienen separados en diferentes compartimentos celulares. Consecuentemente, la célula posee un mecanismo para el control de las concentraciones de

ésteres de CoA que es rápido y no involucra las energéticamente costosas hidrólisis y resíntesis de los ésteres. La célula consigue todos estos requerimientos gracias a un simple mecanismo, la trans-esterificación entre los acil-CoA y la L-carnitina (3-hidroxi-4-trimetilaminobutirato) para formar el correspondiente ester de carnitina y regenerar el grupo CoA (Zammit, 1999).

Este sistema de trans-esterificación está compuesto por diferentes enzimas, distinguiéndose entre ellas por la afinidad hacia la longitud de la cadena del acil-CoA que utilizan como sustrato. La carnitina octanoiltransferasa (COT) facilita el transporte de acil-CoA de cadena media (C8-C12) de los peroxisomas o el citosol a las mitocondrias a través de la conversión de los acil-CoA de cadena muy larga (C20-C26) acortados tras la β -oxidación peroxisomal (Ferdinandusse et al., 1999). La COT tiene también una importante acción destoxicadora sobre moléculas como eicosanoides y xenobióticos. Las carnitina palmitoiltransferasas (CPT-1 y 2) facilitan el transporte de los acil-CoA de cadena larga (C14-C18) a la matriz mitocondrial (McGarry y Brown, 1997). Finalmente, la carnitina acilcarnitina translocasa (CACT) transfiere a la matriz mitocondrial al ácido graso unido a la carnitina y restituye la carnitina al citosol. Otra característica que diferencia a las carnitina aciltransferasas es su sensibilidad a la inhibición por malonil-CoA. La CPT-1 es muy sensible a malonil-CoA, la COT es poco sensible, mientras que la CACT y la CPT-2 son insensibles al malonil-CoA (Bieber, 1988).

1.4.4. REGULACIÓN DE LA LIPOGÉNESIS Y LA OXIDACIÓN

1.4.4.1. Regulación por enzimas y metabolitos

1.4.4.1.1. En la lipogénesis

Esta vía puede ser regulada por cambios en la transcripción de dos enzimas, la ACC1 y la FAS. También diversos metabolitos actúan como factores alostéricos de la lipogénesis. La carboxilasa ACC-1 está regulada por el citrato y el glutamato quienes la activan promoviendo su

oligomerización. En cambio, los acil-CoA, ácidos grasos libres y el malonil-CoA son importantes inhibidores alostéricos de esta enzima. La regulación de FAS es también llevada a cabo por la concentración de ácidos grasos en el citosol, cuyo incremento inhibe la actividad de la enzima (Nobuko, 1992).

1.4.4.1.2. En la oxidación

La enzima ACC-2 es regulada alostéricamente de manera positiva por citrato y glutamato y de manera negativa por altas concentraciones de ácidos grasos saturados, lo cual provoca un aumento en las oxidaciones de éstos (Tong, 2005). Otro punto de control es el paso catalizado por la β -cetoacil-CoA tiolasa, la enzima que cataliza la reacción final de la β -oxidación: hidrólisis del β -cetoacil-CoA en acetil-CoA y acil-CoA. El acetil-CoA es un inhibidor alostérico de esta enzima y cuando se acumula, la tiolasa se inhibe y esto provoca una disminución en la β -oxidación (Liang et al., 2001). La ACC-2 y el malonil-CoA, producto de su actividad, regulan la oxidación de los ácidos grasos de manera negativa (Yong et al., 2010; Tong, 2005). El mecanismo se produce a través del aumento de este metabolito, el cuál inhibe alostéricamente a CPT-1 y produce una disminución del transporte de ácidos grasos dentro de la mitocondria para su oxidación.

Otro modulador de la β -oxidación son los niveles de carnitina que actúan sobre la CPT-1. La carnitina es sustrato para la CPT-1 y por lo tanto es necesaria para el transporte de ácidos grasos al interior de la mitocondria. Por esta razón, la carnitina juega también un papel importante en la regulación de la oxidación de ácidos grasos (Roepstorff et al., 2004). Por ejemplo, en situaciones en las que la intensidad de ejercicio va aumentando, la formación de acetil-CoA a partir de piruvato excede la capacidad del ciclo de Krebs para utilizarlo, acumulándose acetil-CoA. Para restaurar los niveles de CoA-SH libre, los acetilos se unen a la carnitina formándose acetil-carnitina, disminuyendo los niveles de carnitina libre y por lo tanto la actividad CPT-1 (Hiatt et al., 1989).

1.4.4.2. Por vías de señalización

1.4.4.2.1. Señalización por insulina vía proteína cinasa B (PKB/AKT)

La interacción de la insulina con su receptor promueve la autofosforilación de éste, produciendo cambios conformacionales que catalizan la fosforilación de proteínas intracelulares. Posterior a la fosforilación de las proteínas IRS (IRS-1 e IRS-2 principalmente), éstas activan a la enzima fosfoinositol 3-cinasa (PI3K), la cual produce fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3). Éste metabolito promueve la activación de cinasas dependientes de fosfoinositol (PDK-1) y en consecuencia, la PDK1 activa a la proteína PKB por fosforilación en la treonina 308. Esta proteína fosforilada tiene un papel central en las acciones metabólicas de la insulina. La cascada de la señalización de la insulina se inhibe por fosfatasa específicas. La proteína- tirosin fosfatasa 1B (PTP1B), la proteína homóloga a fosfatasa y tensina (PTEN), la SHP2, y la proteína SOCS-3 (proteína supresora de la señalización de citocinas-3) que actúan en la terminación de la señalización de la insulina.

En el metabolismo de los lípidos la vía de señalización de la insulina vía PI3K/PKB favorece la lipogénesis y la síntesis de colesterol, activando al factor transcripcional SREBP. Existen varias hipótesis para explicar como la vía de PKB puede influenciar al factor SREBP: uno de ellos es a través de la estabilidad del ARNm, PKB fosforila a la cinasa GSK3 inactivándola (Cross et al., 1995) y se sabe que ésta cinasa puede fosforilar a SREBP promoviendo su degradación proteosomal por ubiquitinación (Bengoechea-Alonso, 2009). Otra posibilidad es a través del complejo mTORC1, se ha propuesto que este multímero puede regular la estabilidad y abundancia de SREBP maduro regulando positivamente su procesamiento y transporte del retículo endoplásmico al aparato de Golgi (Porstmann et al., 2008; Liu y Zheng, 2007). Además, la vía de señalización de la insulina a través de PKB/Akt inhibe la lipólisis disminuyendo el AMPc mediante la activación de la fosfodiesterasa-3B (PDE3B) (González y Sánchez, 2006).

1.4.4.2.2. Señalización por proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs)

La vía de señalización de la insulina después de la activación de las proteínas IRS 1/2 es mediada por varios caminos, siendo uno de los más importantes el de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs). En términos generales, la señal se transporta mediante la subfamilia de factores de intercambio de nucleótidos de guanina GRB2 y de SOS a la proteína Ras (una proteína G monomérica). Esta proteína activada, estimula a proteínas cinasas que actúan de forma secuencial y culminan con la activación de las ERKs (quinasas reguladas por señales extracelulares). Las cuales son serina-treonina cinasas capaces de translocarse al núcleo y regular la transcripción de diversos genes diana (Inbal et al., 2011).

En el metabolismo de lípidos varios estudios han demostrado que la activación de la cascada de señalización de ERK1/2 regula la transcripción del receptor de lipoproteínas de baja densidad (rLDL) (Punita et al., 1999; Gurpreet et al., 2002). Además, se propone que existe una interacción entre las vías de señalización de AMPK y las ERK 1/2, ya que se ha visto que una disminución en la fosforilación de ERK 1/2 incrementa la actividad del factor transcripcional PPAR- α vía activación de la cinasa AMPK y por lo tanto aumentaría la oxidación de ácidos grasos (Jianhai et al., 2008; Rongsen et al., 2011).

1.4.4.2.3. Señalización por glucagon y catecolaminas vía la proteína cinasa A (PKA)

Hormonas como el glucagon, la adrenalina y la noradrenalina ejercen su acción mediante receptores acoplados a proteínas G. La interacción de estas hormonas con su respectivo receptor produce cambios en la conformación de éste que favorecen su interacción con el complejo de proteínas G membranales (G- α , - β y - γ). Esta interacción causa el reemplazo del GDP (que se encuentra unido a la subunidad G-alfa) por GTP. Este intercambio de nucleótidos promueve la unión de G-alfa con la enzima adenilato ciclasa, aumentando la formación de AMPc. Este nucleótido cíclico activa a su vez a la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) que fosforila a

diferentes proteínas modulando así la actividad de éstas y como consecuencia modificando el metabolismo (Lawrence et al., 2009).

El efecto del glucagón sobre el metabolismo de lípidos es través de la vía de PKA, activando la oxidación de ácidos grasos mediante la fosforilación de ACC-2 y disminuyendo la lipogénesis por fosforilación de ACC-1 (Brownsey et al., 2006). Por otro lado, el glucagón incrementa la lipólisis en el tejido adiposo por fosforilación de PKA sobre la lipasa sensible a hormonas (Rodgers, 2012). Otros reguladores de la lipólisis son las catecolaminas (epinefrina y norepinefrina) quienes regulan la lipólisis por medio de la vía de señalización de PKA, vía tres subtipos de receptores β -adrenérgicos (Tavernier et al., 2005). Los eventos metabólicos están conectados principalmente con el incremento en los niveles de AMPc, activación de la PKA y la fosforilación activa tanto de la LSH como de la perilipina A, siendo la LSH la de mayor influencia en la regulación de la lipólisis estimulada por receptores adrenérgicos (Brenda, 2006).

1.4.4.2.4. Señalización por cambios en el contenido energético vía la cinasa activada por AMP (AMPK)

El metabolismo de lípidos está regulado por la vía de señalización de AMPK, la cual responde a las condiciones energéticas intracelulares de las células. A diferencia de las vías de señalización por hormonas, la mediación de sus efectos no se produce por receptores membranales, sino a través del aumento en las concentraciones del AMP. Esta enzima esta formada por tres subunidades (α , β y γ) y se encuentra activa en su forma fosforilada en treonina 172 de la subunidad alfa, debido a un cambio conformacional producido por la unión del AMP en la subunidad γ , que permite que sea fosforilada y activada por otras cinasas como LKB1, CaMKK- β y TAK-1 (Rutter et al., 2003). Las adipocinas, leptina y adiponectina activan a AMPK, pero la leptina también la puede inhibir en el hipotálamo, lo que controla la ingesta de alimento (Barbara et al., 2005; Hardie, 2011). Se han reportado varios compuestos que también pueden activar a AMPK de manera indirecta incrementando la concentración de AMP intracelular: 1)

inhibiendo la cadena respiratoria (biguanidinas, galegina, troglitazona, fenobarbital, berberina), 2) inhibiendo la síntesis mitocondrial de ATP (oligomicina y resveratrol), 3) inhibiendo la glicólisis (2-deoxiglucosa), 4) incrementando el Ca^{2+} (A23187), (5) mimetizando al AMP (AICAR) (Simon et al., 2010). En el músculo, se ha encontrado que AMPK también puede ser activada por la vía de señalización de GC/PKG (Deshmukh et al., 2010).

La cinasa AMPK a través de reacciones de fosforilación favorece las vías metabólicas cuya rol es la producción de energía, como la oxidación de ácidos grasos y disminuye la actividad de vías que consumen energía, como la lipogénesis (Hardie, 2011). Entre los mecanismos por los cuales AMPK disminuye la lipogénesis se encuentran: La regulación del factor transcripcional lipogénico SREBP-1c, la inactivación por fosforilación de la enzima glicerol fosfato acil transferasa, clave en la esterificación del glicerol-3-fosfato con los ácidos grasos (Nguyen et al. 2008) y la regulación de la fosforilación de ACC-1. Se ha reportado que AMPK fosforila a SREBP-1c disminuyendo su procesamiento proteolítico del retículo endoplásmico y por lo tanto su forma activa y localización nuclear (Zhou, et al 2001; Li et al., 2011). También se ha propuesto que la disminución del ARNm de SREBP-1c por la activación de AMPK, se debe a una disminución del factor transcripcional del receptor X del hígado (LXR), el cual regula positivamente a SREBP-1c (Jian et al., 2009). La AMPK también regula a la esterificación de ácidos grasos con glicerol a través de la inactivación de la enzima glicerol fosfato acil transferasa (GPAT), la cual es clave en éste proceso; lo que conlleva a un decremento en la producción de triacilgliceroles y por lo tanto en la producción de VLDL (Nguyen et al., 2008).

Otra acción de la cinasa AMPK es la regulación de la producción de malonil-CoA, metabolito inicial de la lipogénesis que, a su vez, regula la oxidación de los ácidos grasos: En este mecanismo participa la fosforilación de las carboxilasas ACC-1 y 2, que produce la disminución de su actividad. Lo que provoca un decremento en la síntesis de malonil-CoA y por ende una reducción en la síntesis de ácidos grasos y un aumento en sus oxidaciones, debido a un mayor transporte de éstos a la mitocondria por una desrepresión en la actividad de CPT-1. Además,

AMPK regula de manera positiva a la malonil-CoA descarboxilasa (MCD) lo que también contribuye a una disminución en la concentración de malonil-CoA (Hardie, 2011).

Con respecto a la oxidación de los ácidos grasos la AMPK produce un efecto positivo por medio de una estimulación indirecta de CPT-1, vía fosforilación de componentes del citoesqueleto (Velasco et al., 1998). En estos estudios se propone que la proteína cinasa β dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (CamKK- β) y AMPK juegan un papel central, no sólo activando la CPT-1, sino también fosforilando e inactivando la ACC-2 y por lo tanto reforzando la activación de la CPT-1 mediante la disminución de los niveles de malonil-CoA. Otras acciones de la AMPK sobre la oxidación de ácidos grasos es llevada a cabo a nivel transcripcional y pos-transcripcional, a través de los factores transcripcionales PPAR- α y el coactivador PGC1- α (Hardie, 2011), que son imprescindibles en el control de la oxidación de ácidos grasos y en la biogénesis mitocondrial respectivamente.

1.4.4.2.5. Señalización por la vía de guanilato ciclasa, GMP cíclico y proteína cinasa G (GC/GMPc /PKG)

Si bien la participación del guanosin monofosfato cíclico (GMPc) como regulador de funciones biológicas se describió hace varias décadas, es recientemente que se ha investigado su cascada de fosforilación y su efecto sobre la expresión de genes (Pilz y Casteel, 2003). El GMPc es generado por diferentes procesos: 1) mediado por la guanilato ciclasa soluble (GCs), la cual es activada por óxido nítrico, monóxido de carbono (Pilz y Casteel, 2003) y biotina (Stockert y Morell, 1990; Solorzano et al., 2002) y 2) por la guanilato ciclasa particulada (GCp), los agonistas de ésta son los péptidos natriuréticos y las guanilinas (Pilz y Broderik, 2005). Las proteínas efectoras del nucleótido incluyen: 1) fosfodiesterasas (PDEs); 2) proteínas cinasas dependientes de GMPc (PKG-1 y 2) y 3) canales iónicos (Kimberly et al., 2000).

Estudios *in vivo* e *in vitro* encontraron que donadores de óxido nítrico (cuya acción es incrementar el GMPc) reducen la hipercolesterolemia (Kurowska y Carroll, 1998). Además, se observó que en modelos animales de diabetes tipo 2, el aumento en la producción de óxido nítrico reduce las concentraciones séricas de triacilgliceroles totales y VLDL (Míguez, 2004). En tanto que la alimentación de ratas con inhibidores de la óxido nítrico sintasa (eNOS), produjo incrementos en suero de triacilgliceroles, colesterol y VLDL. En cardiomiocitos de ratones transgénicos con una forma constitutivamente activa de la guanilato ciclasa, se observó una modulación en el tráfico y la acumulación de lípidos (Khedara et al., 1999; Khairallah et al., 2008).

García-Villafranca encontró en hepatocitos aislados de rata, que el tratamiento con donadores de óxido nítrico inhibió la síntesis *de novo* de ácidos grasos y la actividad de ACC-1 y se incrementó la oxidación de los ácidos grasos. Este efecto fue mimetizado con 8-Br-GMPc y suprimido con KT5823, un inhibidor de PKG (García-Villafranca et al., 2003). De manera similar Hayden y colaboradores encontraron que en hepatocitos de rata, análogos del GMPc inhibieron la formación de lípidos a partir de acetato marcado radiactivamente (Hayden et al., 1983). En ratas, la reducción de GMPc mediante la alimentación con L-N-omega nitroarginina, un inhibidor de la enzima eNOS, disminuyó la oxidación hepática de ácidos grasos (Khedara et al., 1996). El efecto del GMPc también se observó en el músculo esquelético, en donde el donador de óxido nítrico, nitroprusiato de sodio, incrementó la oxidación de palmitato por un mecanismo que requiere de la activación de PKG (Young y Leighton, 1998).

1.4.4.3. Por factores transcripcionales

Existe una amplia variedad de factores transcripcionales que regulan el metabolismo de lípidos en respuesta a las vías de señalización (Donald et al., 2005; Béatrice et al., 2006), entre los que podemos mencionar, al receptor LXR (Baranowski, 2008), receptor RXR, receptor FXR (Yan-Dong et al., 2008), receptor TH (Yan-Yun y Gregory, 2010), factor ChREBP (Poupeau y Postic, 2011), SREBP (Rajendra et al., 2008), factor HNF4- α (Gonzalez, 2008), FOXO (Zhiyong y Morris,

2011), PGC1- α,β (Handschin y Spiegelman, 2005) y a el factor PPAR (Michael y Mitchell, 2010). Todos los factores transcripcionales trabajan de manera orquestada en una compleja red y cada vez emergen nuevos factores e interacciones entre ellos.

1.4.4.3.1. SREBP-1c

Los factores SREBP juegan un rol central en la síntesis de lípidos. Se conocen tres isoformas del factor SREBPs, denominados SREBP-1a, SREBP-1c y SREBP-2 con una alta homología a nivel de secuencia. Todos ellos presentan un dominio N-terminal de transactivación, seguido por un motivo de unión al DNA (cremallera de leucinas) y por último dos dominios hidrofóbicos implicados en su localización en el retículo endoplasmático. Se expresa ampliamente en todos los tejidos, pero principalmente en el hígado y en el tejido adiposo. SREBP-1c actúa como mediador de la señal de la insulina en la regulación de la expresión de genes del metabolismo de carbohidratos y lípidos (Rajendra et al., 2008).

Los SREBPs son sintetizados como precursores de alto peso molecular que necesitan ser hidrolizados para activarse. Sus formas inactivas se encuentran unidas a la membrana del retículo endoplasmático y para ser activas tienen que ser procesadas proteolíticamente dejando libre el dominio N-terminal, el cual se transloca al núcleo donde se une a los elementos de respuesta a esteroides (SREs) y activa la transcripción de múltiples genes diana. Cuando las concentraciones de esteroides son bajas, SREBP forma un complejo con SCAP (*SREBP Chaperone*, proteína chaperona de SREBPs) lo que permite el paso de estas proteínas desde el retículo endoplasmático al aparato de Golgi vía vesículas COPII. En el aparato de Golgi mediante dos pasos proteolíticos se deja libre el extremo N-terminal de SREBP de forma que puede translocarse al núcleo donde regula genes de la síntesis de ácidos grasos así como de colesterol (Goldstein et al., 2006). Por lo contrario cuando los niveles de esteroides en la célula son elevados, INSIG (*Insulin Induced Gene 1*, gen inducido por insulina) se une a SCAP, impidiendo la formación

del complejo SCAP/SREBP e inhibiendo tanto el movimiento hacia el aparato de Golgi como el procesamiento y activación de SREBP (Sun et al., 2007).

El factor SREBP-1c es un importante regulador transcripcional de las enzimas involucradas en la síntesis *de novo* de ácidos grasos, como ACC-1, FAS, SCD-1, ME y CL (Foufelle y Ferre, 2002). De igual forma, se ha visto que SREBP-1c puede regular positivamente la expresión de la glicerol fosfato acil transferasa mitocondrial (mGPAT) y también de la enzima ACC-2 (So-Young, et al., 2003; Seung-Soon et al., 2009).

1.4.4.3.2. PPAR- α

Los factores PPARs son proteínas que pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares. Se conocen 3 isoformas denominadas α , β/δ y γ , las cuales son codificadas por genes individuales con alto grado de similitud. Además, existen tres variantes transcripcionales derivadas del gen PPAR- γ , denominadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ y $\gamma 3$. Los PPARs participan en la regulación de la expresión de genes específicos, a través de un mecanismo que es común a los miembros de la superfamilia de receptores nucleares. La unión del ligando a PPAR resulta en la activación de éste como factor transcripcional. El receptor dimeriza, formando un heterodímero con el receptor del ácido retinoico (RXR). El receptor activado se une a secuencias de DNA específicas PPRE, presentes en los genes bajo control (Michael y Mitchell, 2010).

La isoforma PPAR- α aumenta la expresión de genes que participan en el catabolismo de los ácidos grasos. Regula de manera positiva genes involucrados en el transporte de ácidos grasos, como CPT-1 y la proteína de unión a ácidos grasos libres (FABP). Así como genes involucrados en las oxidaciones de ácidos grasos en la mitocondria, en los peroxisomas y en el retículo endoplásmico (microsomias) (Michung, 2009). Entre los genes regulados en las oxidaciones están los que codifican para las enzimas: acilCoA deshidrogenasa de cadena media y de cadena larga, la acilCoA oxidasa y la acilCoA sintetasa de cadena larga (Norbert et al., 2000).

En los últimos años, se ha identificado una veintena de proteínas que se asocian al extremo carboxílico de éstos receptores nucleares y actúan como co-activadores o co-represores de la transcripción. La unión del ligando induce un cambio conformacional en el receptor nuclear, que permite el reclutamiento de los coactivadores o co-represores de la transcripción, como (PGC1) (Norbert et al., 2000).

1.4.4.3.3. PGC1- α y PGC1- β

Los coactivadores PGC1- α/β pertenecen a una familia de coactivadores que interactúa con varios factores transcripcionales incrementando su actividad. Ambas isoformas tienen funciones muy parecidas en el metabolismo de lípidos, pero el coactivador PGC1- α está involucrado también en la síntesis de glucosa hepática. Estos coactivadores pueden interactuar con factores transcripcionales que participan en la lipogénesis, oxidación y exportación (Handschin y Spiegelman, 2005), por ejemplo, interactúa con SREBP-1c y LXL en la síntesis de lípidos. En las oxidaciones PGC 1- α se asocia con PPAR- α regulando directamente a CPT-1 (Prabodh et al., 2007); en tanto que en la exportación de triacilglicérols del hígado PGC 1- β interactúa con FOXA 2 (Wolfrum y Stoffel, 2006). Además, el coactivador PGC 1- α regula la expresión de las subunidades codificadas en el genoma nuclear de cada uno de los complejos de la cadena transportadora de electrones y a varios genes que proporcionan protección contra el efecto de las especies reactivas del oxígeno (ROS) (Handschin y Spiegelman, 2005).

2. JUSTIFICACIÓN

La dislipidemia, la intolerancia a la glucosa y la hipertensión son padecimientos involucrados en el síndrome metabólico que aumentan la predisposición a desarrollar diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares (Reza y Khosrow, 2009). En México estas enfermedades constituyen actualmente las primeras causas de muerte (INEGI, 2009). El rápido incremento de estas enfermedades hace apremiante el estudio, desarrollo de fármacos y estrategias para su prevención y tratamiento. La biotina podría ser usada con estos fines, ya que modifica la expresión genética de enzimas lipogénicas y dosis farmacológicas reducen los triacilglicerolos séricos en humanos y modelos murinos. Hasta el momento se conoce muy poco sobre los mecanismos moleculares mediante los cuales produce sus efectos hipotriglicéridémicos. En estudios previos, encontramos que dosis farmacológicas de biotina reducen la expresión de genes de enzimas y factores transcripcionales de la vía lipogénica en el hígado y tejido adiposo (Larrieta et al., 2010). Sin embargo, se desconoce si la biotina tiene efecto sobre otras vías metabólicas de los lípidos y sobre los mecanismos de señalización que podrían estar mediando sus efectos. Por lo tanto, en este proyecto proponemos estudiar los efectos de la biotina sobre diferentes vías metabólicas de los lípidos y sobre mecanismos involucrados en estos efectos.

Los resultados que se obtengan en el desarrollo del proyecto: a) brindarán conocimientos sobre el efecto de la biotina en vías metabólicas de los lípidos; b) ayudarán a definir si los efectos de la vitamina sobre las vías metabólicas de lípidos están mediados por el GMPc; c) permitirán revelar si la fosforilación de proteínas es un mecanismo de acción de la biotina sobre el metabolismo de lípidos; y d) identificarán vías de señalización involucradas en respuesta a la vitamina. Estos datos darán nuevas pautas en la comprensión del efecto de la biotina en el metabolismo de los lípidos. Conocimientos de ciencia básica necesarios para determinar su posible uso, o análogos de ella, en el desarrollo de nuevos productos farmacológicos para el tratamiento de padecimientos asociados al metabolismo de lípidos.

3. HIPÓTESIS

El efecto hipotrigliceridémico de la biotina se produce por mecanismos que disminuyen la síntesis de triacilgliceroles en el hígado y favorecen su oxidación en el músculo.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar los mecanismos mediante los cuales la biotina a concentraciones farmacológicas reduce los triacilgliceroles sanguíneos.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar los cambios que produce una dieta suplementada con biotina durante ocho semanas sobre el metabolismo de lípidos analizando:

1. Las concentraciones séricas de triacilgliceroles y ácidos grasos libres
2. El contenido de triacilgliceroles en el hígado
3. La fosforilación de proteínas reguladoras del metabolismo de triacilgliceroles en el hígado y músculo
4. El contenido de GMP cíclico en el hígado
5. La expresión del ARN mensajero de proteínas que regulan el catabolismo de triacilgliceroles en el músculo
6. La concentración de acilcarnitinas en el músculo

6. MATERIALES

6.1. Dietas para ratones

Dietas de Harlan Teklad WI Madison (Estados Unidos):

A) Con biotina suficiente (TD-01362) (1.76 mg biotina/kg dieta)

B) Con biotina suplementada (TD-02458) (97.7 mg biotina/kg dieta)

La composición detallada de la dieta está publicada en el artículo de Báez-Saldaña y Ortega, 2004

6.2. Reactivos y soluciones

A) Extracción de triacilgliceroles de tejido hepático

- Triton X-100 5 %
- Solución de fosfatos salina (PBS) (Cloruro de sodio 148 mM, Cloruro de potasio 3 mM, fosfato dibásico de sodio 8 mM, fosfato monobásico de potasio 1.5 mM)
-

B) Estuche de reactivos para la cuantificación de triacilgliceroles (SPINREACT)

C) Estuche de reactivos para la cuantificación de ácidos grasos libres FFA Half Micro test (ROCHE)

D) Extracción y visualización de ARN total

- Trizol (Invitrogen)
- Cloroformo (SIGMA)
- Etanol (SIGMA)
- Dietilpirocarbonato (DEPC) (SIGMA)

- Gel de agarosa al 1.5 % (0.3 gr/20 ml de agua bidestilada con DEPC 0.1 %)
- Solución de Tris-boratos (10X) (Ácido bórico 900 mM, EDTA 25 mM, Tris-HCl 900 mM, agua bidestilada c.b.p 1000 ml y ajustar el pH a 8.3)
- Solución de carga de ARN 10X (MOPS 10X, 95 % formamida, SDS 0.25%, azul de bromofenol 0.025%, bromuro de etidio 0.025 %)
- Bromuro de etidio (10 mg/ ml de agua bidestilada) (SIGMA)

E) Retrotranscripción y PCR en tiempo real

- Retrotranscriptasa reversa del virus M-MVL RT (Invitrogen)
- oligo dT (Invitrogen)
- Solución TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem)
- Desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) (200 μ M, dATP, dCTP, dGTP y dTTP) (Invitrogen)
- Cloruro de magnesio (Cl_2Mg) (SIGMA)
- Sondas TaqMan marcadas en el extremo 5' con el fluorocromo-FAM (ACC-2 Rn 01499224_m1; CPT-1 Mm 00550438_m1, Applied Biosystem)
- Sonda del gen de referencia 18S marcada con fluorocromo-VIC (Applied Biosystem)

F) Extracción de proteínas totales

- Solución de lisis (HEPES 50 mM, KCl 50 mM, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, orthovanadato de sodio 2 mM, fluoruro de sodio 25 mM, pirofosfato de sodio 5 mM, DTT 1 mM, TritonX-100 0,1%, marca SIGMA y coctel de inhibidor de proteasas "Mini complete", marca ROCHE)
- Solución de carga 2X (SDS 10%, glicerol 30 %, Tris-HCl 100 mM, pH 6.8, β -mercaptoetanol 0.02 % y azul de bromofenol 0.02 %, SIGMA)
- Cuantificación de proteínas con reactivo de Bradford *Protein Assay* (Bio-Rad)

G) Electroforesis de SDS-PAGE

- Solución de acrilamida al 30% (30 gr de acrilamida y 1 gr de bis-acrilamida, marca Bio-Rad, en 100 ml de agua grado MiliQ)
- Tris-base 1.5 M pH 8.8 y Tris-base 1 M pH 6.8
- SDS 10 %
- TEMED (SIGMA)
- Persulfato de amonio 10 % (SIGMA)
- Solución amortiguadora de corrida (Glicina 192 mM, Tris-base 25 mM y SDS 0.1 %)

H) *Transferencia en cámara húmeda*

- Membrana de nitrocelulosa de 0.45 mm (Bio-Rad)
- Solución de transferencia (Tris-base 48 mM, glicina 39 mM, metanol 20 %).
- Solución de *Stripping* (glicina 250 mM, SDS 1%, con pH 2)

I) *Tinción de membrana con rojo de Ponceau*

- Solución de rojo de Ponceau (rojo de ponceau 0.3 % y ácido acético 3 %) (SIGMA)

J) *Inmunodetección*

- Solución de TBS 1X (Tris-base 100 mM y NaCl 150 mM)
- Solución de TBS-T 0.1% (Tris-base 100 mM y NaCl 150 mM y 0.1 % de Tween 20)
- Solución de bloqueo (5% de leche libre de grasa *Blotto* marca Santa Cruz Biotechnology en TBS-T 0.1 %)
- Anticuerpos policlonales (anti-FAS, anti-ACC-1, anti-fosfo-ACC-1 y anti-fosfo-AMPK- α , anti-fosfo-ERK1/2, Cell Signaling; anti-SREBP-1c, anti-ERK1/2, anti-fosfo-ACC-2, anti-conejo-IgG-HRP, anti-raton-IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology)
- Anticuerpo monoclonal (anti-tubulina- α monoclonal, Santa Cruz Biotechnology)
- Solución de quimioluminiscencia *Chemiluminescent HRP substrate* (MILLIPORE)
- Films para la autoradiografía (KODAK)

K) *Análisis de acilcarnitinas por espectrometría de masas en tándem*

- Perforador de papel de 3mm de diámetro (DELFI Plate Punch)
- Estándares internos de isótopo-estable de carnitina libre y acilcarnitinas (PERKINELMER):

d₉-carnitina libre (d₉-C0)

d₃-Decanoilcarnitina (d₃-C10)

d₃-acilcarnitina (d₃-C2)

d₆-Glutarilcarnitina (d₆-C5DC)

d₃-propionilcarnitina (d₃-C3)

d₃-Lauroilcarnitina (d₃-C12)

d₃-Butirilcarnitina (d₃-C4)

d₃-Miristoilcarnitina (d₃-C14)

d₉-Isovalerilcarnitina (d₉-C5)

d₃-Palmitoilcarnitina (d₃-C16)

d₃-Hexanoilcarnitina (d₃-C6)

d₃-Octadecanoilcarnitina(d₃-C18)

d₃-Octanoilcarnitina (d₃-C8)

¹³C₅ succinilacetona

- Fase móvil: mezcla grado HPLC; acetonitrilo-agua
- Solución de extracción: mezcla de metanol grado HPLC-agua
- Hojas de aluminio
- Microplacas claras de fondo V
- Incubador/agitador de placas Labsystem iEMS Incubator/Shaker HT

7. MÉTODOS

7.1. MODELO EXPERIMENTAL

Utilizamos el modelo experimental previamente usado por nuestro grupo, en el cuál la suplementación de biotina en la dieta disminuyó las concentraciones de triacilgliceroles en suero (Larrieta, 2010). Ratones machos de la cepa BALB/cAnN de tres semanas de edad recién destetados se mantuvieron en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM bajo ciclos de luz-obscuridad de 12 h, con libre acceso a agua y alimento durante todo el periodo experimental, a excepción de los periodos de ayuno. Los procedimientos fueron aprobados por el comité de Ética y Experimentación del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Los ratones recibieron una dieta control o una dieta suplementada durante ocho semanas. El grupo control recibió una dieta con 1.76 mg de biotina/kg alimento (TD-01362, Harlan Teklad); el grupo suplementado recibió la misma dieta conteniendo 97.7 mg de biotina/kg de alimento (TD-01363, Harlan Teklad). La información completa de la dieta ha sido publicada previamente (Báez-Saldaña y Ortega). La dieta control proporciona suficiente cantidad de biotina para cubrir las necesidades metabólicas de los ratones, mientras que la dieta suplementada contiene cantidades de biotina de aproximadamente 56 veces la concentración del control, proporción comparable a la de los suplementos vitamínicos de biotina recomendados para el tratamiento de dislipidemia (Albarracin et al., 2005; Geohas et al., 2007). El peso corporal y el consumo de alimento se determinaron cada semana. Posterior a las ocho semanas de alimentación con las dietas, los ratones se ayunaron por 16 h, se anestesiaron con Sevoflurano (Sevorane, Abbott) y se les extrajo sangre, el hígado y músculo. Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical.

7.2. CONCENTRACIONES SÉRICAS DE TRIACILGLICEROLES

Separamos el suero de la sangre por centrifugación durante 10 minutos a 1200 rpm. Las muestras la guardamos a -70°C hasta la cuantificación. Los triacilgliceroles los determinamos por un método fotolorimétrico, mediante un estuche de reactivos marca SPINREACT. El método se basa en la hidrólisis de los triacilgliceroles a glicerol y ácidos grasos libres por la lipoproteína lipasa. El glicerol liberado es usado por una serie de reacciones acopladas y catalizadas por las enzimas glicerol cinasa, glicerol fosfato oxidasa y peroxidasa. El producto de la última reacción (quinona) absorbe a 505 nm y el incremento en la absorbancia es proporcional a la concentración de triacilgliceroles presente en la muestra. El método tiene una linealidad en un rango de 0.7 a 1000 mg/dL.

7.3. CONTENIDO DE TRIACILGLICEROLES HEPÁTICOS

Los triacilgliceroles totales los cuantificamos a partir de 100 mg de hígado congelado a -70°C. Las muestras las homogenizamos en 1 ml de solución de lisis (5% Tritón-X 100 en solución amortiguadora PBS1X). Calentamos las muestras lentamente a 50-60°C en un baño de agua durante 5 min y enfriamos a temperatura ambiente. Repetimos el calentamiento una vez más para solubilizar todos los triacilgliceroles. Centrifugamos durante 15 min a 14 000 rpm para remover cualquier material insoluble y ultracentrifugamos durante 30 minutos a 150 000 rpm. Tomamos la parte superior y diluimos 10 veces en una solución al 0.9% de NaCl antes del ensayo. Los triacilgliceroles los cuantificamos como se describió anteriormente.

7.4. CONTENIDO DE ÁCIDOS GRASOS EN SUERO

La determinación de contenido de ácidos grasos no esterificados en suero la realizamos por un método fotolorimétrico mediante estuche de reactivos para ácidos grasos: *Free fatty acids half-micro test* (ROCHE). El principio se basa en que los ácidos grasos libres en presencia de

acil-CoA sintetasa y ATP son convertidos a acil-CoA, AMP y pirofosfato. Los acil-CoA reaccionan con oxígeno en presencia de acil-CoA oxidasa para formar enoil-CoA y peróxido de hidrógeno. El último producto absorbe a 546 nm y la absorbancia es proporcional a la concentración de ácidos grasos libres. Brevemente, se tomaron 5 µL de suero, se mezclaron con un 1ml del reactivo A y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Se añadió 5 µL del reactivo 3, se mezcló y se leyó en un espectrofotómetro 546 nm (A1). A la mezcla se le añadió 5 µL del reactivo B y se incubó 15 min a temperatura ambiente, al terminar se determinó la absorbancia (A2). El cálculo se obtuvo con la fórmula $c = [(V)/\epsilon \times d \times v] \times \Delta A$, donde V= volumen final (ml); v= volumen muestra (ml); d= paso luz (cm); ϵ = coeficiente de absorción (19.3); ΔA = diferencia de absorción del blanco y las absorbancias A1 y A2. El método presenta una linealidad en un rango de concentración de 0.3 mM a 1.5 mM. Las muestras de suero las obtuvimos como previamente se describió para la cuantificación de los triacilgliceroles en suero.

7.5. ANÁLISIS DE LA ABUNDANCIA DEL ARNm

El ARN total lo aislamos por el método de Trizol. La cantidad y pureza de ARN lo cuantificamos por espectrofotometría a 260 nm, la pureza con la relación de absorbancias a 260/280 y verificamos la integridad del ARN en geles de agarosa al 1.5%. La abundancia del ARNm la determinamos por RT-PCR en tiempo real. Brevemente, homogenizamos en Trizol 100mg de tejido precipitando con cloroformo-etanol. Hicimos la síntesis del ADN de cadena sencilla (cADN) con 0.5µg de ARN total por la reacción de transcripción reversa con la enzima retrotranscriptasa reversa del virus M-MVL RT (500 U) y oligo dT para aislar el ARN mensajero. El ADNc lo mezclamos con una solución *TaqMan Universal PCR Master Mix*, dNTPs, Cl_2Mg , y las sondas TaqMan marcadas en el extremo 5' con el fluorocromo-FAM. Determinamos las temperaturas y tiempos óptimos de los ciclos de amplificación en el termociclador para cada fragmento génico, en rol de las características del fragmento y la T_m de los cebadores empleados. Como gen de referencia de expresión endógena utilizamos el ARN ribosomal 18S con fluorocromo-VIC. En todos los ensayos verificamos la ausencia de contaminación mediante una

reacción de control negativo a la que no se incorporó cADN. La detección de cada gen la realizamos por triplicado para cada muestra en un instrumento ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems), equipado con placas ópticas de 96 pocillos cubiertas de tapas adhesivas operado bajo las especificaciones del fabricante. Para cuantificar la expresión de los genes, calculamos el valor umbral del ciclo (CT, cycle threshold) para cada gen de la parte logarítmica de la curva, usando el método de cuantificación relativa doble delta-CT ($2^{-\Delta\Delta CT}$) (Livak and Schmittgen, 2001).

7.6. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA POR EL MÉTODO DE BRADFORD

El método se basa en el hecho de que el reactivo de Bradford contiene cobre en solución con ácido ortofosfórico y metanol. Cuando la proteína une el cobre, su máximo de absorción cambia de 465 nm a 595 nm. Este método es altamente sensible y lineal. Se utilizó albúmina de suero bovino (BSA) como estándar en rango de 1-20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. La cuantificación proteica la realizamos utilizando el *Kit protein assay* siguiendo las instrucciones del fabricante (Bio-Rad). Brevemente, a 798 μL de agua grado *MiliQ* le agregamos 2 μL de los extractos proteicos y 200 μL del reactivo de Bradford, se mezclaron y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min, medimos la absorbancia del blanco, los patrones y las muestras a 595 nm en un volumen final de 1 ml en cubetas de plástico de 1 cm de paso de luz.

7.2.7. WESTERN BLOT

Utilizamos éste método para cuantificar la abundancia de las proteínas en su forma total y fosforilada. Homogenizamos 100 mg de hígado o músculo con un politron en solución de lisis fría. Centrifugamos los extractos de tejido a 14000 x rpm durante 15 minutos a 4°C para eliminar material insoluble y la concentración de proteínas la cuantificamos como se describió previamente. Cargamos un total de 75 μg de proteína para AMPK y 100 μg para el resto de las

proteínas (ERK 1/2, ACC1 y 2, PPAR- α y SREBP1-c) en cada carril en un gel de SDS-PAGE al 8% y utilizamos un aparato para electroforesis "Mini-Protean III" (Bio-Rad).

La electrotransferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa la hicimos por 1 h a 100 V (constante) con un aparato de electrotransferencia húmeda (Bio-Rad). Al terminar, lavamos la membrana con TBS 1X y la eficiencia de la transferencia la comprobamos con solución de Ponceau. La solución tiñe las proteínas de rojo, permitiendo comprobar su integridad si y se transfirieron correctamente. Para eliminar la tinción lavamos la membrana con TBS-T 0.1 % durante unos minutos. La membrana la bloqueamos con solución de bloqueo por 1 h a temperatura ambiente para impedir uniones inespecíficas con el primer anticuerpo. Después de bloquear la incubamos durante la noche (14 hs) a 4°C, con los respectivos anticuerpos. Al día siguiente lavamos cuatro veces durante 5 min con solución TBS-T 0.1% e incubamos con el anticuerpo policlonal anti-IgG-HRP de conejo diluido 1:4000 en solución TBS-T 0.1% con 5% de leche por 1 h a temperatura ambiente, al terminar lavamos nuevamente como se describimos anteriormente.

Añadimos solución de quimioluminiscencia a las membranas y visualizamos las bandas inmunorreactivas con el equipo *Molecular Imager Chemidoc XRS* (Bio-Rad) o con películas de autorradiografía (KODAK). La intensidades de las bandas las cuantificamos por densitometría usando el software imagen J 1.40 (HIMH, Bethesda, MD, USA). Para corroborar la homogeneidad en la cantidad de proteínas, reutilizamos las membranas para detectar una proteína de expresión constante, como la tubulina. Realizando un *Stripping*, que consiste en la desunión de los anticuerpos para poder proceder a otra incubación con otro anticuerpo sin que haya una interferencia entre ellos. Lavamos las membranas con la solución de *Stripping* durante 30 min en agitación suave y después lavamos 3 veces durante 5 min con TBS-T 0.1% con agitación fuerte. De esta manera la membrana está lista para volver a ser utilizada en otro *Western blot*.

7.8. CUANTIFICACIÓN DE GMPc EN TEJIDO HEPÁTICO

Lo realizamos por un método de quimioluminiscencia que se basa en la competencia que se establece para unirse a un anticuerpo específico, entre la sustancia a cuantificar (GMPc) y cantidades conocidas de la misma sustancia. El ensayo lo realizamos según descripción del fabricante *cyclic GMP chemiluminescent kit* (B-Bridge InteARNtional). La cantidad de GMPc en las muestras se calculó después de hacer la corrección de la dilución. Se hizo una curva patrón con un estándar de GMPc a diferentes concentraciones (3, 1.5, 0.75, 0.375, 0.188, 0.094 y 0.047 pmol/ml). El tejido se molió en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Se añadió 1 ml de tampón diluyente por cada 100 mg de tejido triturado, se incubó 10 min en hielo y se centrifugó a 10 000 rpm durante 15 min a 4°C. Se tomó el sobrenadante y se hizo el ensayo. En una placa de ELISA de 96 pozos, se colocaron los 50 µL del iniciador, 75 µL del tampón diluyente (NBS, unión no específica), 50 µL del tampón diluyente (B0, máxima unión con el anticuerpo) y 50 µL de la muestra. Enseguida se añadieron 25 µL de 1X GMPc conjugado y 25 µL del anticuerpo anti-GMPc, excepto a los pozos NBS. Se cubrió la placa con un sello plastificado y se agitó a 250 rpm por 15 min a temperatura ambiente. Se colocó la placa a 4°C por 16 hs y al otro día se lavó 4 veces con tampón de lavado 1X. Se añadieron 100 µL del substrato para quimioluminiscencia e inmediatamente se leyó en un lector de ELISA synergy HT (Biotek) a 405 nm. Todo se realizó por duplicado para mayor exactitud.

7.9. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CARNITINAS EN MÚSCULO

El uso de la espectrometría de masas en tandem (en sus siglas inglesas MS/MS), es la herramienta más poderosa y versátil que apareció en los últimos 30 años en el campo del diagnóstico neonatal de los errores inatos del metabolismo (Chace, 2001; Chace y Kalas, 2005; Millington et al., 1991).

Utilizamos un equipo de espectrometría de masas en tándem, de triple cuadrupolo (PERKIN ELMER, modelo Micromass Quattro micro™ API) equipado con una bomba binaria de

líquidos de alta resolución (WATERS, modelo 1525) para realizar infusiones individuales. Como gas de colisión y cortina se empleo nitrógeno. Las muestras las infundimos con un equipo de HPLC con automuestreador (WATERS, modelo 2777C). Los resultados fueron adquiridos con el software *Neolynx*. Reconstituimos los liofilizados de los estándares deuterados de acilcarnitinas con 1mL de solución de extracción, posteriormente realizamos una dilución 1:10 y obtuvimos la solución de trabajo. En una placa de ELISA de 96 pozos de fondo cónico trunco, colocamos 50 µL de muestra. Las placas las incubamos durante 30 minutos a 45°C con una velocidad de agitación de 650 rpm, las colocamos en el automuestreador y por último las introducimos al espectrómetro de masas en tándem mediante la bomba de líquidos.

Para el procesamiento de la muestra tomamos 50 mg de tejido muscular y lo homogenizamos con un politrón en una mezcla de acetonitrilo:metanol (3:1). Centrifugamos a 14,000 rpm durante 5 min a 4°C y el sobrenadante lo purificamos pasándolo por una columna con una membrana de celulosa regenerada (Amico Ultra, MILLIPORE), la cual centrifugamos a 13,000 rpm durante 10 min a 4°C. Tomamos la parte superior de la columna y la guardamos a -70°C hasta cuantificar las carnitinas. La pastilla obtenida en la primera centrifugación la lavamos 2 veces con PBS, decantamos y resuspendimos en solución de lisis para la extracción de las proteínas que cuantificamos por el método de Bradford.

7.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico lo calculamos con el programa Statview 4.57.0.0 (Abacus Concepts Inc, Berkeley, CA, USA). Los datos los presentamos como el promedio ± error estándar (ES). La significancia estadística la determinamos por la prueba de ANOVA de una vía, seguida de la prueba de Fisher de múltiple rango. Consideramos como estadísticamente significativa una $P < 0.05$.

8.RESULTADOS

8.1. PESO CORPORAL, INGESTA DE ALIMENTOS Y GLUCOSA

De acuerdo con lo observado en estudios previos no encontramos cambios en el peso corporal (Controles: 22.6 ± 0.5 ; Suplementados: 22.5 ± 0.5 g), ni en la ingesta de alimento (Controles: 2.6 ± 0.12 ; suplementados: 2.6 ± 0.08 g alimento/ratón/día) entre el control y los ratones suplementados con biotina. Tampoco hubo cambios en los niveles de glucosa sanguíneos en ayunas entre los grupos (Controles: 82.6 ± 3.3 ; Suplementados: 81.6 ± 3.0 mg/dl).

8.2. CONCENTRACIÓN DE TRIACILGLICEROLES EN SUERO E HÍGADO

En concordancia con los estudios reportados en nuestro laboratorio (Larrieta et al., 2010), encontramos que 8 semanas de suplementación con biotina, disminuyeron las concentraciones de triacilgliceroles séricos (Controles: 81.2 ± 1.2 ; Suplementados: 52.09 ± 1.0 mg/dl; $P < 0.05$) (Figura 9, panel A). Para determinar si la reducción de triacilgliceroles no fue consecuencia de una retención de éstos en el hígado, analizamos el contenido de triacilgliceroles en este tejido. Los datos (Figura 9, panel B) revelaron que los hígados de ratones suplementados con biotina presentaron concentraciones de triacilgliceroles menores a las presentadas en el grupo control (Controles: 20.5 ± 0.6 ; Suplementados: 12.9 ± 0.5 μ g/mg proteína, $P < 0.05$).

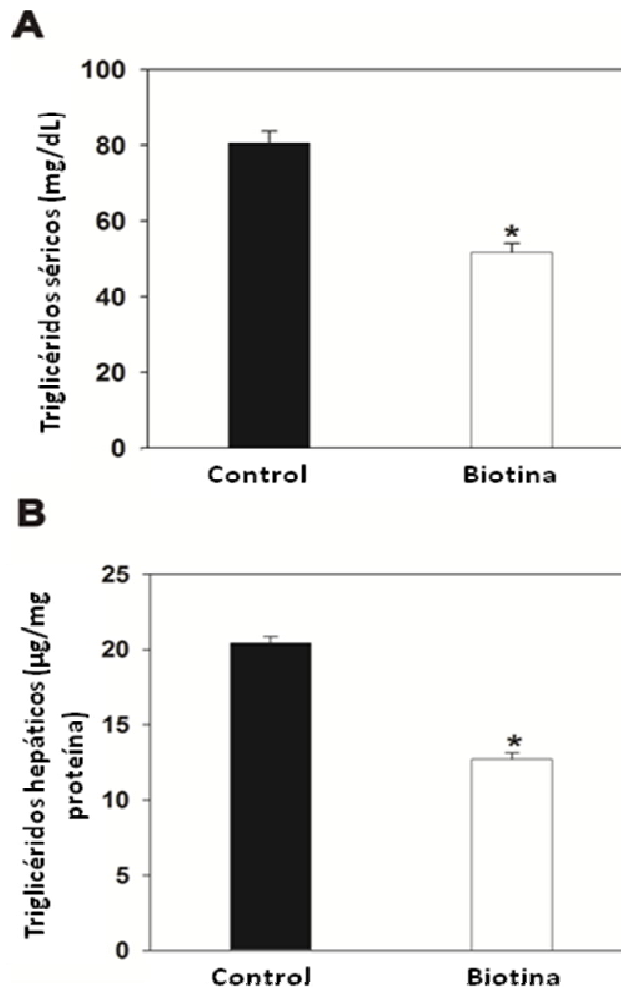


Figura 9. Concentraciones de triglicéridos en suero e hígado. *PANEL A.* Concentración de triglicéridos en suero. Los valores representan la media \pm error estándar de 10 ratones de cada grupo. *PANEL B.* Contenido hepático de triglicéridos. Los valores representan la media \pm error estándar de 9 ratones de cada grupo. Las barras oscuras: grupo control; barras blancas: grupo suplementado con biotina.* $P < 0.05$.

8.3. CONCENTRACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES EN SUERO

El efecto de la suplementación con biotina sobre las concentraciones de ácidos grasos sanguíneos no ha sido reportado, por lo que analizamos la concentración de éstos. Los resultados encontraron que la administración de la dieta suplementada con biotina produjo una

disminución del 25% ($P < 0.05$) en el contenido de ácidos grasos séricos con respecto al control (Figura 10).

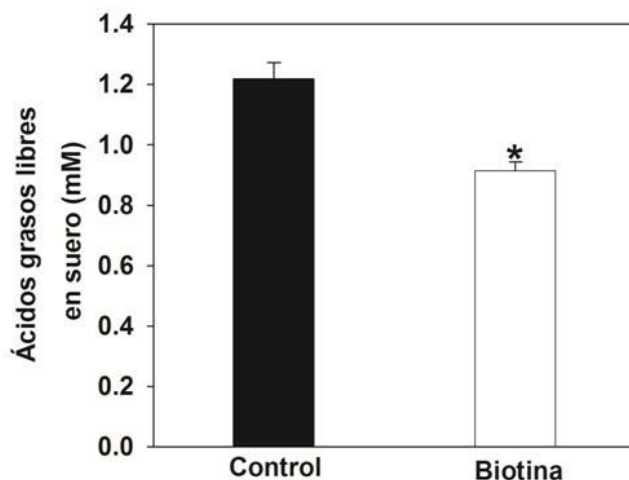


Figura 10. Concentración de ácidos grasos en suero. Los valores representan la media \pm error estándar de 10 ratones de cada grupo. Barra oscura: grupo control; barra blanca: grupo suplementado con biotina. * $P < 0.05$.

8.4. ABUNDANCIA DE LA PROTEÍNA DEL FACTOR SREBP-1c EN EL HÍGADO

En estudios anteriores, nuestro grupo demostró que en ratones suplementados con biotina hubo una reducción en la abundancia de ARNm del factor transcripcional lipogénico SREBP-1c (Larrieta et al., 2010). Dado que esta proteína requiere una modificación postraduccional para convertirse en su forma madura, la cual activa transcripcionalmente en el núcleo a varios genes lipogénicos (Horton et al., 2002). Por lo que decidimos investigar el efecto de la suplementación con biotina sobre los niveles de la forma madura de la proteína SREBP-1c. Los resultados mostraron una reducción en la abundancia de SREBP-1c maduro de aproximadamente el 40% ($P < 0.05$) (Figura 11).

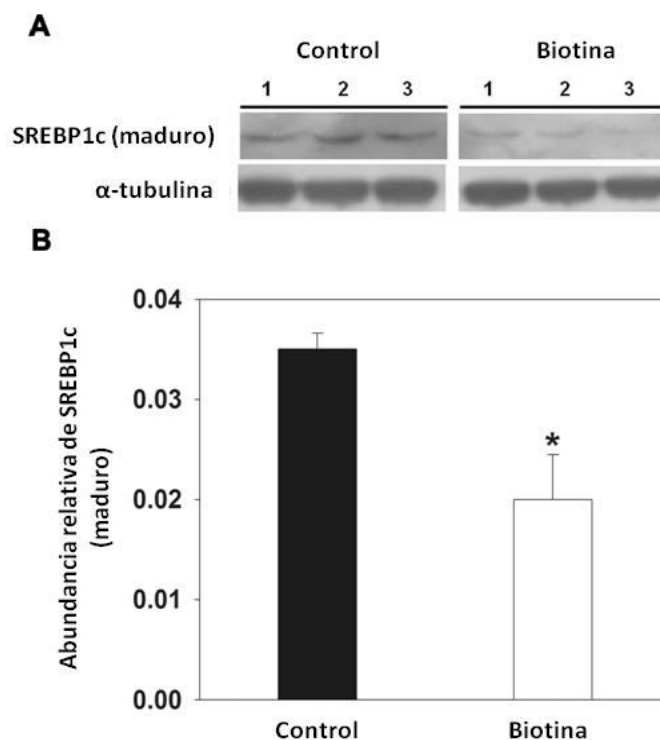


Figura 11. Abundancia de la forma madura de SREBP-1c. A. Western blot representativo de la masa total de la forma madura de SREBP-1c. B. Análisis densitométrico de la abundancia de SREBP-1c. Barra oscura: grupo control; barra blanca: grupo suplementado con biotina. Datos de la gráfica representan la media \pm error estándar de 8 ratones por cada grupo. *P<0.05.

8.5. ABUNDANCIA DE LA MASA TOTAL DE LA SINTASA DE ÁCIDOS GRASOS EN EL HÍGADO

En los estudios previos (Larrieta et al., 2010) se encontró una reducción del ARNm de la proteína FAS en los ratones tratados con biotina. Para confirmar que esta reducción del mensaje estuviese relacionada con una disminución en la abundancia de su proteína, cuantificamos la masa total de FAS, enzima cuya actividad es imprescindible en la síntesis de ácidos grasos (Horton et al., 2002). Después de ocho semanas de suplementación con biotina, hubo una evidente disminución en la cantidad de proteína en los animales tratados con una dieta suplementada de biotina (Valores densitométricos: Controles: 0.42 ± 0.03 ; Suplementados: 0.13 ± 0.05 , $P < 0.05$) (Figura 12).

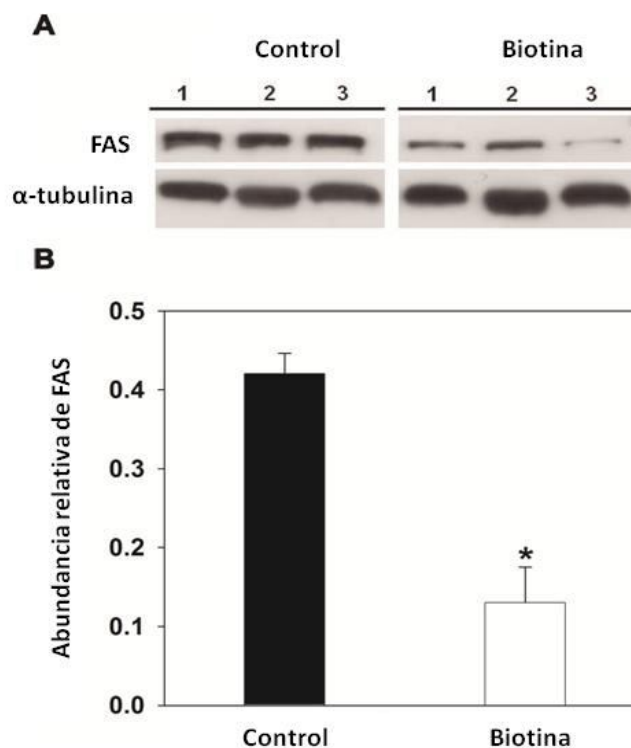


Figura 12. Abundancia de la enzima FAS. A. Western blot representativo de la masa total de la enzima FAS. B. Cuantificación densitométrica de la masa total de FAS. Barra oscura: grupo control; barra blanca: grupo suplementado con biotina. Datos de la gráfica son el promedio \pm error estándar de 8 ratones de cada grupo. * $P < 0.05$.

8.6. ABUNDANCIA DE LA MASA TOTAL Y FOSFORILADA DE LA ACETIL-COA CARBOXILASA-1 EN EL HÍGADO

La fosforilación de ACC-1 es un paso crítico en la lipogénesis. La enzima fosforilada en la serina 79 es inactiva, mientras que la desfosforilación activa la enzima (Ha et al., 1994). Para evaluar los efectos de la suplementación con biotina a nivel postraduccional, cuantificamos la masa fosforilada y total de la proteína ACC-1. La suplementación con biotina aumentó el nivel de fosforilación de ACC-1 en la serina 79 (Valores densitométricos: Controles: 0.29 ± 0.06 ; suplementados: 0.65 ± 0.05 ; $P < 0.05$) (Figura 13, panel B), pero no modificó la cantidad total de ACC-1 (Valores densitométricos: Controles: 0.13 ± 0.02 ; suplementados: 0.13 ± 0.02) (Figura 13, panel A).

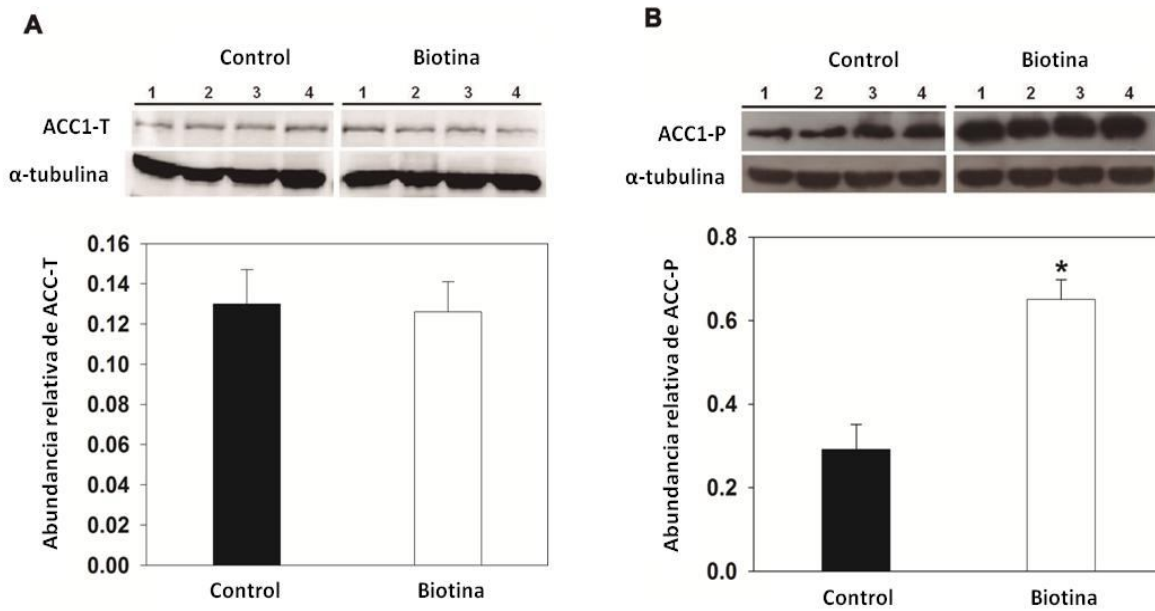


Figura 13. Abundancia de la masa total y fosforilada de la enzima ACC-1 en el hígado. *PANEL A.* Western blot representativo de la masa total de ACC-1. En la parte inferior del panel A; cuantificación densitométrica de ACC-1 total. *PANEL B.* Western blot representativo de ACC-1 fosforilada en serina 79. En la parte inferior del panel B; cuantificación densitométrica de ACC-1 fosforilada. Barras oscuras: grupo control; barras blancas: grupo suplementado con biotina. Los datos de las gráficas son los promedios \pm error estándar de 8 ratones de cada grupo. * $P < 0.05$.

8.7. ABUNDANCIA EN LA MASA FOSFORILADA DE LA PROTEÍNA CINASA ACTIVADA POR AMP EN EL HÍGADO

La fosforilación de ACC-1 por la activación de AMPK en el hígado produce una disminución en la síntesis de lípidos (Viollet et al., 2009), por lo que analizamos la forma activa de la AMPK (fosforilada en la treonina 172 de la subunidad α) para determinar si el aumento en la masa fosforilada de ACC-1 se debe a un aumento en la activación de la cinasa AMPK. Los resultados revelaron que la suplementación con biotina incrementó la masa fosforilada en la treonina 172 de la subunidad α de AMPK en aproximadamente un 40% en comparación con el grupo control (Figura 14).

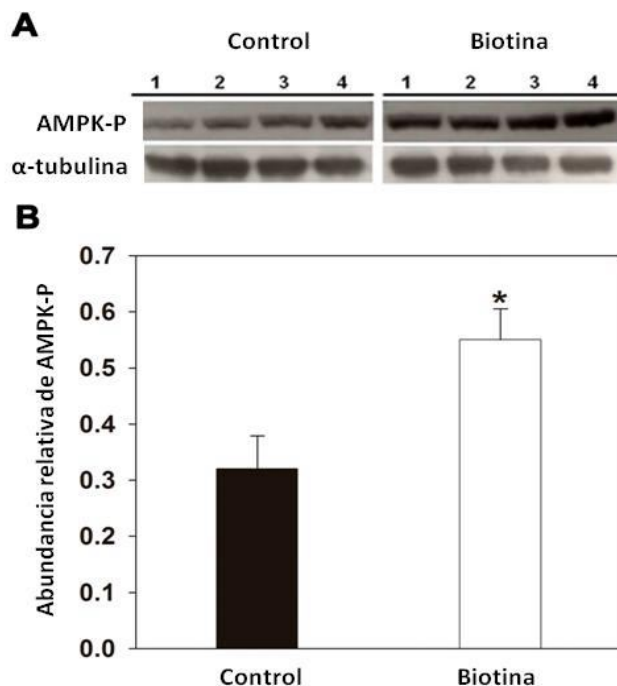


Figura 14. Abundancia de la masa fosforilada de la cinasa AMPK. A. Western blot representativo de AMPK fosforilada. B. Análisis densitométrico de AMPK fosforilado en treonina 172. Barra oscura: grupo control; barra blanca: grupo suplementado con biotina. Los valores de la gráfica son los promedios \pm error estándar de 8 ratones de cada grupo. *P<0.05.

8.8. CONTENIDO DE GMP CÍCLICO EN EL HÍGADO

Se ha propuesto al GMP cíclico como mediador en varios efectos de la biotina (De La Vega y Stockert, 2000; Solorzano Vargas et al., 2002; Stockert y Morell, 1990; Stockert et al., 1992, Vilches-Flores 2010). Por lo tanto, con el fin de determinar si este segundo mensajero participa en los efectos hipotriglicéridémicos de la vitamina, analizamos las concentraciones del GMPc en el hígado. Los resultados mostraron que los hígados de los ratones tratados con biotina tenían un mayor contenido de GMPc que los ratones del grupo control (Controles: 10.3 ± 0.34 ; Suplementados: 14.3 ± 0.73 ; pmol/mg proteína, $P < 0.05$) (Figura 15).

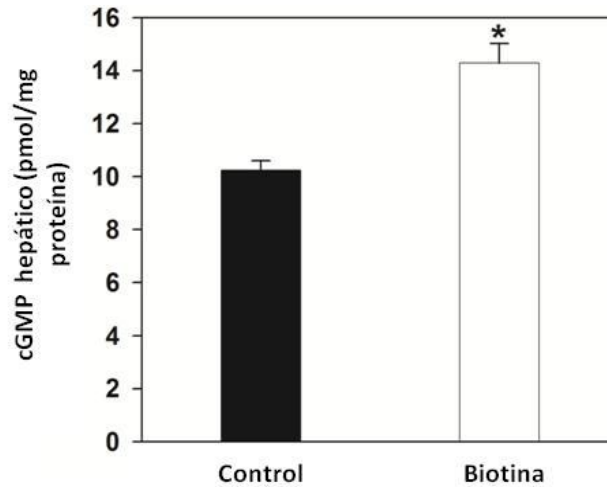


Figura 15. Concentración hepática de GMPc. Los datos de la gráfica son los promedios \pm error estándar de 9 ratones de cada grupo. Barra oscura: grupo control; barra blanca: grupo suplementado con biotina. * $P < 0.05$.

8.9. CUANTIFICACIÓN DEL ARNm DE LA CARBOXILASA ACC-2 EN MÚSCULO

Con el fin de evaluar el papel de la biotina sobre la oxidación de ácidos grasos en el músculo, analizamos la expresión del ARNm de la carboxilasa ACC-2, una enzima que participa en la regulación de esta vía metabólica. El análisis del ARNm por PCR en tiempo real no reveló diferencias significativas entre los grupos control y suplementado (Figura 16).

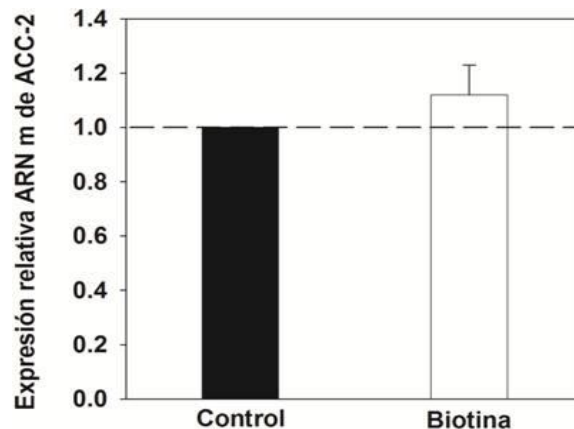


Figura 16. Cuantificación del ARN mensajero de ACC-2 en músculo. Expresión relativa del ARN mensajero de la carboxilasa ACC-2. Los datos de la gráfica son los promedios \pm error estándar de 10 ratones de cada grupo. Barra oscura: grupo control; barra blanca: grupo suplementado con biotina.

8.10. CUANTIFICACIÓN DE ACC-2 TOTAL Y FOSFORILADA EN MÚSCULO

También analizamos la abundancia proteica de ACC-2 total y fosforilada, forma inactiva de la enzima, que de esta manera disminuye la producción de malonil-CoA desreprimiendo la actividad de CPT-1 y aumentando así el transporte de ácidos grasos dentro de la mitocondria y su oxidación. No encontramos diferencias entre los grupos en la cantidad total de ACC-2 (Valores densitométricos: Controles: 0.51 ± 0.09 ; suplementados: 0.49 ± 0.07) (Figura 17, panel A). Sin embargo, la suplementación con biotina aumentó el nivel de fosforilación de ACC-2 en Ser 219/221 (Valores densitométricos: Control: 0.38 ± 0.04 ; suplementados: 0.74 ± 0.09 ; $P < 0.05$) (Figura 17, panel B).

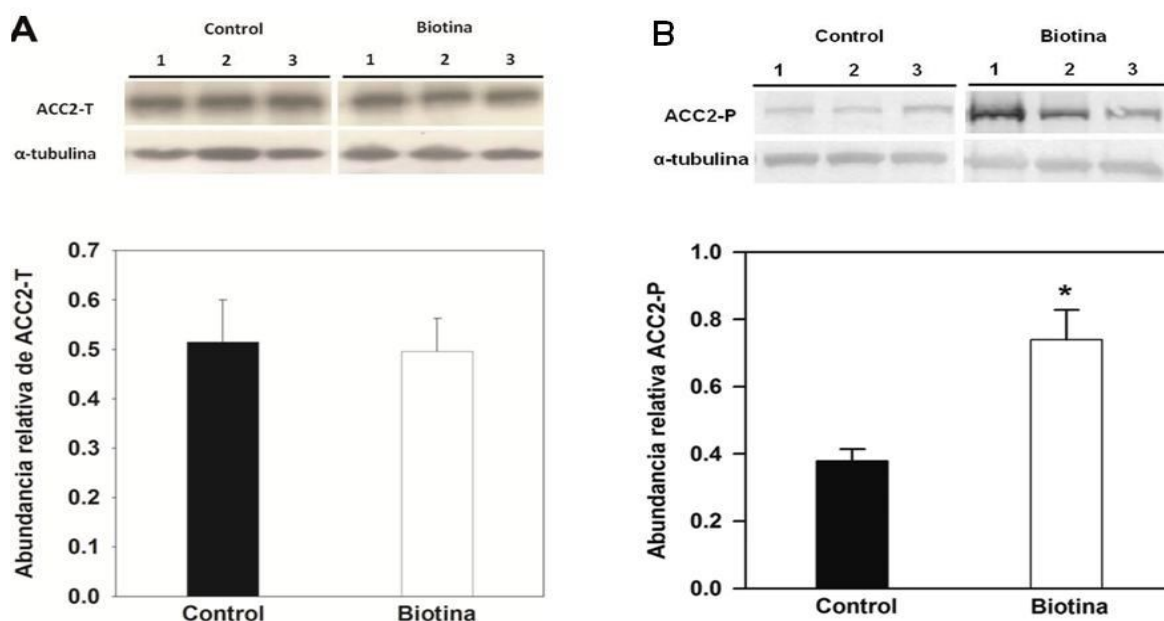


Figura 17. Abundancia de la carboxilasa ACC-2 total y fosforilada en el músculo. *PANEL A.* Western blot representativo de la masa total de ACC-2. En la parte inferior del panel; cuantificación densitométrica de ACC-2 total. *PANEL DE B.* Western blot representativo de ACC-2 fosforilada en serina 219/221. En la parte inferior del panel; cuantificación densitométrica de ACC-2 fosforilada. Barras oscuras: grupo control; barras blancas: grupo suplementado con biotina. Los datos de las gráficas son los promedios \pm error estándar de 8 ratones de cada grupo. * $P < 0.05$.

8.11. CUANTIFICACIÓN DE CARNITINAS EN EL MÚSCULO

La determinación de las diferentes formas de acil-carnitinas es un indicativo de la tasa de oxidación de los ácidos grasos. La cuantificación de acilcarnitinas se efectuó por el método de MS/MS en tándem, el cual es un método muy preciso para la determinación de la oxidación de ácidos grasos. Encontramos que en los ratones que recibieron la dieta suplementada con biotina hubo una disminución en las acilcarnitinas de cadena corta y larga (C2-C18) (Figuras 18,19 y 20) y no se encontraron cambios en la carnitina libre (C0) entre los dos grupos (Figura 18).

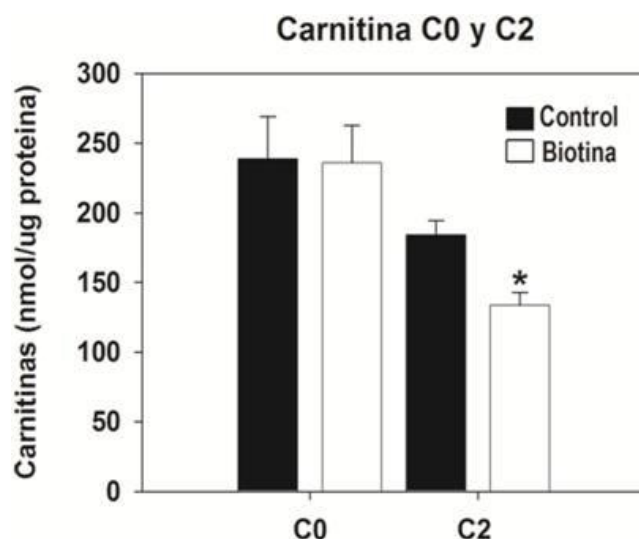


Figura 18. Cuantificación de carnitina libre (0) y acetilcarnitina (C2) en el músculo. Concentración de carnitina libre (C0) y acetilcarnitina (C2) muscular. Los datos de la gráfica son los promedios \pm error estándar de 10 ratones de cada grupo. Barra oscura: grupo control; barra blanca: grupo suplementado con biotina. *P<0.05.

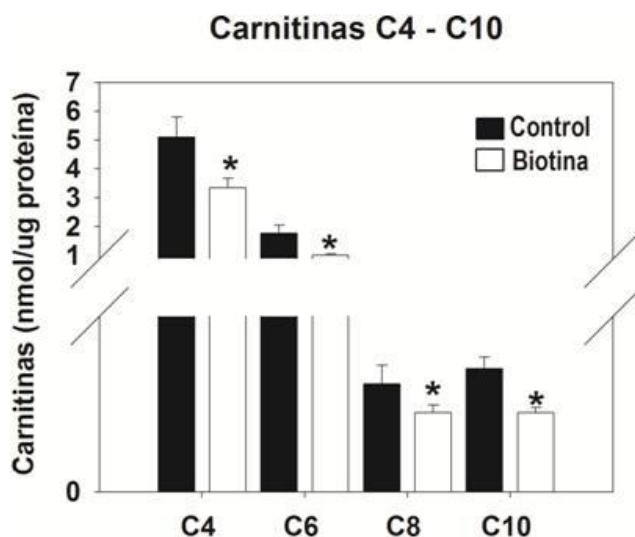


Figura 19. Cuantificación de acilcarnitinas de cadena media en el músculo. Concentración de acilcarnitinas: butirilcarnitina (C4), hexanoilcarnitina (C6), octanoilcarnitina (C8) y decanoilcarnitina (C10). Los datos de la gráfica son los promedios \pm error estándar de 10 ratones de cada grupo. Barras oscuras: grupo control; barras blancas: grupo suplementado con biotina. * $P < 0.05$.

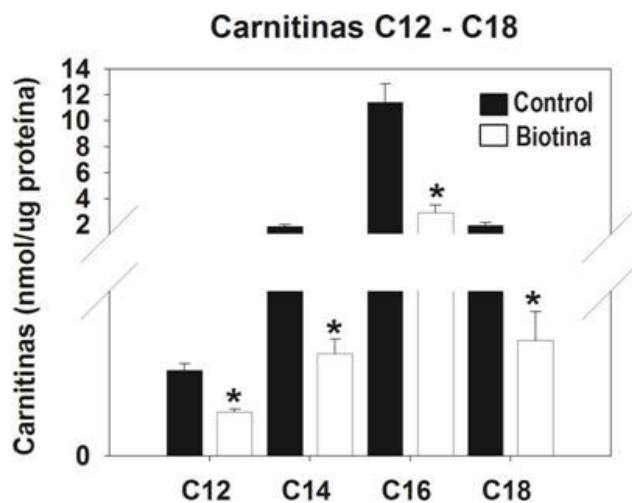


Figura 20. Cuantificación de acilcarnitinas de cadena larga en el músculo. Concentración de acilcarnitinas: dodecanoilcarnitina (C12), miristoilcarnitina (C14), palmitoilcarnitina (C16) y estearoilcarnitina (C18). Los datos de la gráfica son los promedios \pm error estándar de 10 ratones de cada grupo. Barras oscuras: grupo control; barras blancas: grupo suplementado con biotina. * $P < 0.05$.

8.12. CUANTIFICACIÓN DEL ARNm DE LA CARNITINA PALMITOIL TRANSFERASA 1 EN EL MÚSCULO

Tomando en cuenta los cambios producidos en la fosforilación de ACC-2 y en las acilcarnitinas de los animales que recibieron la dieta rica en biotina, decidimos evaluar si además de un aumento en la actividad de la CPT-1 por desinhibición, también hubiese un aumento en su expresión. Cuantificamos la expresión del ARNm de CPT-1 por PCR en tiempo real. De acuerdo a los resultados encontramos un aumento de casi un 50% en el mensajero de la enzima CPT-1 en los animales suplementados con biotina con respecto a los ratones control (Figura 21).

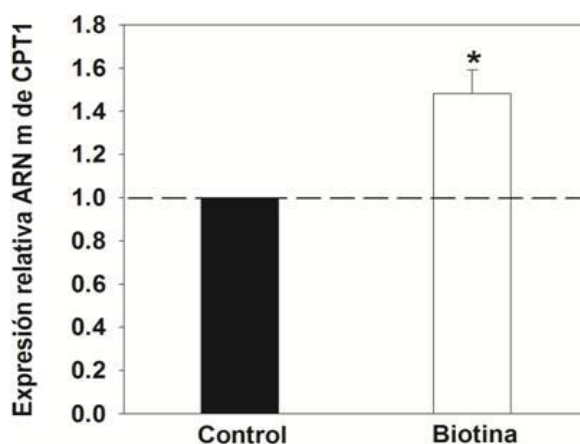


Figura 21. Expresión relativa del ARN mensajero de la proteína CPT-1. Los datos de la gráfica son los promedios \pm error estándar de 10 ratones de cada grupo. Barra oscura: grupo control; barra blanca: grupo suplementado con biotina. * $P < 0.05$.

8.13. CUANTIFICACIÓN DE LA ABUNDANCIA DEL RECEPTOR ACTIVADO POR PROLIFERADOR DE PEROXISOMAS ALPHA EN EL MÚSCULO

El factor PPAR- α regula positivamente y de manera muy importante la expresión de varias enzimas de la β -oxidación. Por lo tanto, decidimos evaluar en el músculo cambios en la proteína total de este factor transcripcional. Encontramos un aumento de aproximadamente un 37% ($P <$

0.05) en la masa proteica total de este factor transcripcional en los ratones que recibieron la dieta suplementada con respecto al grupo control (Figura 22).

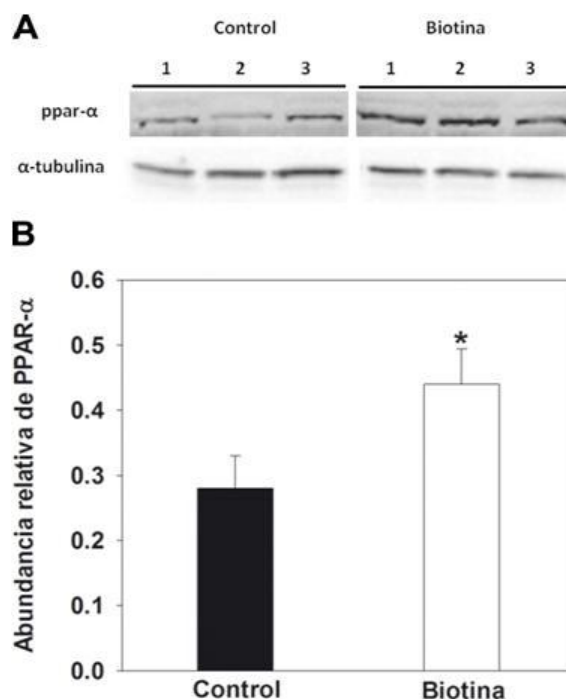


Figura 22. Abundancia de la masa total de PPAR- α en el músculo. A. Western blot representativo de PPAR- α total. B. Análisis densitométrico de PPAR- α . Barra oscura: grupo control; barra blanca: grupo suplementado con biotina. Los valores de la gráfica son los promedios \pm error estándar de 8 ratones de cada grupo. * $P < 0.05$.

8.14. CUANTIFICACIÓN DE LA MASA TOTAL Y FOSFORILADA DE LAS CINASAS REGULADAS POR SEÑALES EXTRACELULARES EN EL MÚSCULO

Debido a que varios estudios han encontrado que en la oxidación de ácidos grasos existe una relación inversa entre la actividad de las cinasas ERK1/2, y la cinasa AMPK y esta relación parece regular positivamente al factor transcripcional PPAR- α (Jianhai et al., 2008; Rongsen et al., 2011), decidimos analizar la expresión de la proteína total y la forma fosforilada de las cinasas ERK1/2 (forma activa). Observamos que la administración de la dieta suplementada con biotina produjo

una disminución en la fosforilación de las cinasas ERK1/2 de aproximadamente un 37% ($P < 0.05$) y no encontramos cambios en la masa total de esta proteína entre los grupos (Figura 23).

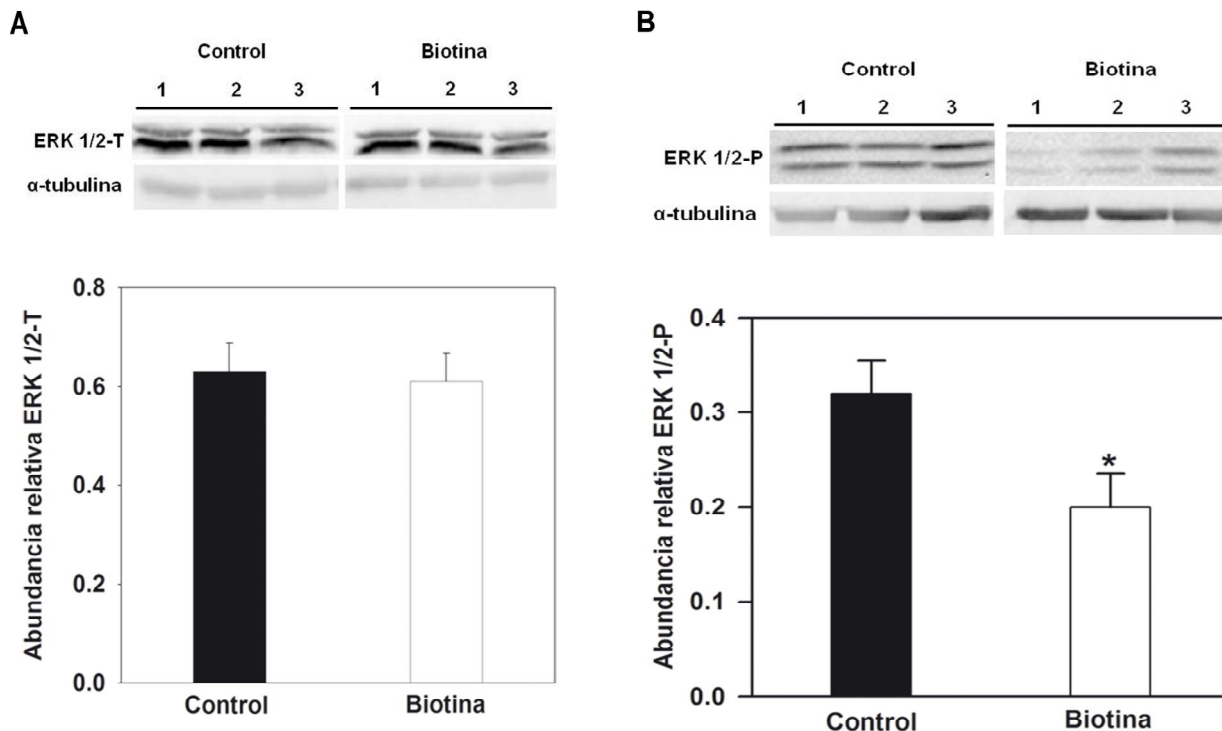


Figura 23. Abundancia de la masa total y fosforilada de la cinasas ERK1/2 en músculo. *PANEL A.* Western blot representativo de la masa total de ERK1/2. En la parte inferior del panel; cuantificación densitométrica de ERK1/2 total. *PANEL DE B.* Western blot representativo de ERK1/2 fosforiladas. En la parte inferior del panel; cuantificación densitométrica la ERK1/2 fosforiladas en treonina 202/tirosina 204 respectivamente. Barras oscuras: grupo control; barras blancas: grupo suplementado con biotina. Los datos de las gráficas son los promedios \pm error estándar de 8 ratones de cada grupo. * $P < 0.05$.

9. DISCUSIÓN

En los últimos años se ha demostrado que varios nutrimentos de la dieta actúan como moduladores de la expresión genética. Estos incluyen ácidos grasos poliinsaturados, colesterol, glucosa y minerales específicos como hierro y selenio. Además de vitaminas liposolubles como la A y D (Hinds, et al., 1997; Carlberg, 1999). Aunque también se ha descrito la participación de vitaminas hidrosolubles (Rodríguez, 2002) en la modulación de la expresión genética (Zempleni, 2005; Fernández y Lazo de la Vega, 2010), hasta el momento se conoce poco sobre los mecanismos moleculares responsables de su regulación.

Varios estudios han demostrado que las concentraciones farmacológicas de la biotina, una vitamina hidrosoluble, disminuyen los lípidos séricos (Dokusova y Klimov, 1967; Dokusova y Krivoruchenko, 1972; Marshall et al., 1980; Revilla-Monsalve et al., 2006). En un estudio previo de nuestro laboratorio (Larrieta et al., 2010), se encontró que el efecto hipotriglicéridémico de la biotina estaba relacionado con decrementos en la abundancia del ARN mensajero de enzimas y factores de transcripción que regulan la lipogénesis. En esta tesis examinamos los mecanismos postranscripcionales y vías de señalización que intervienen en los efectos de la biotina sobre la esta vía metabólica. También abordamos estudios analizando el efecto de la vitamina sobre la oxidación de los ácidos grasos, ruta metabólica sobre la cuál se desconocen sus efectos.

Encontramos que la suplementación con biotina durante 8 semanas produjo en el hígado, cambios postranscripcionales conocidos por disminuir la lipogénesis. En tanto que, en el músculo, aumentó la abundancia del ARNm y formas fosforiladas de proteínas que activan la oxidación de ácidos grasos. En consonancia con estos efectos, se encontró una disminución en las acil-carnitinas de cadena corta y larga (C2-C18) sin haber cambios en la carnitina libre; lo que, en conjunto, indica que la suplementación con biotina produce un aumento en la β -oxidación. Como mecanismo coincidente en ambos efectos, los resultados obtenidos en esta tesis demostraron por primera vez en la literatura que los efectos de la suplementación con biotina se producen por la activación de la enzima AMPK. Una proteína de señalización que disminuye la

lipogénesis y aumenta la oxidación de los ácidos grasos y cuya acción es central en la regulación del metabolismo en respuesta a las condiciones energéticas de la célula.

En el hígado, encontramos que la suplementación con biotina aumentó la abundancia de la forma fosforilada en la treonina 172 de la AMPK, forma que corresponde a la proteína activa. Concomitantemente produjo varias acciones conocidas por estar mediadas por la activación de AMPK como: a) la fosforilación de ACC-1 en la serina 79 (Hardie, 2011), paso limitante en la regulación de la lipogénesis (Jian et al., 2009); b) la disminución de la abundancia de la forma madura del factor transcripcional SREBP-1c, clave en el control de la expresión del ARN mensajero de las enzimas lipogénicas; c) la disminución de la abundancia proteica de FAS; efecto que es acorde con observaciones anteriores donde encontramos que la suplementación con biotina disminuyó la abundancia del ARNm de FAS. El efecto sobre la expresión de FAS puede ser resultado tanto de la disminución de la forma madura de SREBP-1c (Foufelle y Ferre, 2002) como por la actividad AMPK, ya que se ha reportado que FAS puede ser regulada negativamente al nivel transcripcional por AMPK (Foretz, et al., 1998). Todos estos resultados sustentan el efecto inhibitorio de la suplementación con biotina sobre la vía lipogénica observado previamente por nuestro laboratorio (Larrieta et al., 2010).

En estudios previos encontramos que la administración de la dieta suplementada con biotina durante 8 semanas disminuyó la abundancia del ARN mensajero de ACC-1 (Larrieta et al., 2010). Sin embargo, en los resultados de este trabajo no se encontraron diferencias en la masa de la proteína total de esta enzima. Esta discrepancia podría explicarse en el hecho de que se ha encontrado que la expresión de proteínas por la suplementación con biotina no se acompaña necesariamente de la abundancia de sus respectivos ARNm (Rodríguez et al., 2005). También, en el caso específico de la piruvato carboxilasa, existe evidencia que la biotina regula la expresión de la apoenzima a nivel postranscripcional y a nivel de la degradación de la proteína (Rodríguez-Fuentes et al., 2007). Por lo tanto, nuestras observaciones sugieren que estos efectos podrían participar en la falta de paralelismo entre la expresión del mensajero y la proteína de ACC-1.

Con estos resultados podemos sugerir que el efecto hipotriglicéridémico de la biotina está dado, en parte, por una disminución en la β -reducción, lo que llevaría a una menor producción de triacilglicérolos y, por ende, de partículas VLDL por una limitación de este sustrato. Además, podemos descartar que la disminución sérica de triacilglicérolos se deba a una acumulación hepática o esteatosis, por una menor exportación de lipoproteínas VLDL, ya que el contenido de triacilglicérolos en el hígado se encontró disminuido en los ratones suplementados con biotina. El decremento en la lipogénesis y en el contenido de triacilglicérolos hepáticos en los ratones tratados con biotina, puede abrir el camino para el posible uso de la biotina en el tratamiento de hígado graso o esteatosis.

Con lo que respecta al catabolismo de lípidos, nuestros hallazgos indican que los animales que recibieron una dieta suplementada con biotina tuvieron cambios en la expresión de proteínas que favorecen el transporte de ácidos grasos a la mitocondria y su oxidación. Como se señaló en la introducción, la regulación de la β -oxidación en el músculo esquelético es compleja y está controlada a diferentes niveles. Sin embargo, se ha propuesto que el sitio más importante en la regulación de la oxidación de los ácidos grasos es el transporte de los acil-CoA de cadena larga del citosol a la matriz mitocondrial (Ruderman et al., 1999). Dos enzimas tienen un papel muy importante en este proceso en el músculo: la CPT-1 y la ACC-2. La carboxilasa a través de modificaciones en su actividad por fosforilación/desfosforilación (Yong, et al., 2010) participa en la regulación de CPT-1, produciendo malonil-CoA que la inhibe alostéricamente (McGarry y Brown, 1997). Nosotros encontramos un aumento en la fosforilación (ser 219/221) de ACC-2 en el músculo de los animales suplementados con biotina, lo que se traduce en una menor producción de malonil-CoA y una menor represión de la actividad de CPT-1 y por ende un aumento de la beta-oxidación.

También encontramos un aumento del ARNm de CPT-1 de los ratones suplementados con biotina. Dado que se sabe que el factor transcripcional PPAR- α (el cual encontramos aumentado en los ratones tratados con biotina) regula a nivel transcripcional la expresión de CPT-1 (Michung, 2009), nuestros datos indican que además de estar incrementada la actividad de CPT-

1 (por deshinibición alostérica mediada por ACC-2) también habría mayor cantidad de la enzima al estar incrementada su transcripción. Con respecto al ARN mensajero de ACC-2 se conoce poco del papel que juega PPAR- α sobre la expresión de su mensaje. Nuestros estudios no encontraron cambios en la expresión del ARN mensajero ACC-2 en el músculo, acorde con estos resultados la abundancia de su proteína tampoco se vio modificada.

Los resultados arriba descritos sugieren que el tratamiento con biotina incrementa el transporte de ácidos grasos de cadena larga dentro de la mitocondria y, por ende produce un aumento en la β -oxidación, estos efectos son además apoyados por nuestro análisis de acilcarnitinas por espectrometría de masas en tandem (en sus siglas inglesas MS/MS). En donde encontramos que, con el grupo control, los ratones suplementados con biotina presentan una disminución de las acilcarnitinas de cadena corta (C2-C6), mediana (C8-C10) y larga (C12-C18), pero no en la concentración de la carnitina libre. Esta disminución nos sugiere que hay un incremento en el flujo oxidativo y por lo tanto una disminución en los metabolitos intermediarios de cada etapa. Se ha reportado que una disminución en la concentración de carnitina libre en el músculo, produce un decremento en la actividad de la CPT-1 (Francis et al., 2007), el hecho de que la concentración de la carnitina libre no se encuentre disminuida en los ratones suplementados sugiere que el bajo contenido de acil-carnitinas no se debe a la falta de carnitina como sustrato.

Por otro lado, en este trabajo encontramos una disminución de ácidos grasos libres en el suero del grupo suplementado con respecto a los ratones control, lo que podría ser resultado tanto por un aumento en la oxidación de estos metabolitos, como es sugerido por nuestros datos, como por una disminución en la lipólisis. Esta última posibilidad se encuentra en estudio en nuestro laboratorio.

En el desarrollo de esta tesis también abordamos el estudio de los mecanismos de señalización que se encuentran modificados por la suplementación con biotina. Diversos estudios *in vitro* han encontrado que la producción de GMPc mediante la acción de la guanilato

ciclase soluble participa en el mecanismo de acción de la biotina a concentraciones farmacológicas (De La Vega y Stockert, 2000; Solorzano Vargas et al., 2002; Stockert y Morell, 1990; Stockert et al., 1992, Vilches-Flores 2010). Nuestros resultados por primera vez demuestran que *in vivo* la suplementación con biotina incrementa las concentraciones de GMPc, e identificamos a AMPK como una proteína mediadora de sus efectos. En apoyo de nuestras conclusiones, estudios recientes (Deshmukh et al., 2010; Ramnanan et al., 2010) encontraron que la vía de señalización GMPc/PKG actúa como un activador de AMPK. En un estudio realizado por Deshmukh y colaboradores en el músculo esquelético humano (Deshmukh et al., 2010) se encontró que el incremento en los niveles de GMPc aumentan el transporte de glucosa concomitantemente con la activación de AMPK y que estos efectos son abatidos en presencia de un inhibidor de la guanilato ciclase. También otros experimentos realizados en el caracol del desierto *Otala lacteal*, en los que se inhibió a la guanilato ciclase soluble, demostraron que la vía de señalización de cGMP/PKG regula la actividad de la AMPK (Ramnanan et al., 2010). Dada la complejidad existente en los sistemas *in vivo* estos no son un buen modelo para obtener conclusiones sobre los mecanismos de transducción de señales. Sin embargo, nuestros estudios *in vivo* representan una primera aproximación en la relación existente entre las acciones de la biotina a través de la interacción del GMPc y la vía de señalización de AMPK.

Es interesante señalar la existencia de efectos análogos entre varios compuestos que inducen la fosforilación de AMPK y aquellas que produce la suplementación con biotina. Similar a los efectos hipotriglicéridémicos de la biotina (Dokusova y Klimov, 1967; Dokusova y Krivoruchenko, 1972; Revilla-Monsalve et al., 2006), la activación de la AMPK resulta en una reducción en los triacilglicérols plasmáticos (Zhou et al., 2001), colesterol (Zhou et al., 2009) y el ARN mensajero de genes lipogénicos como FAS, piruvato cinasa y ACC-1 (Woods et al., 2000; Zhou et al., 2001; Larrieta et al., 2010). Además, existen varias similitudes entre los efectos de la biotina y la activación de AMPK en la gluconeogénesis, como lo son la expresión disminuida del ARNm de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa, la glucosa-6-fosfatasa, el factor nuclear de hepatocitos-4 (HNF-4) y FoxO-1 (Leff, 2003; Dakshinamurti y Li, 1994; Sugita et al., 2008).

Otra vía de señalización identificada en esta investigación fue la mediada por las MAPKs cinasas ERK1/2. Existen evidencias de que la señalización en la que participan estas proteínas está relacionada con la vía de señalización de AMPK. En fibroblastos cardíacos la activación de las cinasas ERK1/2 por factores de crecimiento inhiben la fosforilación de AMPK. En tanto que la activación de AMPK por el análogo de AMP (AICAR) inhibe la fosforilación de las ERK1/2 (Jianhai et al. 2008). Éstos estudios concluyeron que existe un tipo de diafonía celular entre estas dos señalizaciones y que su regulación es inversamente proporcional entre ellas. Además, en un estudio hecho recientemente en 2011 por el grupo de Rongsen (Rongsen et al., 2011), encontraron que la interacción entre la vía de ERK1/2 y de AMPK puede activar o inhibir al factor transcripcional PPAR- α dependiendo de cual es la cinasa que se encuentra activa. En concordancia con estos hallazgos, nuestros resultados revelaron que en el músculo de los ratones tratados con biotina existe un aumento en la fosforilación de AMPK y una disminución en las cinasas ERK1/2. Lo que nos sugiere que este efecto se encuentra ligado a un aumento en masa total del factor transcripcional PPAR- α , que es un regulador positivo de varias de las enzimas que participan en la oxidación de ácidos grasos y también de proteínas de la biogénesis mitocondrial (Michung, 2009).

Los resultados de esta tesis brindan nuevos conocimientos sobre el efecto de la suplementación con biotina sobre diversas vías del metabolismo de lípidos y las vías de señalización que participan en estos efectos. Sentando así las bases moleculares de su acción que será de gran utilidad para poder determinar su uso en el tratamiento de hipertrigliceridemias. Es interesante hacer notar que el aumento en la actividad de AMPK también se produce con ciertos medicamentos y compuestos de acción hipotriglicéridémica, como metformina (Zhou et al., 2001), berberina (Kim et al., 2009), troglitazona (Hardie, 2011) y resveratrol (Shang et al., 2008). Nuestros datos demuestran que la biotina también lleva a cabo sus efectos hipotriglicéridémicos a través de una activación de AMPK.

El estudio de las vitaminas y sus mecanismos de acción ha sido fundamental para la comprensión del rol de las vitaminas en las funciones biológicas; gracias a los conocimientos

obtenidos de estos estudios ha sido posible uso de vitaminas, o derivados de éstas, en el tratamiento de diversas afecciones. Un ejemplo de esto es la niacina, una vitamina del complejo B que ha sido usada desde los años 50 como una droga hipolipidémica (Vosper, 2009). También existen diversos compuestos derivados de las vitaminas liposolubles A y D, que son usados en la actualidad para el tratamiento de diversas enfermedades (Hinds et al., 1997). Nuestros estudios sobre los efectos farmacológicos de la biotina ofrece nuevos conocimientos del mecanismo molecular mediante el cual ejerce sus acciones y al igual de como ha ocurrido con otras vitaminas; esta investigación puede llevar a nuevas estrategias en el desarrollo de agentes terapéuticos.

10. CONCLUSIONES

La suplementación con biotina durante ocho semanas a ratones machos:

- Disminuyó las concentraciones séricas de triacilgliceroles y ácidos grasos no esterificados.
- ✓ En el hígado:
 - Disminuyó el contenido de triacilgliceroles
 - Aumentó la fosforilación de AMPK y ACC-1
 - Decremento la abundancia de la forma madura de SREBP-1c y de FAS
 - Incrementó la abundancia de la masa fosforilada de AMPK
 - Aumentó en el hígado el contenido de GMPc
- ✓ En el músculo:
 - Aumentó la fosforilación de AMPK y ACC-2
 - Disminuyeron los niveles en la fosforilación de ERK1/2
 - Aumentó la expresión del ARNm de CPT-1 y no cambió el de ACC-2
 - Disminuyó la concentración de acilcarnitinas y no cambió la de carnitina libre
 - Aumento la abundancia de la proteína del factor transcripcional PPAR- α

En conjunto, estos resultados nos indican que la biotina modula diferentes vías metabólicas de los lípidos, como la lipogénesis y la oxidación, lo cual propicia un efecto hipotrigliceridémico. Proponemos que el mecanismo molecular es a través de una disminución en la lipogénesis hepática por un aumento en GMPc y AMPK. Y por un aumento en la oxidación muscular a través de la activación de AMPK y una disminución en la actividad de ERK1/2, que favorece un aumento en el factor transcripcional PPAR- α (Figura 24).

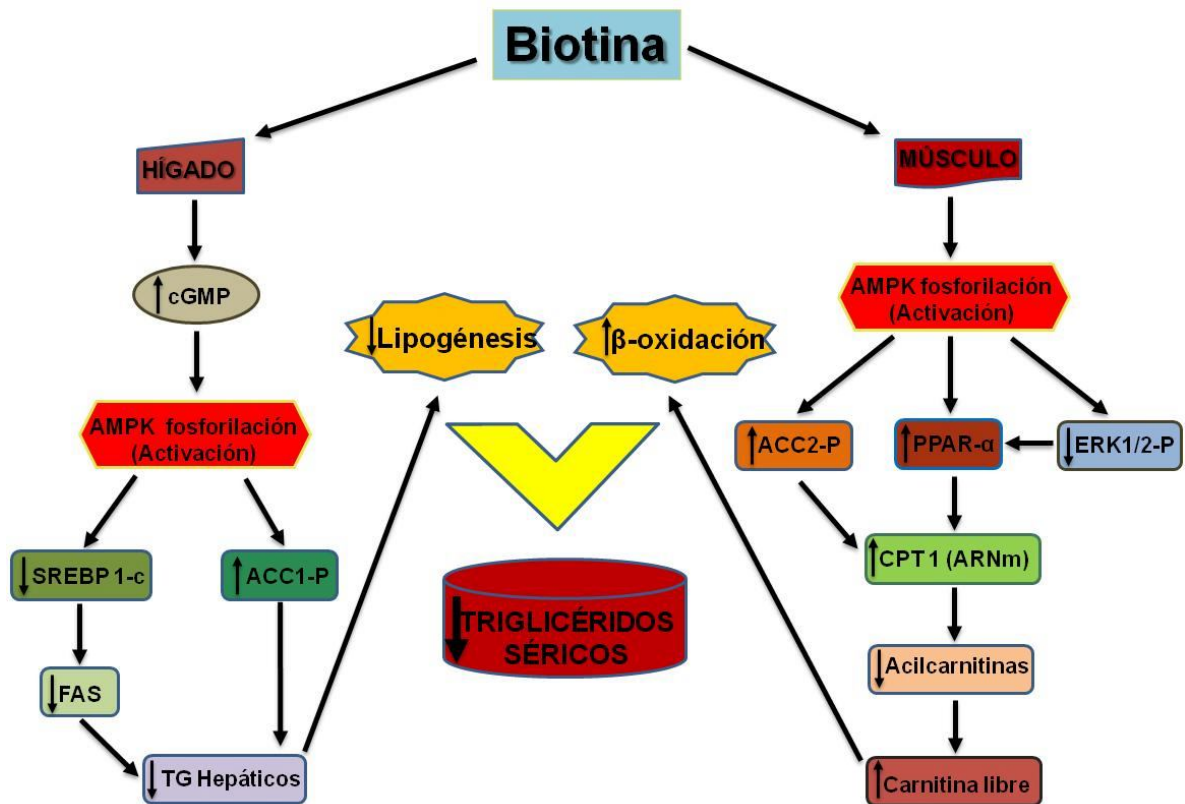


Figura 24. Mecanismo molecular propuesto del efecto hipotrigliceridémico de la biotina. Los datos de nuestra investigación permiten proponer que la vitamina modula diferentes vías metabólicas de los lípidos, lo cual explica su efecto hipotrigliceridémico en suero. Proponemos que el mecanismo molecular es a través de una disminución en la lipogénesis hepática por un aumento en GMPc y AMPK, que provoca disminución en los principales actores que regulan esta vía (SREBP-1c, FAS y ACC-1). Y por un aumento en la oxidación muscular a través de la activación de AMPK y disminución de la actividad de ACC-2. Una disminución en la actividad de ERK1/2, que favorece un aumento en el factor transcripcional PPAR-α. Además, un incremento en el flujo oxidativo por aumento en la actividad de CPT-1.

11. PERSPECTIVAS

En el presente trabajo encontramos que la biotina modifica varias cinasas, factores transcripcionales y enzimas de dos importantes vías metabólicas de los lípidos: la lipogénesis, en el hígado, y la oxidación de los ácidos grasos en el músculo. Estos estudios también brindaron información sobre las vías de señalización que participan en los efectos de la suplementación con biotina sobre estas vías metabólicas. Sin embargo, dada la complejidad de los sistemas *in vivo*, estos modelos no son los ideales para demostrar los mecanismos de señalización. Por lo que proponemos hacer estudios *in vitro* con hepatocitos de rata y en la línea celular miogénica C2C12, utilizando inhibidores de la guanilato ciclasa (ODQ), de la cinasa PKG (Rp-GMPcS) y agonistas de la guanilato ciclasa (8-Bromo-GMPc) y de AMPK (AICAR). Lo que permitirá demostrar la relación existente entre la activación de la vía de señalización de GMPc y la AMPK.

Por otro lado, proponemos hacer estudios en ratones con retos metabólicos como la obesidad producida por una dieta rica en grasas, en los cuales se analizará si el tratamiento con biotina mejora las alteraciones implícitas de la obesidad, como la hipertigliceridemia y la esteatosis hepática y los mecanismos mediante los cuales la biotina produce sus efectos.

12. REFERENCIAS

1. **Abou-Rjaili, G.**, Shtaynberg, N., Wetz, R., Costantino, T., Abela, G. 2010. Current concepts in triglyceride metabolism, pathophysiology, and treatment. *Metabolism Clinical and Experimental*. 59, 1210–1220.
2. **Abu-Elheiga, L.**, Almarza-Ortega, D.B., Baldini, A., Wakil, S.J. 1997. Human acetyl-CoA carboxylase 2. Molecular cloning, characterization, chromosomal mapping, and evidence for two isoforms. *J Biol Chem*. 16, 10669-10677.
3. **Abu-Elheiga, L.**, Brinkley, W.R., Zhong, L., Chirala, S.S., Woldegiorgis, G., Wakil, S.J. 2000. The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 4, 1444-1449.
4. **Abu-Elheiga, L.**, Matzuk, M. M., Abo-Hashema, K.A., Wakil, S.J. 2001. Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2. *Science*. 291, 2613-2616.
5. **Albarracín C.**, Fuqua B, Geohas J, Finch M, Komorowski, J.R. 2007. Combination of chromium and biotin improves coronary risk factors in hypercholesterolemic type 2 diabetes mellitus: a placebo-controlled, double-blind randomized clinical trial. *J Cardiometab Syndr*. 2; 91-7.
6. **Alonso, V.F.**, Cristina, F.M. 2005. Efecto de la biotina sobre la expresión genética y el metabolismo. *Rev Invest Clin*. 57, 716-724.
7. **Ashman, L.K.**, Keech, D.B., Wallace, J.C., Nielsen, J. 1972. Sheep kidney pyruvate carboxylase. Studies on its activation by acetyl coenzyme A and characteristics of its acetyl coenzyme A independent reaction. *J Biol Chem*. 247, 5818-5824.
8. **Báez-Saldaña, A.**, Ortega, E. 2004. Biotin deficiency blocks thymocyte maturation accelerates thymus involution, and decreases nose-rump length in mice. *J. Nutr*. 134, 1970–1977.
9. **Báez-Saldaña, A.**, Zendejas-Ruiz, I., Revilla-Monsalve, C., Islas- Andrade, S., Cardenas, A., Rojas-Ochoa, A., Vilches, A., Fernández- Mejia, C. 2004. 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.
10. **Bailey, L. M.**, Ivanov, R. A., Wallace, J. C., Polyak, S.W. 2008. Artfactual detection of biotin on histones by streptavidin. *Anal Biochem*. 373, 71-77.
11. **Baranowski, M.** 2008. Biological role of liver x receptors. *Journal of physiology and pharmacology*. 59 (suppl,7), 31–55.
12. **Barbara, B.**, Thierry, A., David, C., Hardie, D. 2005. AMP-activated protein kinase: Ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metabolism*. 1, 15-25.
13. **Béatrice, D.**, Liliane, M., Walter, W. 2006. Transcriptional Regulation of Metabolism. *Physiol Rev* 86: 465–514.
14. **Bengochea-Alonso, M.T.**, Ericsson, J. 2009. A phosphorylation cascade controls the degradation of active SREBP1. *J. Biol. Chem*. 284, 5885–5895.

15. **Bergen, W.G.**, Mersmann, H. J. 2005. Comparative aspects of lipid metabolism: impact on contemporary research and use of animal models. *J Nutr.* 135, 2499-502.
16. **Bergmeyer, H.U.** 1963. ATP, ADP and AMP cuantification. In: *Methods in enzymatic analysis*. EE.UU. Academic Press. pp. 551-573.
17. **Bettina Mittendorfer**, Faidon Magkos, Elisa Fabbrini, B. Selma Mohammed¹ and Samuel Klein. 2009. Relationship Between Body Fat Mass and Free Fatty Acid Kinetics in Men and Women. *Obesity Journal.* 17, 1872-1877.
18. **Bieber, L. L.** 1988. Carnitine. *Annu Rev Biochem.* 57, 261-283.
19. **Boas, M., A.** 1927. The effect of desiccation upon the nutritive properties of egg-white. *Biochem. J.* 21, 712-724.
20. **Brenda Sánchez Salazar.** 2006. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN QUE PARTICIPAN EN LA REGULACIÓN DE LA LIPÓLISIS EN ADIPOCITOS. *REB* 25(3): 80-84.
21. **Bronner, M.**, Hertz, R., Bar-Tana, J. 2004. Kinase-independent transcriptional co-activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha by AMP-activated protein kinase. *Biochem J.* 384(Pt 2), 295-305.
22. **Brownsey, R.W.**, Boone, A.N., Elliott, J.E., Kulpa J.E., Lee W., M. 2006. Regulation of acetyl-CoA carboxylase. *Biochemical Society Transactions.* 2, 223-227.
23. **Carlberg, C.**, 1999. Lipid soluble vitamins in gene regulation. *Biofactors.* 10, 91-97.
24. **Chace, D. H.** 2001. Mass Spectrometry in the Clinical Laboratory. *Chem. Rev.* 101, 445-477.
25. **Chace, D.H.**, Kalas, T.A. 2005. A biochemical perspective on the use of tandem mass spectrometry for newborn screening and clinical testing. *Clinical Biochemistry.* 38, 296-309.
26. **Chatterjee, A.A.**, Schlicker, S.A., Suitor, C.W. 1998. Dietary reference intakes: the new basis for recommendations for calcium and related nutrients, B vitamins, and choline. *J Am Diet Assoc.* 98, 699-706.
27. **Chatterjee, N.**, Kumar, C., Ortiz, A., Rubin, S., Said, H. 1999. Molecular mechanism of the intestinal biotin transport process. *Am J Physiol.* 277, C605-C613.
28. **Chauhan J** and Dakshimamurti K. 1991. Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats. *J Biol Chem.* 266; 10035-38.
29. **Cochran, B. C.**, Fall, R.R. 1980. Isolation of 3-methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase from bovine kidney. *Arch Biochem Biophys.* 205, 352-359.
30. **Cochran, B. C.**, Logue, E. A., Fall, R. R. 1980. Subcellular localization of 3-methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase in bovine kidney. *Arch Biochem Biophys.* 199, 28-36.
31. **Cohen, N.**, Thomas, M. 1982. Biotin transport into fully differentiated 3T3-L1 cells. *Biochim Biophys Res Comm.* 108, 1508-1516.
32. **Coleman, R. A.**, Lee, D. P. 2004. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog Lipid Res.* 43, 134-176.
33. **Coleman, R.A.**, Lewin, T.M., Muoio, D.M. 2000. Physiological and nutritional regulation of enzymes of triacylglycerol synthesis. *Annu Rev Nutr.* 20, 77-103.
34. **Cross, D.A.**, Alessi DR, Cohen, P., Andjelkovich, M., Hemmings BA. 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature.* 378, 785-789.

35. **Dakshinamurti, K.**, Chauhan, J. 1994. Biotin-binding proteins. In: Vitamin receptors: vitamins as ligands in cell communication. EEUU. Cambridge University Press. 200-249.
36. **Dakshinamurti, K.**, Cheah-Tan, C. 1968. Biotin-mediated synthesis of hepatic glucokinase in the rat. *Arch Biochem Biophys.* 127, 17-21.
37. **Dakshinamurti, K.**, Desjardins, P. R. 1968. Lipogenesis in biotin deficiency. *Can J Biochem.* 46, 1261-1277.
38. **Dakshinamurti, K.**, Ho, C. H. 1970. Regulation of key hepatic glycolytic enzymes. *Enzymol Biol Clin (Basel).* 11, 423-428.
39. **Dakshinamurti, K.**, Li, W. 1994. Transcriptional regulation of liver phosphoenolpyruvate carboxykinase by biotin in diabetic rats. *Mol Cell Biochem.* 132, 127-132.
40. **David, L. N.**, Michael, M. C. 2000. Fourth ed. Worth Publishers. In: DeGroot, L.J., Jameson, J.L. (Eds.), *Lehninger Principles of Biochemistry.* pp. 787-804.
41. **De la Vega, L.**, Stockert, R. 2000. Regulation of the insulin and asialoglycoprotein receptors via GMPc-dependent protein kinase. *Am J Physiol- Cell Physiol.* 279, C2037-C2042.
42. **De la Vega, L.**, Stockert, R. J. 1999. The cytoplasmic coatmer protein COPI-A potential translational regulator. *J Biol Chem.* 247, 31135-31138.
43. **DeFronzo R.A.** 2004. Dysfunctional fat cells, lipotoxicity and type 2 diabetes. *Int J Clin Pract.* 143,9-21.
44. **Deshmukh, A.S.**, Long, Y.C., de Castro Barbosa, T., Karlsson, H.K., Glund, S., Zavadoski, W.J., Gibbs, E.M., Koistinen, H.A., Wallberg-Henriksson, H., Zierath, J.R., 2010. Nitric oxide increases cyclic GMP levels, AMP-activated protein kinase (AMPK)alpha1-specific activity and glucose transport in human skeletal muscle. *Diabetologia.* 53, 1142-1150.
45. **Dokusova, O.K.**, Klimov, A.N., 1967. Prevention of the development of experimental atherosclerosis by biotin. *Dokl Akad Nauk SSSR.* 172, 1454-1456.
46. **Dokusova, O.K.**, Krivoruchenko, I. V. 1972. The effect of biotin on the level of cholesterol in the blood of patients with atherosclerosis and essential hyperlipidemia. *Kardiologia.* 12, 113.
47. **Donald, B.**, Jump, V., Daniela, B., Yun, W., Jinghua, X., Barbara, Ch., Olivier, D. 2005. Fatty Acid Regulation of Hepatic Gene Transcription. *J. Nutr.* 135, 2503-2506.
48. **Ferdinandusse, S.**, Mulders, J., Ijlst, L., Denis, S., Dacremont, G., Waterham, H.R., Wanders, R.J. 1999. Molecular cloning and expression of human octanoyltransferase: evidence for its role in the peroxisomal β -oxidation of branched-chain fatty acids. *Biochem Bophys Res Commun.* 263, 213-218.
49. **Fernández Mejía C y Lazo de la Vega Ma Luisa.** 2010. Biological Effects of Pharmacological Concentrations of Biotin. *Journal of evidence-based complementary and altearntive medicine.* 16, 40-48.
50. **Foretz, M.**, Carling, D., Guichard, C., Ferré, P., Foufelle, F. 1998. AMP activated protein kinase Inhibits the glucose-activated expressionof fatty acid synthase gene in rat hepatocytes. *J BiolChem.* 273; 14767-14771.
51. **Foufelle, F.**, Ferre, P. 2002. New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochem J.* 366, 377-91.

52. **Francis, B., S.**, Dumitru C, T., Paul, L. G. 2007. New insights concerning the role of carnitine in the regulation of fuel metabolism in skeletal muscle. *J Physiol* 581.2, 431–444.
53. **García-Villafranca, J.**, Guillén, A., Castro J. 2003. Involvement of nitric oxide/cyclic GMP signaling pathway in the regulation of fatty acid metabolism in rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol.* 65, 807-812.
54. **Gibbons, G.F.**, Islam, K.H, Pease, R.J. 2000. Mobilisation of triacylglycerol stores. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1483, 37-57.
55. **Goldstein, J.L.**, DeBose-Boyd R.A., Brown M.S. 2006. Protein sensors for membrane sterols. *Cell.* 124, 35–46.
56. **Gonzalez, F.J.** 2008. Regulation of hepatocyte nuclear factor 4 alpha-mediated transcription. *Drug Metab Pharmacokinet.* 23 (1), 2-7.
57. **González-Yanes Carmen**, Sánchez-Margalet Víctor. 2006. Signalling mechanisms regulating lipolysis. *Cellular Signalling.* 18, 401–408.
58. **Gravel, R.A.**, Lam, K.F., Mahuran, D., Kronis, A. 1980. Purification of human liver propionyl-CoA carboxylase by carbon tetrachloride extraction and monomeric avidin affinity chromatography. *Arch Biochem Biophys.* 201, 669-673.
59. **Griffin, J. B.**, Rodriguez-Melendez, R., Dode, L., Wuytack, F., Zemleni, J. 2006. Biotin supplementation decreases the expression of the SERCA3 gene (ATP2A3) in Jurkat cells, thus, triggering unfolded protein response. *J Nutr Biochem.* 4, 272-281.
60. **Gurpreet, S.**, Kapoor, D., Brett, A., Atkins, A., Kamal, D. Mehta, G. 2002. Activation of Raf-1/MEK-1/2/p42/44MAPK cascade alone is sufficient to uncouple LDL receptor expression from cell growth. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 236: 13–22.
61. **Ha, J.**, Daniel, S., Kong, I.S., Park, C. K., Tae, H. J., Kim, K. H. 1994. Cloning of human acetyl-CoA carboxylase cADN. *Eur J Biochem.* 219, 297-306.
62. **Ha, J.S.**, Daniel, S., Broyles, S., Kim, K.H. 1999. Critical phosphorylation sites for acetyl-CoA carboxylase activity. *J. Biol. Chem.* 269, 22162-22168.
63. **Handschin, C.**, Spiegelman, B. 2005. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma Coactivator 1-Coactivators: Energy Homeostasis and Metabolism. *Endocrine Reviews.* 27, 728–735.
64. **Hardie, D.G.** 2011. AMP-activated protein kinase—an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes and Development.* 25, 1895–1908.
65. **Hassan, Y.I.**, Zemleni, J. 2006. Epigenetic regulation of chromatin structure and gene function by biotin. *J Nutr.* 136, 1763-1765.
66. **Hayden, L. J.**, Cohen, S., Levin, K., Margolis, S. 1983. Comparison of glucagon, cAMP, and GMPc effects on lipogenesis in hepatocytes. *Can J. Biochem. Cell Biol.* 61, 207-213.
67. **Healy, S.**, Perez-Cadahia, B., Jia, D., McDonald, M.K., Davie, J.R., Gravel, R.A. 2009. Biotin is not a natural histone modification. *Biochim Biophys Acta.* 1789, 719-33.
68. **Hiatt, W. R.**, Regensteiner, J. G., Wolfel, E. E., Ruff, L., Brass, E. P. 1989. Carnitine and acylcarnitine metabolism during exercise in humans: Dependence on skeletal muscle metabolic state. *J Clin Invest.* 84, 1167-1173.
69. **Hinds, T.S.**, West, W.L., Knight, E.M., 1997. Carotenoids and retinoids: a review of research, clinical and public health applications. *J. Clin. Pharmacol.* 37, 551-558.
70. **Hoi, J. T.**, Eissenberg, J. C., Shoemaker, J.D., Neckameyer, W. S., Ilvarsonn, A. M., Harshman, L. G., Schlegel, V. L., Zemleni, J. 2007. Feeding *Drosophila* a biotin-deficient

- diet for multiple generations increases stress resistance and lifespan and alters gene expression and histone biotinylation patterns. *J Nutr.* 137, 2006-2012.
71. **Horton, J.D.**, Goldstein, J.L., Brown, M.S., 2002. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* 109, 1125-1131.
 72. **Hymes, J.**, Wolf, B. 1996. Biotinidase and its roles in biotin metabolism. *Clin Chim Acta.* 225, 1-11.
 73. **Inbal W.**, Rony, S. 2011. The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. *Genes & Cancer.* 2(3),195–209
 74. **INEGI. 2009.** Defunciones generales totales por principales causas de mortalidad. <http://www.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo107&s=est&c=23587>.
 75. **Innis, S.M.**, Allardyce, D.B. 1983. Possible biotin deficiency in adults receiving long-term total parenteral nutrition. *Am J Clin Nutr.* 37, 185-187.
 76. **Jian, Y.**, Lauren, C., Sharon, H., Zhi-Mei, L. 2009. AMP-Activated Protein Kinase Suppresses LXR-Dependent Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1c Transcription in Rat Hepatoma McA-RH7777 Cells. *JouARNI of Cellular Biochemistry.* 106, 414–426.
 77. **Jianhai, D.**, Tongju, G., Hui, Z., Yi, X., Fei, L., Youyi, Z. 2008. Inhibitory crosstalk between ERK and AMPK in the growth and proliferation of cardiac fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 368, 402–407.
 78. **Jitrapakdee, S.**, Wallace, J. C. 2003. The biotin enzyme family: conserved structural motifs and domain rearrangements. *Curr Protein Pept Sci.* 4, 217-229.
 79. **John, B, A.**, Carmen, R. L., Richard, R. J., Sylvia, A. M. 1989. Mitochondrial Storage Forms of Acetyl CoA Carboxylase: Mobilization/Activation Accounts for Increased Activity of the Enzyme in Liver of Genetically Obese Zucker Rats1. *J. Nutr.* 119, 478-483.
 80. **Kendrick, J.S.**, Wilkinson, J., Cartwright, I. J., Lawrence, S., Higgins, J. A. 1998: Regulation of the assembly and secretion of very low density lipoproteins by the liver. *Biological Chem.* 379, 1033–1040.
 81. **Khairallah, R. J**, Khairallah, M., Gélinas, R., Bouchard, B., Young, M. E., Allen, B.G., Lopaschuk, G. D., Deschepper, C. F., Des Rosiers, C. 2008. Cyclic GMP signaling in cardiomyocytes modulates fatty acid trafficking and prevents triglyceride accumulation. *J Mol Cell Cardiol.* 45, 230-239.
 82. **Khedara, A.**, Goto, T., Morishima, M., Kayashita, J., Kato, N. 1999. Elevated body fat in rats by the dietary nitric oxide synthase inhibitor, L-N omega nitroarginine. *Biosci Biotechnol Biochem.* 698-702.
 83. **Khedara, A.**, Kawai, Y., Kayashita, J., Kato, N. 1996. Feeding rats the nitric oxide synthase inhibitor, L-N(omega)nitroarginine, elevates serum triglyceride and cholesterol and lowers hepatic fatty acid oxidation. *J Nutr.* 126, 2563-7.
 84. **Kim, K.H.**, López-Casillas, F., Bai, D.H., Luo, X., Pape, M.E. 1989. Role of reversible phosphorylation of acetyl-CoA carboxylase in long-chain fatty acid synthesis. *FASEB J.* 11, 2250-2256.
 85. **Kim, W.S.**, Lee, Y.S., Cha, S.H., Jeong, H.W., Choe, S.S., Lee M.R., Oh, G.T., Park, H.S., Lee, K.U., Lane M.D., Kim, J.B., 2009. Berberine improves lipid dysregulation in obesity by controlling central and peripheral AMPK activity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296, E812-E819.

86. **Kimberly, A.**, Lucas, H., Giovanni, M., Pitari, S., kazerounian, I., Ruiz, S., Jason, P., Stephanie, S., Kenneth, P., Chepenik, S., Waldman, S. 2000. Guanylyl Cyclases and Signaling by Cyclic GMP. *Pharmacol Rev.* 52, 375–413.
87. **Knowles, J. R.** 1989. The mechanism of biotin-dependent enzymes. *Annu Rev Biochem.* 58, 195-221.
88. **Kogl, F.**, Tonnis, B. 1932. Uber das Bios–Problem. Darstellung von krystallisiertem Biotin aus Eigelb. *Z. Physiol. Chem.* 242, 43–73.
89. **Kurowska, E. M.**, Carroll, K. K. 1998. Hypocholesterolemic properties of nitric oxide. In vivo and in vitro studies using nitric oxide donors. *Biochim Biophys Acta.* 1392, 41-50.
90. **Lamhonwah, A.M.**, Quan, F., Gravel, R.A. 1987. Secuence homology around the biotin-binding site of human propionyl-CoA carboxylase and pyruvate carboxilase. *Arch Biochem Biophys.* 254, 631-616.
91. **Large, V.**, Peroni, O., Letexier, D., Ray, H., Beylot, M. 2004. Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab.* 30, 294-309.
92. **Lavoie, J.M**, Gauthier, M, S. 2006. Regulation of fat metabolism in the liver: link to non-alcoholic hepatic steatosis and impact of physical exercise. *Cell Mol Life Sci.* 63, 1393-409.
93. **Lawrence S, K.**, Zhirong, Y., Georgette, N, J., Emilia, M. 2009. Mouse models of altered protein kinase A signaling. *Endocrine Related Cancer.* 16, 773-793.
94. **Lazo de la Vega, M.A** y Fernández Mejía, C. 2010. Bases moleculares de la obesidad, pag. 101-123. En: *Obesidad, un enfoque multidisciplinario.* 1ra Edición. José Antonio Morales González. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
95. **Leclerc, I.**, Rutter, G.A., 2004. AMP-activated protein kinase: a new beta-cell glucose sensor? Regulation by amino acids and calcium ions. *Diabetes.* 53, S67-S74.
96. **Leff, T.**, 2003. AMP-activated protein kinase regulates gene expression by direct phosphorylation of nuclear proteins. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 224-227.
97. **Lever, K.L.**, Waldrop, G.L., Stephens, J.M. 2002. A biotin analog inhibits acetyl-CoA carboxylase activity and adipogenesis. *J Biol Chem.* 277, 16347-16350.
98. **Lewis, G.F.** 1997. Fatty acid regulation of very low density lipoprotein production. *Curr Opin Lipidol.* 8, 146–153.
99. **Lewis, G.F.**, Uffelman, K.D., Szeto, L.W., Weller, B., Steiner, G. 1995. Interaction between free fatty acids and insulin in the acute control of very low density lipoprotein production in humans. *J Clin Invest.* 95, 158–166.
100. **Li, Y.**, Xu, S., Mihaylova, M.M., Zheng, B., Hou, X., Jiang, B., Park, O., Luo, Z., Lefai, E., Shyy, J.Y. 2011. AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. *Cell Metab* 13, 376–388.
101. **Liang, X.**, Le, W., Zhang, D., Schulz, H. 2001. Impact of the intramitochondrial enzyme organization of fatty acid oxidation. *Biochem Soc Trans.* 29, 279-282.
102. **Liu, X.** and Zheng, X.F. 2007. Endoplasmic reticulum and Golgi localization sequences for mammalian target of rapamycin. *Mol.Biol. Cell* 18, 1073–1082.
103. **Livak, K.J.**, Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)). *Method. Methods.* 25, 402–408.
104. **Maria, M.**, Assunta, L., Elena, S., Rosalba, S., Federica, C., FeARNdo, G., Antonia, L., Pieter, De L. 2010. PPARs: Nuclear Receptors Controlled by, and Controlling, Nutrient Handling through Nuclear and Cytosolic Signaling. *PPAR Research.* 10, 1-10.

105. **Marshall, M. W.**, Haubrich, M. L., Washington, V. A., Chang, M. W., Young, C. W., Wheeler, M. A. 1976. Biotin status and lipid metabolism in adult obese hypercholesterolemic inbred rats. *Nutr Metab.* 20, 41-61.
106. **Marshall, M. W.**, Kliman, P. G., Washington, V. A., Mackin, J. F., Weinland, B.T. 1980. Effects of biotin on lipids and other constituents of plasma of healthy men and women. *Artery.* 7, 330-351.
107. **Marshall, M. W.**, Smith, B. P., Lehmann, R. P. 1969. Dietary response of two genetically different lines of inbred rats: lipids in serum and liver. *Proc Soc Exp Biol Med.* 131, 1271-7.
108. **Mason, T. M.** 1998: The role of factors that regulate the synthesis and secretion of very-low-density lipoprotein by hepatocytes. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences.* 35, 461–487.
109. **McGarry, J.D.**, Brown, N.F. 1997. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem.* 244, 1-14.
110. **Melo V.**, Cuatmatzi, O. 2004. *Bioquímica de los procesos metabólicos.* México, Reverté-UAM.
111. **Michael S,** Mitchell A, L. 2010. Endogenous Ligands for Nuclear Receptors: Digging Deeper. *The Journal of Biological Chemistry.* 285, 40409–40415.
112. **Michung, Y.** 2009. The role of PPAR γ in lipid metabolism and obesity: Focusing on the effects of estrogen on PPAR actions. *Pharmacological Research.* 60, 151–159.
113. **Míguez, I.**, Mariño, G., Rodríguez, B., Taboada, C. 2004. Effects of dietary L-arginine supplementation on serum lipids and intestinal enzyme activities in diabetic rats. *J Physiol Biochem.* 60, 31-37.
114. **Millington, S.**, Kodo, N., Terada, N., Roe D, Chace, D.H. 1991. The analysis of diagnostic markers of genetic disorders in human blood and urine using tandem mass spectrometry with liquid secondary ion mass spectrometry. *Int J Mass Spect Ion Proc.* 111, 211-28.
115. **Nguyen, P.**, Leray, V., Diez, M., Serisier, S., Le Bloc'h, J., Siliart, B., Dumon, H. 2008. Liver lipid metabolism. *JouARNI of Animal Physiology and Animal Nutrition.* 92, 272–283.
116. **Nobuko, I.** 1992. Nutritional and hormonal regulation of lipogenic-enzyme gene expression in rat liver. *Eur. J. Biochem.* 205, 433-442.
117. **Norbert, L.**, Mustapha, Ch., Malki, V., Nicolas, F., Marie-Claude C., Brigitte, J., Jean-Pierre B. 2000. Regulation of the Peroxisomal beta-Oxidation-Dependent Pathway by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α and Kinases. *Biochemical Pharmacology.* 60, 1027–1032.
118. **Pacheco-Alvarez D,** Solórzano-Vargas RS, Gravel R.A, Cervantes-Roldán R, Velázquez A, León-Del-Río A. 2004. Paradoxical regulation of biotin utilization in brain and liver and implications for inherited multiple carboxylase deficiency. *J Biol Chem.* 279, 52312-52318.
119. **Park, H.**, Kaushik, V.K., Constant, S., Prentki, M., Przybytkowski, E., Ruderman, N.B. & Saha, A.K. 2002. Coordinate regulation of malonyl-CoA decarboxylase, sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, and acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase in rat tissues in response to exercise. *J Biol Chem* 277, 32571–32577.
120. **Pawel, D.**, Magdalena J., Agnieszka D. 2010. Stearoyl-CoA desaturase and insulin signaling-What is the molecular switch?. *Biochim Biophys Acta.* 1797, 1189-94.

121. **Peters, D. M.**, Griffin, J. B., Stanley, J. S., Beck, M. M., Zempleni, J. 2002. Exposure to UV light causes increased biotinylation of histones in Jurkat cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 283, C878- C884.
122. **Pilz, R.B.**, Broderick, K.E. 2005. Role of cyclic GMP in gene regulation. *Front Biosci.* 10, 1239-68.
123. **Pilz, R.B.**, Casteel, D. E. 2003. Regulation of gene expression by cyclic GMP. *Circ Res.* 93, 1034-46.
124. **Porstmann, T.**, Santos C.R., Griffiths, B., Cully, M., Wu, M., Leever, S., Griffiths, J.R., Chung, Y.L., Schulze, A. 2008. SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell Metab.* 8, 224–236.
125. **Poupeau A**, Postic C. 2011. Cross-regulation of hepatic glucose metabolism via ChREBP and nuclear receptors. *Biochim Biophys Acta.* 1812 (8), 995-1006.
126. **Prabodh, S.**, Yi, Z., Shulan-Songa, George, A, Cooka, S., Elamb, M. B., Edwards, A., P. Regulation of carnitine palmitoyltransferase I (CPT-I₁) gene expression by the peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator (PGC-1) isoforms. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 267, 6–16.
127. **Punita, D.**, April, B., Amit, K., Carmen, G., Kamal, D., Mehta, G. 1999. Critical role of p42/44MAPK activation in anisomycin and hepatocyte growth factor-induced LDL receptor expression: activation of Raf-1/MEK-1/p42/44MAPK cascade alone is sufficient to induce LDL receptor expression. *J. Lipid Res.* 40, 1911–1919.
128. **Oureshi, K.**, Abrams, G.A. 2007. Metabolic liver disease of obesity and role of adipose tissue in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 13, 3540–53.
129. **Rajendra, R.**, Chandrasaha, Y., Xiong, D., Edwards, A., Marshall, B. 2008. SREBPs: the crossroads of physiological and pathological lipid homeostasis. *Trends in Endocrinology and Metabolism.* 19, 65-73.
130. **Ramnanan, C.J.**, McMullen, D.C., Groom, A.G., Storey, K.B., 2010. The regulation of AMPK signaling in a natural state of profound metabolic rate depression. *Mol. Cell. Biochem.* 335, 91-105.
131. **Revilla-Monsalve, C.**, Zendejas-Ruiz, I., Islas-Andrade, S., Báez-Saldaña, A., Palomino-Garibay, M.A., Hernández-Quiróz, P.M., Fernández-Mejía, C. 2006. Biotin supplementation reduces plasma triacylglycerol and VLDL in type 2 diabetic patients and in nondiabetic subjects with hypertriglyceridemia. *Biomed Pharmacother.* 60, 182-185.
132. **Reza, M.**, Khosrow, A. 2009. Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Clinical Biochemistry.* 42, 1331–1346.
133. **Rodgers, R.L.** 2012. GLUCAGON AND CYCLIC AMP: TIME TO TURN THE PAGE?. *Curr Diabetes Rev.* May 14. [Epub ahead of print].
134. **Rodriguez, R.** 2002. Importancia de las vitaminas hidrosolubles como factores reguladores de la expresión génica. *Rev. Inves. Clin.* 54, 77 -83.
135. **Rodriguez-Fuentes, N.**, Lopez-Rosas, I., Roman-Cisneros G., Velazquez-Arellano, A., 2007. Biotin deficiency affects both synthesis and degradation of pyruvate carboxylase in rat primary hepatocyte cultures. *Mol. Genet. Metab.* 92, 222-228.

136. **Rodríguez-Melendez, R.**, Camporeale, G., Griffin, J.B., Zempleni, J. 2003. Interleukin-2 receptor γ -dependent endocytosis depends on biotin in Jurkat cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 284, C415-C421.
137. **Rodríguez-Melendez, R.**, Cano, S., Mendez, S.T., Velazquez, A. 2001. Biotin regulates the genetic expression of holocarboxylase synthetase and mitochondrial carboxylases in rats. *J Nutr*; 131: 1909-1913.
138. **Rodríguez-Melendez, R.**, Griffin, J. B., Sarath, G., Zempleni, J. 2005. High-throughput immunoblotting identifies biotin-dependent signaling proteins in HepG2 hepatocarcinoma cells. *J Nutr.* Jul;135(7):1659-66.
139. **Rodríguez-Melendez, R.**, Zempleni, J. 2003. Regulation of gene expression by biotin (review). *J Nutr Biochem.* 14,680-690.
140. **Roepstorff, C.**, Halberg, N., Hilling, T., Saha, A.K., Ruderman, N.B., Wojtaszewski, J.F., Richter, E.A., Kiens, B. 2004. Malonyl- CoA and carnitine in regulation of fat oxidation in human skeletal muscle during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 287, E696-E705.
141. **Rongsen, M.**, Zhaohui, P., Aixia, Z., Yutian, Z., Xingming, C., Baolin, C., Guanjie, L., Weiyi, M., Jianrui, W., Yugang, D. 2011. AMPK activation enhances PPAR- α activity to inhibit cardiac hypertrophy via ERK1/2 MAPK signaling pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 511, 1–7.
142. **Ruderman, N.B.**, Saha, A.K., Vavvas, D., Witters, L.A. 1999. Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance. *Am J Physiol.* 276, E1–E18.
143. **Rutter, G.**, Silva Xavier, G., Leclerc, I. 2003. Roles of 5-AMP activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homeostasi. *Biochem. J.* 375, 1–16.
144. **Saha, A.K.**, Schwarsin, A.J., Roudit, R., Masse, F., Kaushik, V., Tornheim, K., Prentki, M. & Ruderman, N.B. 2000. Activation of malonyl-CoA decarboxylase in rat skeletal muscle by contraction and the AMP-activated protein kinase activator 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-d-ribofuranoside. *J Biol Chem.* 275, 24279–24283.
145. **Sarawut, J.**, John, W. 1999. Structure, function and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem. J.* 340, 1-16.
146. **Sarawut, J.**, Wallace, J.C. 2003. The Biotin Enzyme Family: Conserved Structural Motifs and Domain Rearrangements. *Current Protein and Peptide Science.* 4, 217-229.
147. **Scheerger, S.B.**, Zempleni, J. 2003. Expression of oncogenes depends on biotin in human small cell lung cancer cells NCI-H69. *Int J Vitam Nutr Res.* 73, 461-467.
148. **Seung-Soon, I.**, Linda, E., Hammond, I., Leyla, Y., Cherryl, Y., Nugas, S., Dong-Ju, S., Young-Kyo, S., Loren, G. Fong, U., Stephen, G., Young, A., Timothy, F. 2009. Sterol Regulatory Element Binding Protein 1a Regulates Hepatic Fatty Acid Partitioning by Activating Acetyl Coenzyme A Carboxylase 2. *Molecular and cellular biology.* 6, 4864–4872.
149. **Shang, J.**, Chen, L.L., Xiao, F., Sun, X.H., Ding, H.C., Xiao, H., 2008. Resveratrol improves non-alcoholic fatty liver disease by activating AMP-activated protein kinase. *Acta. Pharmacol. Sin.* 29, 698-706.
150. **Simon A.**, Fiona A., Cyrille C., Kevin A. G, Ashleigh, E., Sarah, F., Mhairi, C.T., Laura, J.B., Oluseye, A., Ogunbayo, A., Mark, E.D. Grahame H. 2010. Use of Cells Expressing g Subunit Variants to Identify Diverse Mechanisms of AMPK Activation. *Cell Metabolism.* 11; 554-565.

151. **Simon, E.**, kim, B., Morteza, P. 1996. Mammalian mitochondrial β -oxidation. *Biochem. J.* 320, 345-357.
152. **Solorzano-Vargas, S.**, Pacheco-Alvarez, D., León-Del-Río, A. 2002. Holocarboxylase synthetase is an obligate participant in biotin mediated regulation of its own expression and of biotin-depend carboxylases ARNm levels in human cells. *Proc Natl Acad Sci.* 99, 5325-5330.
153. **So-Young, Oh**, Sahng-Kyoo, P., Jae-Woo, K., Yong-Ho A., Sahng-Wook, P., Kyung-Sup, K. 2003. Acetyl-CoA Carboxylase Gene Is Regulated by Sterol Regulatory Element-binding Protein-1 in Liver. *The JouARNI of biological Chemistry.* 278, 28410–28417.
154. **Spence, J.T.**, Koudelka, A. P. 1984. Effects of biotin upon the intracellular level of GMPc and the activity of glucokinase in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem.* 259, 6393-6396.
155. **Stanley, J. S.**, Griffin, J. B., Zempleni, J. 2001. Biotinylation of histones in human cells: effects of cell proliferation. *Eur J Biochem.* 268, 5424-9.
156. **Steigerwal, R.**, Bohele, H. 1960. *InteARNt. Sympos. Drugs affecting lipid metab.* June 2-4; Milan, Italy. 484-486.
157. **Stockert, R. J.**, Morell, A. 1990. Second messenger modulation of the asialoglycoprotein receptor. *J Biol Chem.* 265, 1841-1846.
158. **Stockert, R.J.**, Ren, Q. 1997. Cytoplasmic protein ARNm interaction mediates GMPc-modulated translational control of the asialoglycoprotein receptor. *J Biol Chem.* 272, 9161-5.
159. **Suchy, S.F.**, Wolf, B. 1986. Effect of biotin deficiency and supplementation on lipid metabolism in rats: cholesterol and lipoproteins. *Am J Clin Nutr.* 43, 831-838.
160. **Sugita, Y.**, Shirakawa, H., Sugimoto, R., Furukawa, Y., Komai, M., 2008. Effect of biotin treatment on hepatic gene expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 1290-1298.
161. **Sun, L.P.**, Seemann, J., Goldstein, J.L., Brown, M.S. 2007. Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: Insig renders sorting signal in Scap inaccessible to COPII proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 6519–6526.
162. **Tanabe, T.**, Wada, K., Okazaki, T., Numa, S. 1975. Acetyl-coenzyme-A carboxylase from rat liver. Subunit structure and proteolytic modification. *Eur J Biochem.* 1, 15-24.
163. **Tavernier, G.**, Jiménez, M., Giacobino, J.P., Hulo, N., Lafontan, M., Muzzin, P., Langin, D. 2005. Norepinephrine induces lipolysis in beta1/beta2/beta3-adrenoceptor knockout mice. *Mol Pharmacol.* 68:793-799.
164. **Thomson, D.M.**, Winder, W.W. 2009. AMP-activated protein kinase control of fat metabolism in skeletal muscle. *Acta Physiol.* 196, 147–154.
165. **Tong, L.** 2005. Acetyl-coenzyme A carboxylase: crucial metabolic enzyme and attractive target for drug discovery. *Cell Mol Life Sci.* 62, 1784–1803.
166. **Velasco, G.**, Gomez del Pulgar, T., Carling, M., Guzmán, M. 1998. Evidence that the AMP-activated protein kinase stimulates rat liver carnitine palmitoyltransferase I by phosphorylating cytoskeletal components. *FEBS Lett.* 439, 317-320.
167. **Vesely, D.** 1982. Biotin enhances guanylate cyclase activity. *Science.* 216, 1329-30.
168. **Vilches-Flores, A.**, Tovar, A.R., Marin-HeARNdez, A., Rojas-Ochoa, A., FeARNdez-Mejia, C., 2010. Biotin increases glucokinase expression via soluble guanylate cyclase/protein

- kinase G, adenosine triphosphate production and autocrine action of insulin in pancreatic rat islets. *J. Nutr. Biochem.* 21, 606-612.
169. **Vosper, H.**, 2009. Niacin: a re-emerging pharmaceutical for the treatment of dyslipidaemia. *Br. J. Pharmacol.* 158, 429-441.
 170. **Wallace, J.C.**, Jitrapakdee, S., Chapman-Smith, A. 1998. Pyruvate carboxylase. *Int J Biochem Cell Biol.* 30, 1-5.
 171. **Watanabe-Kamiyama, M.**, Kamiyama, S., Horiuchi, K., Ohinata, K., Shirakawa, H., Furukawa, Y., Komai, M. 2008. Antihypertensive effect of biotin in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Br J Nutr.* 99, 756-763.
 172. **Wiedmann, S.**, Rodriguez-Melendez, R., Ortega-Cuellar, D., Zempleni, J. 2004. Clusters of biotin-responsive genes in human peripheral blood mononuclear cells. *J Nutr Biochem.* 15, 433-439.
 173. **Wolfrum, C.**, Stoffel, M. 2006. Coactivation of Foxa2 through Pgc-1beta promotes liver fatty acid oxidation and triglyceride/VLDL secretion. *Cell Metab.* 3, 99-110.
 174. **Woods, A.**, Azzout-ARNmiche, D., Foretz, M., Stein, S.C., Lemarchand, P., Ferre, P., Foufelle F., Carling, D., 2000. Characterization of the role of AMP-activated protein kinase in the regulation of glucose-activated gene expression using constitutively active and dominant negative forms of the kinase. *Mol. Cell. Biol.* 20, 6704-6711.
 175. **Yan-Dong, W.**, Wei-Dong, Ch., David, D. M., Wendong H. 2008. FXR: a metabolic regulator and cell protector. *Cell Research.* 18, 1087-1095.
 176. **Yan-Yun, Liu** and Gregory, A.B. 2010. Thyroid hormone crosstalk with nuclear receptor signaling in metabolic regulation. *Trends in Endocrinology and Metabolism.* 21 (3), 166-173.
 177. **Yong, S. C.**, Jae I., L., Dongkyu, S., Hyun, T., Ha Yun, J., Tae, G. L., Lin-Woo K., Yeh-Jin, A., Hyun-Soo, Ch, Yong-Seok, H. 2010. Molecular mechanism for the regulation of human ACC-2 through phosphorylation by AMPK. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 391, 187-192.
 178. **Young, M.E.**, Leighton, B. 1998. Fuel oxidation in skeletal muscle is increased by nitric oxide/GMPc evidence for involvement of GMPc-dependent protein kinase. *FEBS Lett.* 424, 79-83.
 179. **Zammit, V.A.** 1999. Carnitine acyltransferases: functional significance of subcellular distribution and membrane topology. *Progress in lipid research.* 38, 199-224.
 180. **Zempleni, J.** 2005. Uptake, localization, and noncarboxylase roles of biotin. *Annu Rev Nutr.* 25, 175-196.
 181. **Zempleni, J.**, Helm, R. M., Mock, D. M. 2001. *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.
 182. **Zhiyong, Ch.**, Morris, F., W. 2011. Targeting Forkhead Box O1 from the Concept to Metabolic Diseases: Lessons from Mouse Models. *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING.* 14 (4), 641-661.
 183. **Zhou, G.**, Myers, R. Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M.F., Goodyear L.J., Moller, D.E. 2001. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J. Clin. Invest.* 108, 1167-1174.

- 184. Zhou, G.,** Sebhat, I.K., Zhang, B.B., 2009. AMPK activators--potential therapeutics for metabolic and other diseases. *Acta. Physiol. (Oxf)*. 196, 175-190.

Research Communication

The hypotriglyceridemic effect of biotin supplementation involves increased levels of cGMP and AMPK activation

Asdrúbal Aguilera-Méndez^{1,2} and Cristina Fernández-Mejía^{1*}

¹Unidad de Genética de la Nutrición, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Pediatría, Av. del Iran # 1, CP 04530, México City, México

²Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad Universitaria, CP 58030 Morelia, Michoacan, México

Abstract.

In addition to its role as a carboxylase cofactor, biotin modifies gene expression and has manifold effects on systemic processes. Several studies have shown that biotin supplementation reduces hypertriglyceridemia. We have previously reported that this effect is related to decreased expression of lipogenic genes. In the present work, we analyzed signaling pathways and posttranscriptional mechanisms involved in the hypotriglyceridemic effects of biotin. Male BALB/cAnN Hsd mice were fed a control or a biotin-supplemented diet (1.76 or 97.7 mg of free biotin/kg diet, respectively) for 8 weeks after weaning. The abundance of mature sterol regulatory element-binding protein (SREBP-2c), fatty-acid synthase (FAS), total acetyl-CoA carboxylase-1 (ACC-1) and its phosphorylated form, and AMP-activated protein kinase (AMPK) were evaluated in the liver. We also determined the serum triglyceride concentrations and the

hepatic levels of triglycerides and cyclic GMP (cGMP). Compared to the control group, biotin-supplemented mice had lower serum and hepatic triglyceride concentrations. Biotin supplementation increased the levels of cGMP and the phosphorylated forms of AMPK and ACC-1 and decreased the abundance of the mature form of SREBP-2c and FAS. These data provide evidence that the mechanisms by which biotin supplementation reduces lipogenesis involve increased cGMP content and AMPK activation. In turn, these changes lead to augmented ACC-1 phosphorylation and decreased expression of both the mature form of SREBP-2c and FAS. Our results demonstrate for the first time that AMPK is involved in the effects of biotin supplementation and offer new insights into the mechanisms of biotin-mediated hypotriglyceridemic effects.

© 2012 International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Inc.
Volume 000, Number 000, Month 2012, Pages 000-000 •
E-mail: ciferme@biomedicas.unam.mx

Keywords: biotin, triglyceride, lipogenesis, AMPK, cGMP, signaling pathways

1. Introduction

Increasingly, vitamins are being recognized as mediators of gene expression [1,2] illuminating the connection between nutritional signals and biological functions. Well known examples include the lipophilic vitamins A and D, which act as ligands of nuclear hormone receptors that function as transcription factors [2]. As well, vitamin research has led to the use of vitamins or its derived compounds in the treatment of various diseases [3–5] including dyslipidemias [6]. Although less is known about

water-soluble vitamins as genetic modulators, evidence of their effects on gene expression is increasing.

The vitamin biotin acts as a covalently bound coenzyme of carboxylases. Unrelated to this role, biotin supplementation modifies gene expression [7,8] and has a wide repertoire of effects on systemic processes [9]. DNA microarray studies and high-throughput immunoblotting studies have aided in the identification of thousands of genes whose expression is modified by biotin at both the transcriptional and the posttranscriptional levels [10,11].

Several studies have shown that biotin supplementation reduces hyperlipidemia, a common and important risk factor both for atherosclerotic cardiovascular disease and for type-2 diabetes mellitus [12]. In healthy volunteers, 0.9 mg/day of biotin supplementation affected plasma lipid

*Address for correspondence: Cristina Fernández-Mejía, Av del Iran #1, 4th floor, México City, CP 04530, México, Tel: +5255 5606 35 58; Fax: +5255 56063489; E-mail: ciferme@biomedicas.unam.mx

Received 27 February 2012; accepted 22 May 2012

DOI: 10.1002/biof.1034

Published online 20 Month 2012 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

concentrations [13]. In patients with hyperlipidemia, Dokosova and Krivoruchenko [14] found that the administration of 5 mg of daily biotin for 4 weeks decreased hypercholesterolemia. Studies in our laboratory [15] revealed that 35 mg of biotin per day for 28 d decreased serum triglyceride and VLDL but not total cholesterol both in type 2 diabetic patients and in nondiabetic subjects with hypertriglyceridemia. Supplements containing supraphysiological amounts of biotin (2 mg/day) in combination with chromium picolinate (600 micrograms) produced significant reductions in serum triglycerides and in the ratio of low-density lipoprotein- to high-density lipoprotein-cholesterol [16,17].

In agreement with the hypotriglyceridemic effects of biotin observed in humans, biotin supplementation decreases serum triglyceride levels in experimental animals. In rats, biotin supplied in water (2 mg/rat) decreased the VLDL concentration in serum [18]. In normal mice, we found that eight weeks of a biotin-supplemented diet (a 56-fold increase in biotin concentration compared to control diet) decreased serum triglyceride concentrations by 35% [19].

Despite the effects of biotin on blood lipids and its use as a pharmacological agent, the molecular mechanisms by which biotin supplementation modifies lipid metabolism are largely unknown. In a recent study [19], we found that the hypotriglyceridemic effect of biotin is related to reduced levels of mRNA encoding *de novo* lipogenic genes. In the present work, we analyzed the signaling pathways and posttranscriptional mechanisms involved in the hypotriglyceridemic effects of biotin.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Reagents were obtained from the following sources: biotin-sufficient (TD-01362) and biotin-supplemented (TD-02458) diets from Harlan Teklad (Madison, WI); sevoflurane (Sevorane[®]) from Abbott Laboratories (Mexico DF, Mexico); protease inhibitor cocktail Complete Mini from Roche (Basel, Switzerland); sodium dodecyl sulfate, sodium pyrophosphate, sodium orthovanadate, sodium fluoride, Triton X-100, Tween 20, HEPES, KCl, EDTA, and EGTA was obtained from Sigma-Aldrich (San Louis, MO). Chemiluminescent HRP substrate from Millipore (Bedford, MA); antibodies antifatty acid synthase, anti-acetyl-CoA carboxylase-1, phospho-acetyl-CoA carboxylase-1 (Ser79) antibody, and anti-phospho-AMPK- α (Thr172) polyclonal antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). Antibodies: anti-SREBP-1c, bovine anti-rabbit IgG HRP, goat anti-mouse IgG HRP, α -tubulin antibody and BLOTTO non-fat dry milk from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); nitrocellulose membrane 0.45 mm and Bio-Rad protein assay from Bio-Rad (Hercules, CA); autoradiography films (Eastman Kodak, Rochester, NY).

2.2. Animals and experimental design

Mice were handled according to the standard procedures established by the Ethical Committee for Experimentation of the Biomedical Research Institute of the National University

of Mexico. Three-week-old weaned male Balb/cAnN Hsd mice were obtained from the breeding colony in local animal facilities. They were maintained under a 12:12 h light: dark cycle and were allowed to consume water and food *ad libitum* throughout the experiments. Two lots of 20 mice were divided into 2 experimental groups and fed 1 of the 2 alternative diets: biotin-sufficient (control) or biotin-supplemented, containing 1.76 mg and 97.7 mg of biotin/kg diet, respectively, for 8 weeks. Complete information on the diet composition has been published elsewhere [20]. Body weight and food intake were measured every week. After 8 weeks of *ad libitum* feeding, the mice were fasted for 16 h and anesthetized with Sevoflurane[®]. The blood for serum was obtained by cutting the tail and stored at 4°C. The liver was removed and placed in liquid nitrogen and stored at -70°C until utilization. Finally, mice were killed by cervical dislocation.

2.3. Serum triglyceride concentration analysis

Fasting serum triglyceride concentrations were determined spectrophotometrically with a commercial assay kit following the manufacturer's instructions (Spinreact, Sant Esteve de Bas, Spain). The detection range of the triglycerides was 0.7–1,000 mg/dL. The sensitivity of the triglyceride assay was 1 mg/dL. The intra-assay coefficient of variation was 0.43–0.60%, and the inter-assay coefficient of variation was 1.36–1.83%.

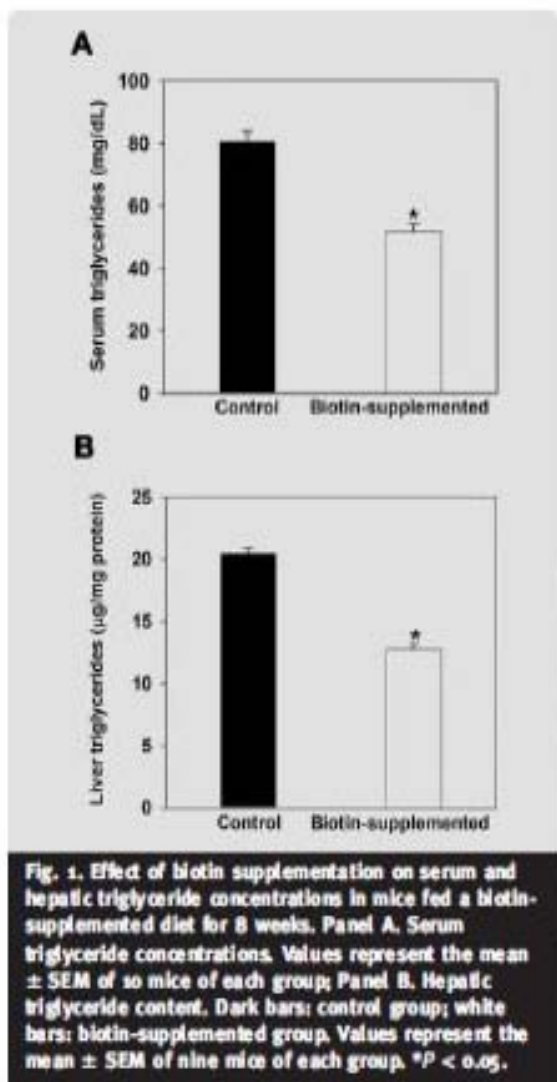
2.4. Liver triglyceride content

Total triglycerides were extracted from 100 mg of frozen liver. The samples were homogenized in 1 mL of solution containing 5% Triton-X100 in PBS buffer using a Polytron (Kinematic AG, Littau, Switzerland). Samples were subjected to water bath warming at 50–60°C for 2–5 min and cooled down slowly at room temperature. The heating/cooling procedure was repeated to solubilize the triglycerides. Samples were diluted 1:5 in distilled water and centrifuged for 15 min at top speed in a microcentrifuge. Triglyceride concentrations were determined from the supernatant by a colorimetric assay as described above.

2.5. Western blot analysis

The protein abundances of mature SREBP-1c, fatty acid synthase, (Thr172)-phosphorylated AMPK- α form, as well as the total form of acetyl-CoA carboxylase-1, and (Ser79)-phospho-acetyl-CoA carboxylase-1, a form known to be phosphorylated by AMPK, were determined by Western blot. Acetyl-CoA carboxylase-1 was analyzed in conditions in which the enzyme can be separated from acetyl-CoA carboxylase-2. The band corresponding to acetyl-CoA carboxylase-1 (265 kDa) was quantified.

Approximately 100 mg of liver was homogenized with a Potter homogenizer in ice-cold lysis buffer (50 mM HEPES, 50 mM KCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 2 mM sodium orthovanadate, 25 mM sodium fluoride, 5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM DTT, 0.1% TritonX-100 and a protease inhibitor cocktail Complete Mini). Tissue extracts were centrifuged at 14,000g for 15 min at 4°C to remove insoluble material, and



the protein concentration was measured by the Bio-Rad protein assay following the manufacturer's instructions. A total of 75 μ g of protein was loaded on each lane of an 8% SDS-PAGE gel in a Bio-Rad miniature slab gel apparatus. Electro-transfer of proteins from the gel to nitrocellulose membranes was performed for 1 h at 300 V (constant) using the Bio-Rad miniature transfer apparatus. Nonspecific binding was prevented by blocking with 5% dry milk in 0.1% TBS-T buffer for 1 h at room temperature. Blots were then incubated overnight at 4°C with the respective antibodies. The membranes were washed four times for 5 min each in 0.1% TBS-T buffer, incubated with bovine anti-rabbit IgG HRP in 0.1% TBS-T containing 5% fat free milk for 1 h at room temperature and then washed again as described above. Immunoreactive bands were visualized with the enhanced chemiluminescence detection system. Bands of all proteins were

detected using model Molecular Imager Chemidoc XRS System (Bio-Rad, Hercules, CA) or by autoradiography films. Band intensities were quantified by densitometry using Image J 1.40 (Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD).

2.6. cGMP level

We determined the hepatic intracellular cGMP concentrations with a competitive enzyme immunoassay kit chemiluminescent method. The analysis was performed following the manufacturer's instructions (Cyclic GMP chemiluminescent kit, B-Bridge International, CA). The concentration of cGMP in the sample was calculated after making suitable corrections for tissue protein concentrations.

2.7. Statistical analysis

The Statview statistical analysis program V4.5 (Abacus Concepts, Berkeley, CA) was used for statistical analysis. All data are presented as the mean \pm S.E.M.; n is the number of evaluated subjects. Statistical significance was assessed by Student's t test. P values of less than 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Food intake, body weight, and fasting blood glucose concentrations

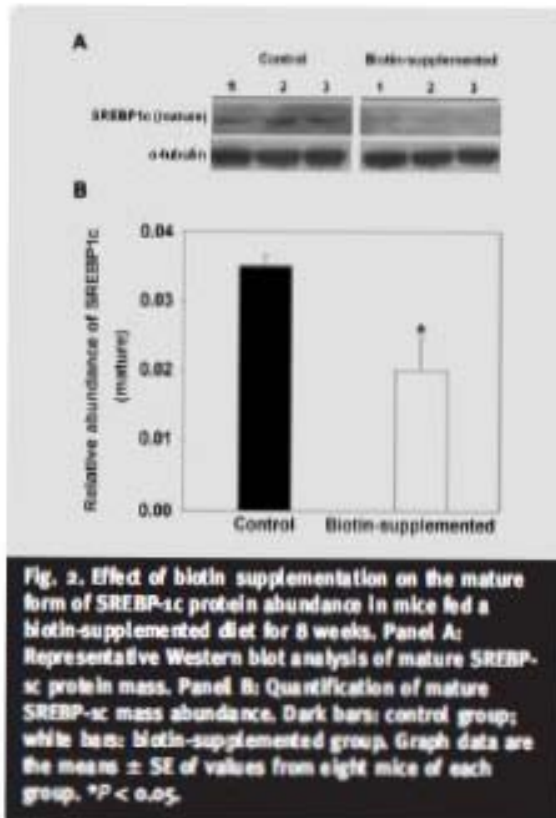
Over the 8 weeks of biotin supplementation, neither the body weight of the mice (Control: 22.6 ± 0.5 ; Supplemented: 22.5 ± 0.5 g) nor the average food intake (Control: 2.6 ± 0.12 ; Supplemented: 2.6 ± 0.08 g of food/mouse/day) were different between the groups. The daily ingestion of biotin was 0.2 ± 0.01 and 11.4 ± 0.5 mg of biotin/kg body weight/day in the control and supplemented groups, respectively. No changes in fasting blood glucose were observed between the groups (Control: 82.6 ± 3.3 ; Supplemented: 81.6 ± 3.0 mg/dL).

3.2. Serum and hepatic triglyceride concentrations

In agreement with our previous report [9], we found that after eight weeks of biotin supplementation, the serum triglyceride concentrations were significantly lower than in the control group (Control: 81.2 ± 1.2 ; Supplemented: 52.09 ± 1.0 mg/dL; $P < 0.05$) (Fig. 1, panel A). We also determine intra-hepatic triglyceride content. The data (Fig. 1, panel B) revealed that, similar to the decrease produced in serum, the livers of mice fed the biotin-supplemented diet presented reduced triglyceride concentrations compared with those of the control group (Control: 20.5 ± 0.6 ; Supplemented: 12.9 ± 0.5 μ g/mg protein, respectively, $P < 0.05$).

3.3. SREBP-1c protein abundance

In our previous studies, we demonstrated that biotin-supplementation reduced the mRNA abundance of the lipogenic



transcription factor SREBP-1c [19]. Because this protein requires a posttranslational modification to become its mature transcriptional nuclear form [21], we investigated the effect of biotin supplementation on the levels of the mature form of SREBP-1c. The results showed an approximately 40% reduction in mature SREBP-1c protein abundance ($P < 0.05$) (Fig. 2).

3.4. Fatty acid synthase protein abundance

We also evaluated the protein mass of fatty acid synthase, an enzyme whose activity is closely related to the rate of fatty acid synthesis [21]. After eight weeks of biotin supplementation, there was a profound reduction in fatty acid synthase protein expression (Fig. 3).

3.5. Acetyl-CoA carboxylase-1 phosphorylated and total protein mass

Acetyl-CoA carboxylase-1 phosphorylation plays a critical step in lipogenesis. The phosphorylated enzyme is inactive, whereas dephosphorylation activates the enzyme [22]. To evaluate the effects of biotin supplementation at the post-translational level, we quantified phosphorylated acetyl-CoA carboxylase-1 and total protein mass from control and biotin-supplemented mice. Biotin supplementation increased the level of phosphorylation of Ser79 of acetyl-CoA carboxylase-1 (Control: 0.29 ± 0.06 ; Supplemented: 0.65 ± 0.05 ;

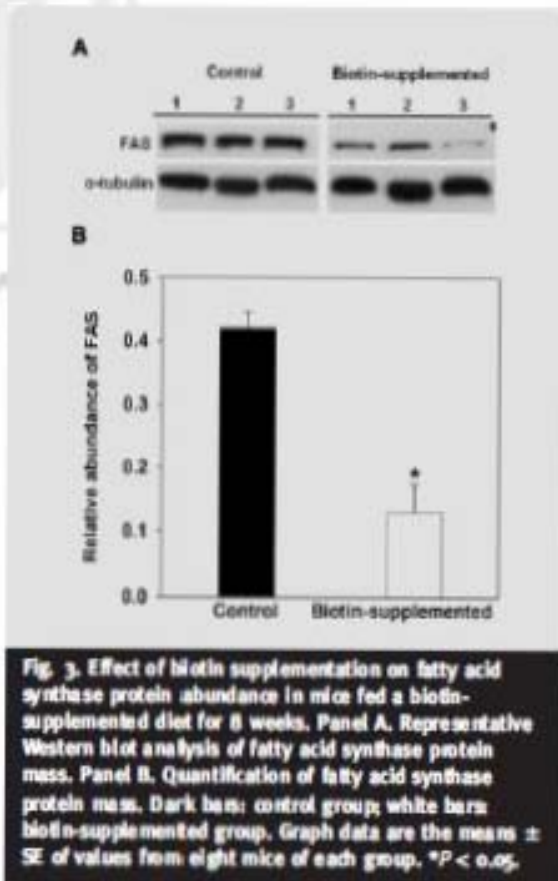
$P < 0.05$) (Fig. 4, panel B), but did not modify the total amount of acetyl-CoA carboxylase-1 (Control: 0.13 ± 0.02 ; Supplemented: 0.13 ± 0.02) (Fig. 4, panel A).

3.6. AMPK expression

To ascertain whether the increase in acetyl-CoA carboxylase-1 phosphorylation in mice fed with a biotin-supplemented diet resulted from AMPK signaling transduction, a pathway whose activation in the liver results in reduced synthesis of lipids [23], we analyzed the level of Thr172-phosphorylated AMPK-alpha subunit. Biotin supplementation increased phosphorylated AMPK-alpha by ~40% compared with the control group (Fig. 5).

3.7. Cyclic GMP content

Cyclic GMP mediates several effects of biotin [24-27]. Therefore, we determined the involvement of this second messenger on the hypotriglyceridemic effects of the vitamin. Our results showed that the livers from the biotin-supplemented mice had higher cGMP content than those of the control mice (Control: 10.3 ± 0.34 ; Supplemented: 14.3 ± 0.73 pmol/mg protein; $P < 0.05$) (Fig. 6).



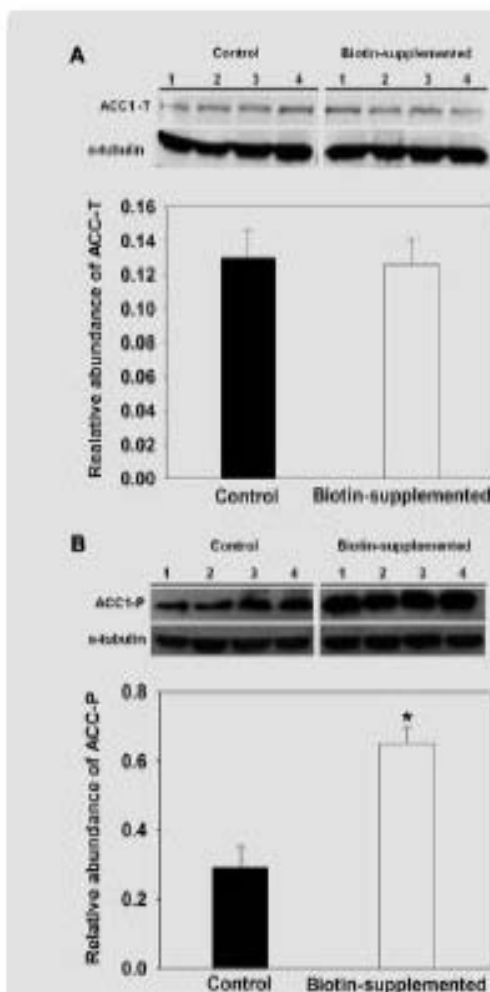


Fig. 4. Effect of biotin supplementation on phosphorylated and total phosphorylated acetyl-CoA carboxylase-1 protein abundance in mice fed a biotin-supplemented diet for 8 weeks. Panel A top, Representative Western blot analysis of total acetyl-CoA carboxylase-1; Panel A bottom, Quantification of total acetyl-CoA carboxylase-1. Panel B top, Representative Western blot analysis of phosphorylated acetyl-CoA carboxylase-1. Panel B bottom, Quantification of phosphorylated acetyl-CoA carboxylase-1. Dark bars: control group; white bars: biotin-supplemented group. Graph data are the means \pm SE of values from eight mice of each group. * $P < 0.05$.

4. Discussion

Several studies have shown that biotin supplementation decreases serum lipid concentrations [13–15,28]. In a previous study [19] we found that the hypotriglyceridemic effect

of biotin was linked to reductions in the mRNA abundance of lipogenic enzymes and transcription factors. In the current study, we examined posttranscriptional mechanisms and signaling pathways that are involved in the hypotriglyceridemic effects of biotin. We found that biotin supplementation decreases serum and hepatic triglyceride concentrations by a mechanism involving cGMP/AMPK activation.

Our studies revealed that 8 weeks of biotin supplementation in the diet increased the levels of the active form of AMPK. In accord with this effect, the amount of the mature form of SREBP-1c was decreased and the phosphorylated form of acetyl-CoA carboxylase-1 increased. In addition, in line with the diminished levels of the mature form of SREBP-1c, we observed decreased fatty acid synthase protein mass and, as shown in our previous report [19], reduced fatty acid synthase mRNA expression.

We found that biotin supplementation produced changes in critical lipogenic regulation steps such as acetyl-CoA carboxylase phosphorylation. This process controls the activity of the enzyme. The phosphorylated form of acetyl-CoA carboxylase-1 is inactive, whereas dephosphorylation activates the enzyme [22]. Inactivation of acetyl-CoA carboxylase-1 leads to a fall in malonyl-CoA content and a subsequent decrease in fatty acid synthesis. This study revealed

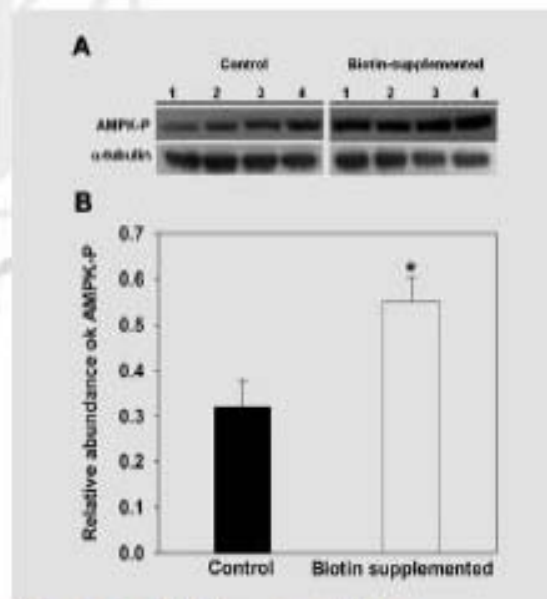


Fig. 5. Effect of biotin supplementation on phosphorylated AMPK protein abundance in mice fed a biotin-supplemented diet for 8 weeks. Panel A, Representative Western blot analysis of AMPK phosphorylated form. Panel B, Quantification of phosphorylated AMPK. Dark bars: control group; white bars: biotin-supplemented group. Graph data are the means \pm SE of values from eight mice of each group. * $P < 0.05$.

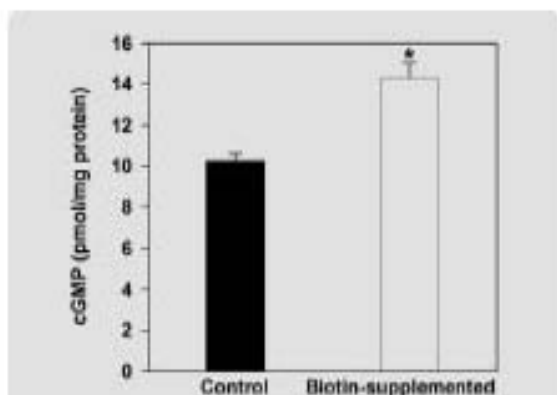


Fig. 6. Effect of biotin supplementation on cGMP concentrations in mice fed a biotin-supplemented diet for 8 weeks. Dark bars: control group; white bars: biotin-supplemented group. Graph data are the means \pm SE of values from nine mice of each group. * $P < 0.05$.

that biotin supplementation increased the levels of the acetyl-CoA carboxylase-1 phosphorylated form but did not change the total amount of acetyl-CoA carboxylase-1 protein. These results are not in keeping with the decreased mRNA abundance of acetyl-CoA carboxylase-1 observed in our previous studies [29]. This discrepancy could be explained in view of the fact that high-throughput immunoblotting studies [10] have found that the abundance of selected proteins was not paralleled by the abundance of their mRNA. As well, in the case of pyruvate carboxylase, evidence exists that biotin regulates its apoenzyme expression at the posttranscriptional level, influencing both protein synthesis and degradation [29]. Taken together, our observations suggest that biotin-based posttranscriptional effects might also occur in acetyl-CoA carboxylase-1.

While studies have consistently found that activation of the guanylate cyclase/PKG phosphorylation cascade is part of the signaling involved in the biotin response [24–27], the cGMP/PKG target proteins that mediate the effects of biotin have been poorly investigated. In a model of biotin depletion-replenishment in the HepG2 hepatoblastoma cell line, De la Vega and Stockert [24] have observed that biotin acts via soluble guanylate cyclase activity and PKG to increase the phosphorylation of alpha-COP, a protein of the COP1 transacting complex factor that regulates translation and participates in the translation of the asialoglycoprotein receptor and insulin-receptor. The present study found that the effects of biotin supplementation involve cGMP and protein phosphorylation and identified phosphorylated AMPK as a protein participating in these effects. In support of our *in vivo* findings, recent studies [30,31] have found that the cGMP/PKG-signaling pathway acts as an upstream activator of AMPK. A study by Deshmukh et al. [30] found that increased cGMP levels promote glucose transport concomitantly with AMPK activation in skeletal muscle strips and in

L6 muscle cell line and that these effects were prevented in the presence of a guanylate cyclase inhibitor. In the desert snail *Otala lactea*, experiments inhibiting soluble guanylate cyclase demonstrated that the cGMP/PKG signaling pathway is an important regulator of AMPK activity [31]. Given the complexity to demonstrate signaling pathways *in vivo*, our study represents a first approach indicating the role of biotin induced cGMP on AMPK activity in the liver. Studies to tackle this issue are currently performed in our laboratory.

The present findings showing that AMPK activation is involved in the effects of biotin supplementation are in agreement with the reported metabolic effects of the pharmacological concentrations of the vitamin. Similar to the hypolipidemic effects of biotin [28,34,35], AMPK activation results in reduced plasma triglycerides [32] and cholesterol [33] and the reduced mRNA expression of lipogenic genes such as fatty acid synthase, L-pyruvate kinase and acetyl-CoA carboxylase-1 [34,32]. In addition, several similarities to gluconeogenesis exist between the effects of biotin and AMPK activation. Reduced mRNA expression of genes such as phosphoenolpyruvate carboxykinase, glucose-6-phosphatase, hepatocyte nuclear factor-4 and FoxO-1 are found in response to both AMPK activators [35] and to biotin [36,37]. Further, in pancreatic rat islets, we found that the induction of pancreatic glucokinase mRNA by biotin involves guanylate cyclase and PKG activation, which leads to an increase in ATP content [38]. The role of AMPK in this study was not assessed; however, increases in ATP produced by biotin appear to be incompatible with AMPK activation. Nevertheless, in pancreatic-beta-cells, AMPK activity exerts distinct effects on metabolism and is somewhat differentially regulated compared with other tissues and, as observed in response to cell depolarization with potassium chloride, can be activated in spite of increased levels of intracellular ATP [39].

It is interesting to note that, similar to the hypotriglyceridemic effects of biotin supplementation, AMPK activation is induced by numerous agents that reduce serum triglycerides, such as metformin [32], berberine [40], troglitazone [41], and resveratrol [42]. The data in the present study, showing that biotin decreases serum and hepatic triglyceride concentrations by a mechanism involving cGMP/AMPK activation, provide new insights into the signaling pathways that mediate the effects of biotin on lipid metabolism and support its use in the treatment of hypertriglyceridemia. The concept that a vitamin can be used as an agent to reduce hyperlipidemia is not new. Indeed, another vitamin from the B complex, namely niacin, has been used for more than fifty years as a lipid-lowering drug [6]. Our present findings offer novel knowledge of the molecular mechanism of biotin supplementation and this research may lead to new strategies in the development of therapeutic agents.

In conclusion, our data indicate that biotin supplementation decreases serum and hepatic triglyceride concentrations by a mechanism involving increased cGMP concentrations and AMPK activation. This leads to augmented acetyl-CoA carboxylase-1 phosphorylation and decreased levels of the mature form of SREBP-1c, which in turn diminishes fatty

acid synthase expression. This work demonstrates for the first time that AMPK is involved in the effects of biotin supplementation.

Acknowledgements

The authors are grateful to Alberto Rojas-Ochoa and Lilian Esparza-Rosales for technical assistance; Dr. Enrique Piña Garza, Armando R. Tovar and Karla Carvajal for valuable discussions throughout these studies. Supported by research grant from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 44266-M, the Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México IN22908 and IN23481. Asdrubal Aguilera is recipient of the CONACYT and PROMEP scholarship number CVU/Becario 95634 and UMSNH-208 respectively. They acknowledge that the authors Asdrubal Aguilera-Méndez and Crisina Fernandez-Mejía have no financial interest or other contractual agreements that might cause conflicts of interest or be perceived as causing conflicts of interest in any company or organization sponsoring the research.

References

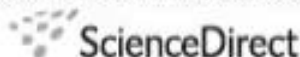
- [1] Carlberg, C. (1999) Lipid soluble vitamins in gene regulation. *Biofactors*, **10**, 91-97.
- [2] Margolis, D. J. and Evans, R. M. (1995) The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell*, **83**, 841-850.
- [3] Hinds, T. S., West, W. L., and Knight, E. M. (1997) Cortenoids and retinoids: a review of research, clinical, and public health applications. *J. Clin. Pharmacol.*, **37**, 551-558.
- [4] Liu, Y. L., Smith, M. V., Hilbig, D. C., Cronbie, D. L., Heyman, R. A., et al. (2004) Retinoid X receptor agonists have anti-obesity effects and improve insulin sensitivity in Zucker fa/fa rats. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, **28**, 997-1004.
- [5] Passaga, E., Noroel, J. C., Neadó-Raiszínies, P., Sangradico, V., Plant, J., et al. (2004) Ascorbic acid treatment corrects the phenotype of a mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat. Med.*, **10**, 396-401.
- [6] Vesper, H. (2009) Niasin: a re-emerging pharmaceutical for the treatment of dyslipidaemia. *Br. J. Pharmacol.*, **158**, 439-441.
- [7] Rodríguez-Meléndez, R. and Zempleni, J. (2009) Regulation of gene expression by biotin. *J. Nutr. Biochem.*, **20**, 680-690.
- [8] Zempleni, J. (2005) Uptake, localization, and noncarboxylase roles of biotin. *Annu. Rev. Nutr.*, **25**, 175-196.
- [9] Fernandez-Mejía, C. and Lazo de la Vega-Monroy M. L. (2011) Biological effects of pharmacological concentrations of biotin. *J. Endin. Bas. Compl. Alter. Méd.*, **46**, 40-48.
- [10] Rodríguez-Meléndez, R., Griffin, J. B., Smith, G., and Zempleni, J. (2006) High throughput immunoblotting identifies biotin-dependent signaling proteins in HepG2 hepatocarcinoma cells. *J. Nutr.*, **135**, 1559-1564.
- [11] Wisdmann, S., Rodríguez-Meléndez, R., Ortega-Cuellar, D., and Zempleni, J. (2004) Clusters of biotin-responsive genes in human peripheral blood mononuclear cells. *J. Nutr. Biochem.*, **15**, 433-439.
- [12] Rudman, N., Shalman, G. L. in *DeGroot, L. J., and Jameson, J. L., eds. (2006) Endocrinology, Saunders/ Philadelphia*, pp. 149-161.
- [13] Marshall, M. W., Kliman, P. G., Washington, V. A., Machin, J. E., and Weinfeld, B. T. (1984) Effects of biotin on lipids and other constituents of plasma of healthy men and women. *Artery*, **7**, 330-351.
- [14] Dolusova, O. K. and Kloverachenko, I. V. (1972) The effect of biotin on the level of cholesterol in the blood of patients with atherosclerosis and essential hyperlipidemia. *Kardiológia*, **12**, 113.

- [15] Sevilla-Monsalvo, C., Zendejas-Ruiz, I., Iñás-Andrade, S., Baez-Saldana, A., Palomino-Garbay, M. A., et al. (2006) Biotin supplementation reduces plasma triacylglycerol and VLDL in type 2 diabetic patients and in nondiabetic subjects with hypertriglyceridemia. *Bioméd. Pharmacother.*, **60**, 182-185.
- [16] Albaroch, C., Fajua, B., Goñaz, J., Jituru, V., Fitch, M. R., et al. (2007) Combination of chromium and biotin improves coronary risk factors in hypercholesterolemic type 2 diabetes mellitus: a placebo-controlled, double-blind randomized clinical trial. *J. Cardiovasc. Syndr.*, **2**, 91-97.
- [17] Goñaz, J., Daly, A., Jituru, V., Fitch, M., and Komarowski, J. R. (2007) Chromium picolinate and biotin combination reduces atherogenic index of plasma in patients with type 2 diabetes mellitus: a placebo-controlled, double-blinded, randomized clinical trial. *Am. J. Med. Sci.*, **333**, 145-153.
- [18] Suchy, S. E. and Wolf, B. (1986) Effect of biotin deficiency and supplementation on lipid metabolism in rats: cholesterol and lipoproteins. *Am. J. Clin. Nutr.*, **43**, 891-898.
- [19] Lamata, E., Velasco, F., Vilal, P., Lopez-Aceves, T., Lazo-de-la-Vega-Monroy, M. L., et al. (2010) Pharmacological concentrations of biotin reduce serum triglycerides and the expression of lipogenic genes. *Eur. J. Pharmacol.*, **644**, 263-268.
- [20] Baez-Saldana, A. and Ortega, E. (2004) Biotin deficiency blocks thymocyte maturation, accelerates thymus involution, and decreases nose-rump length in mice. *J. Nutr.*, **134**, 1970-1977.
- [21] Horton, J. D., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (2002) SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.*, **109**, 1125-1131.
- [22] Ha, J. S., Daniel, S., Broyles, S., and Kim, K. H. (1994) Critical phosphorylation sites for acetyl-CoA carboxylase activity. *J. Biol. Chem.*, **269**, 22162-22168.
- [23] Viollet, B., Guigas, B., Leclerc, J., Hébraud, S., Larsson, L., et al. (2009) AMP-activated protein kinase in the regulation of hepatic energy metabolism: from physiology to therapeutic perspectives. *Acta Physiol.*, **196**, 81-98.
- [24] De La Vega, L. A. and Stockert, R. J. (2004) Regulation of the insulin and asialoglycoprotein receptors via cGMP-dependent protein kinase. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **297**, C207-C212.
- [25] Solórzano-Vargas, E. S., Pacheco-Avarez, D., and Leon-Del-Río, A. (2002) Holocarboxylase synthetase is an obligate participant in biotin-mediated regulation of its own expression and of biotin-dependent carboxylase mRNA levels in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 5325-5330.
- [26] Stockert, R. J. and Morell, A. G. (1990) Second messenger modulation of the asialoglycoprotein receptor. *J. Biol. Chem.*, **265**, 8141-8146.
- [27] Stockert, R. J., Palitta, E., Rivasolis, J., and Morell, A. G. (1992) Post-transcriptional regulation of the asialoglycoprotein receptor by cGMP. *J. Biol. Chem.*, **267**, 56-59.
- [28] Dolusova, O. K. and Klimov, A. N. (1967) Prevention of the development of experimental atherosclerosis by biotin. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **178**, 1451-1456.
- [29] Rodríguez-Fuentes, M., Lopez-Rosas, I., Roman-Cabrera, G., and Márquez-Anllano, A. (2007) Biotin deficiency affects both synthesis and degradation of pyruvate carboxylase in rat primary hepatocyte cultures. *Mol. Genet. Metab.*, **92**, 222-228.
- [30] Dzhemkhi, A. S., Long, Y. C., de Castro Barbosa, T., Karlsson, H. K., Glund, S., et al. (2010) Nitric oxide increases cyclic GMP levels, AMP-activated protein kinase (AMPK)alpha-specific activity and glucose transport in human skeletal muscle. *Diabetologia*, **53**, 1442-1450.
- [31] Ramananan, C. J., McMullen, D. C., Groom, A. G., Stony, K. B. (2010) The regulation of AMPK signaling in a natural state of profound metabolic rate depression. *Mol. Cell Biochem.*, **335**, 91-105.
- [32] Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., et al. (2004) Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J. Clin. Invest.*, **114**, 1167-1174.
- [33] Zhou, G., Selvaraj, L. K., and Zhang, B. B. (2009) AMPK activators-potential therapeutics for metabolic and other diseases. *Acta Physiol.*, **196**, 175-190.
- [34] Woods, A., Azzout-Mamiche, D., Fontz, M., Stein, S. C., Lamarchand, P., et al. (2006) Characterization of the role of AMP-activated protein

- kinase in the regulation of glucose-activated gene expression using constitutively active and dominant negative forms of the kinase. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 6704-6711.
- [35] Loff, T. (2003) AMP-activated protein kinase regulates gene expression by direct phosphorylation of nuclear proteins. *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 224-227.
- [36] Dakshinamurti, K. and Li, W. (1994) Transcriptional regulation of liver phosphoenolpyruvate carboxylase by biotin in diabetic rats. *Mol. Cell. Biochem.* **132**, 127-132.
- [37] Sugita, Y., Shinokawa, H., Sugimoto, K., Fushikawa, Y., and Komai, M. (2008) Effect of biotin treatment on hepatic gene expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *BioSci. Biotechnol. Biochem.* **74**, 1290-1298.
- [38] Vilches-Foxos, A., Tovar, A. E., Madro-Hernandez, A., Rojas-Ochoa, A., and Fernandez-Morja, C. (2011) Biotin increases glucokinase expression via soluble guanylate cyclase/protein kinase G, adenosine triphosphate production and autocrine action of insulin in pancreatic rat islets. *J. Nutr. Biochem.* **22**, 606-612.
- [39] Lichten, I. and Rutter, G. A. (2004) AMP-activated protein kinase: a new beta-cell glucose sensor? Regulation by amino acids and calcium ions. *Diabetes* **53**, 567-574.
- [40] Kim, W. S., Lee, Y. S., Cha, S. H., Jeong, H. W., Cho, S. S., Lee M. R., Oh, G. T., Park, H. S., Lee, K. U., Lee M. D., and Kim, J. B. (2009) Berberine improves lipid dysregulation in obesity by controlling central and peripheral AMPK activity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **296**, E822-E829.
- [41] Hardie, D. G. (2011) AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev.* **25**, 1895-1908.
- [42] Shang, J., Chen, L. L., Xiao, E., Sun, X. H., Ding, H. C., et al. (2008) Rosuvastatin improves non-alcoholic fatty liver disease by activating AMP-activated protein kinase. *Acta Pharmacol. Sin.* **29**, 698-706.



Author Proof

Available online at www.sciencedirect.com

Journal of Nutritional Biochemistry xx (2011) xxx–xxx

**Journal of
Nutritional
Biochemistry**

Effects of biotin deficiency on pancreatic islet morphology, insulin sensitivity and glucose homeostasis^{1,2}

Elena Larrieta^a, María Luisa Lazo de la Vega-Monroy^a, Paz Vital^a, Asdrubal Aguilera^{a,3}, Michael S. German^c, Mohammed El Hafidi^d, Cristina Fernandez-Mejia^{a,*}

^aUnidad de Genética de la Nutrición, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México/Instituto Nacional de Pediatría, México

^bUniversidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México

^cCenter of Regeneration Medicine and Stem Cell Research, University of California, San Francisco, CA, USA

^dDepartamento de Biomedicina Cardiovascular, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, México

Received 12 January 2010; received in revised form 4 September 2010; accepted 6 January 2011

Abstract

Several studies have revealed that physiological concentrations of biotin are required for the normal expression of critical carbohydrate metabolism genes and for glucose homeostasis. However, the different experimental models used in these studies make it difficult to integrate the effects of biotin deficiency on glucose metabolism. To further investigate the effects of biotin deficiency on glucose metabolism, we presently analyzed the effect of biotin deprivation on glucose homeostasis and on pancreatic islet morphology. Three-week-old male BALB/cA/N Fed mice were fed a biotin-deficient or a biotin-control diet (0 or 7.2 μmol of free biotin/kg diet, respectively) over a period of 8 weeks. We found that biotin deprivation caused reduced concentrations of blood glucose and serum insulin concentrations, but increased plasma glucagon levels. Biotin-deficient mice also presented impaired glucose and insulin tolerance tests, indicating defects in insulin sensitivity. Altered insulin signaling was linked to a decrease in phosphorylated Akt/PKB but induced no change in insulin receptor abundance. Islet morphology studies revealed disruption of islet architecture due to biotin deficiency, and an increase in the number of α-cells in the islet core. Morphometric analyses found increased islet size, number of islets and glucagon-positive area, but a decreased insulin-positive area, in the biotin-deficient group. Glucagon secretion and gene expression increased in islets isolated from biotin-deficient mice. Our results suggest that biotin deficiency promotes hyperglycemic mechanisms such as increased glucagon concentration and decreased insulin secretion and sensitivity to compensate for reduced blood glucose concentrations. Variations in glucose homeostasis may participate in the changes observed in pancreatic islets.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Biotin deficiency; Glucose homeostasis; Islet; Glucagon

1. Introduction

Biotin is a water-soluble vitamin that acts as a prosthetic group in carboxylases, which catalyze steps along various biochemical pathways. Unrelated to this role, several lines of evidence indicate that biotin also regulates gene expression and has a wide repertoire of effects on systemic processes [1–3].

Pioneer studies in biotin-deficient rats led to the discovery of the influence of biotin requirements on gene expression. Since then, biotin deficiency has been a useful tool to unravel the role of biotin deficiency on gene expression and biological functions, such as growth [4–6], immunity [5,7] and reproduction [8,9], as well as its role in carboxylase gene expression [10,11]. In cultured cells, biotin deficiency experiments have shed light on the biotin-signaling pathway [12–18]. The far-reaching effects of biotin deficiency on gene expression have been examined by microarray analysis, which has revealed that thousands of genes are modified in response to this deficiency [19].

Several studies have shown that adequate biotin intake is required to maintain normal glucose metabolism [20–25]. Pioneer studies by Dakshinamurti et al. [20] reported that glucose tolerance test curves of biotin-deficient rats were significantly higher than the curves of nondeficient rats. They further demonstrated that this effect was the result of a reduction in hepatic glucokinase activity [21], a critical enzyme in the regulation of glucose uptake in the liver. Later, with the arrival of molecular biology techniques, Chauhan and Dakshinamurti [22]

^{*} Supported by research grants from UCMexUS CN007-87, the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 44296-A, the Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México IN221908, María Luisa Lazo de la Vega and Asdrubal Aguilera are recipients of the CONACYT scholarship number CVU/Becaño: 217876,207055 and 91634, respectively. Elena Larrieta was a postdoctoral fellow from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México.

^{*} Corresponding author. Mexico City, CP 04530 Mexico. Tel.: +52 55 96063558; fax: +52 55 56063489.

E-mail address: cfm@biomedica.unam.mx (C. Fernandez-Mejia).

CHAPTER 7

The Chemistry and Biochemistry of Niacin (B₃)

ASDRUBAL AGUILERA-MÉNDEZ,^a CYNTHIA FERNÁNDEZ-LAINEZ,^b ISABEL IBARRA-GONZÁLEZ^c AND CRISTINA FERNANDEZ-MEJIA*^c

^aUniversidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad Universitaria, CP 58030 Morelia, Michoacan, Mexico; ^bLaboratorio de Errores Innatos del Metabolismo y Tamiz, Instituto Nacional de Pediatría, Av. del Iman #1, 9th floor, Mexico City, CP 04530, Mexico; ^cUnidad de Genética de la Nutrición, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México/Instituto Nacional de Pediatría, Av. del Iman #1, 9th floor, Mexico City, CP 04530, Mexico

*Email: crisfern@biomedicas.unam.mx

7.1 Introduction

Niacin, also known as vitamin B₃, nicotinic acid or vitamin PP, is a water-soluble B-complex vitamin (Table 7.1). This vitamin is the generic descriptor for two vitamers: niacin and niacinamide. In the research literature the terms nicotinic acid/nicotinamide are most commonly used, while in medical practice niacin/niacinamide are preferred. The vitamin is obtained from the diet in the form of nicotinic acid, nicotinamide and tryptophan, which are transformed to nicotinamide adenine dinucleotides, NAD and NADP. These compounds participate in cellular oxidation–reduction reactions that are critical for energy production. NAD and NADP also participate in a wide variety of

Food and Nutritional Components in Focus No. 4

B Vitamins and Folate: Chemistry, Analysis, Function and Effects

Edited by Victor R. Preedy

© The Royal Society of Chemistry 2013

Published by the Royal Society of Chemistry, www.rsc.org