



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**EFFECTO DE LA BIOTINA SOBRE EL METABOLISMO DE LÍPIDOS EN EL
TEJIDO ADIPOSEO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. C. VÍCTOR DANIEL BOONE VILLA

DRA. MARÍA CRISTINA FERNÁNDEZ MEJÍA
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

DR. ENRIQUE PIÑA GARZA
Facultad de Medicina, UNAM

DR. JESÚS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Ciudad de México, Mayo, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se efectuó en la Unidad de Genética de la Nutrición del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México/ Instituto Nacional de Pediatría.

Proyecto CONACyT 99294

Proyecto PAPIIT IN Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM. IN214811

Beca doctoral CONACYT 171109

Beca Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal BI12-079

Se agradece al Programa de Apoyo para Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo para asistir al XXIX Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica realizado en la ciudad de Oaxaca, Oaxaca en el mes de noviembre del 2012.

Índice.

Resumen	1
Abstract	3
1. Introducción	5
1.1 La Biotina	5
1.1.1 Carboxilasas Dependientes de Biotina.	8
1.2. Acciones Farmacológicas de la Biotina y la Expresión Génica	12
1.2.1. Mecanismos de Acción de la Biotina en la Regulación Genética.	14
1.2.1.1. Biotinilación de Histonas.	14
1.2.1.2. Vía de Señalización de la Guanilato Ciclasa soluble/Proteína Cinasa G.	15
1.3. Efectos de la Biotina en el Metabolismo de los Lípidos.	17
1.4. Toxicidad de la biotina.	18
1.5. El Tejido Adiposo Blanco.	21
1.5.1. Metabolismo de Lípidos en el Tejido Adiposo.	22
1.5.1.1. Lipogénesis.	22
1.5.1.2. Síntesis de Triglicéridos.	23
1.5.1.3. Lipólisis.	24
1.5.1.4. Oxidación de Ácidos Grasos.	29
1.5.1.5. Regulación del Metabolismo de Lípidos.	30
2. Justificación.	34
3. Hipótesis.	35
4. Objetivo General.	35
5. Objetivos Particulares.	36
6. Materiales.	37
6.1 Dietas de alimentación para ratones.	37
6.2 Reactivos y Soluciones.	37
7. Metodología.	39
7.1 Modelo Experimental.	39

7.2 Cuantificación de Proteínas.	39
7.3 Análisis de Proteínas por Western Blot.	40
7.4 Cuantificación del Contenido de GMPc en el Tejido Adiposo	41
7.5 Cuantificación de la Actividad Lipolítica.	41
7.5.1 Aislamiento de Adipocitos	42
7.5.2 Incubación Lipolítica y Cuantificación de Glicerol.	43
7.6 Análisis Estadístico.	44
8. Resultados.	44
8.1 Contenido de GMPc en Tejido Adiposo Epididimal	44
8.2 Análisis de Proteínas por Western Blot	45
8.2.1 AMPK	45
8.2.2 Acetil-CoA carboxilasa-1 fosforilada.	46
8.2.3 Acetil-CoA carboxilasa-2 fosforilada	47
8.3 Lipólisis.	48
9. Discusión.	50
10. Conclusiones.	56
11. Perspectivas.	57
12. Bibliografía.	59
13. Anexo I (Artículo publicado)	84
14. Anexo II (Otras publicaciones)	91

Índice de Figuras.

Figura 1. Estructura química de la biotina.	5
Figura 2. Estructura química de la biocitina.	6
Figura 3. Actividad bioquímica de las carboxilasas dependientes de biotina.	9
Figura 4. Funciones de las carboxilasas dependientes de biotina en mamíferos.	12
Figura 5. Mecanismo de acción de la biotina por la vía de señalización de Guanilato Ciclasa soluble/PKG.	16
Figura 6.- Control de la lipólisis en los adipocitos humanos	28
Figura 7. Contenido de GMPc en el tejido adiposo epididimal de ratones	44
Figura 8. Análisis de AMPK-P por Western Blot.	45
Figura 9. Análisis de ACC1-P por Western Blot.	46
Figura 10. Análisis de ACC2-P por Western Blot.	47
Figura 11. Lipólisis en el Tejido Adiposo Epididimal.	48
Figura 12. Diagrama General de la influencia de la suplementación con biotina sobre las distintas rutas metabólicas de los lípidos en el tejido adiposo de ratones sanos.	55

Índice de Tablas.

Tabla 1. Composición de la solución Ringer-Krebs	42
Tabla 2. Composición de mezcla de reacción para la determinación colorimétrica indirecta de glicerol.	43

Abreviatura	Significado
°C	Grados Celsius
AC	Adenilato Ciclasa
ACC	Acetil CoA Carboxilasa
AG	Ácidos Grasos
AGNE	Ácidos Grasos No Esterificados
AICAR	5-Aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotido (5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide)
ALBP	Proteínas Enlazante de Lípidos en el Adipocitos (Adipocyte Lipids Binding Protein)
AMPc	Adenosin Monofosfato cíclico
AMPK	Proteína Dependiente de Adenosin Monofosfato (Adenosin Monophosphate Dependant Protein Kinase)
ATC	Ácidos Tricarboxílicos
ATP	Adenosin Trifosfato
BC	Biotinil Carboxilo
BSA	Albúmina De Suero Bovino (Bovine Serum Albumin)
CaMK β	Cinasa de Calmodulina dependiente de Calcio β (Ca ⁺⁺ /calmodulin dependent protein kinase β)
ChREBP	Proteína Enlazante al Elemento de Respuesta a Carbohidratos (Carbohydrate Response Element Binding Protein)
CoA	Coenzima A
CT	Carboxil transferasa
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic Acid)
EC	Número de Clasificación de la Comisión de Enzimas (Enzyme Commission Number)
ELISA	Ensayo Inmunoabsorbente Enlazado a Enzimas (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
ES	Error Estándar
FAS	Sintasa de Ácidos Grasos (Fatty Acids Syntase)
<i>g</i>	Gravedad
GC	Guanilato Ciclasa
GDP	Guanosin Difosfato (Guanosin DiPhoshpate)
Gi	Proteínas G inhibitoria (inhibitory Protein G)
Glicerol-3P	Glicerol-3-Fosfato
GLUT2	Transportador de glucosa tipo 2
GMPc	Guanosin Monofosfato cíclico
Gs	Proteínas G estimulante (stimulant Protein G)
GTP	Guanosin Trifosfato (Guanosin TriPhoshpate)
h	Horas
HCS	Holo Carboxilasa Sintetasa
HDL	Lipoproteínas de alta densidad (High Density Lipoproteins)
HIMH	Instituto de Salud Mental Hunter (Hunter Institute of Mental Health)
HRP	Peroxidasa de Rábano Picante (Horseradish Peroxidase)
HSL	Lipasa Sensible a Hormonas (Hormone Sensitive Lipase)
IRS	Sustrato del Receptor de Insulina (Insulin Receptor Sustrate)
kcal	Kilocalorías
kDa	Kilodaltones
kg	Kilogramos

LKB1	Cinasa Hepática B1 (Liver Kinase B1)
LM	Lipasa de Monoglicéridos
LXR α	Receptor Huérfano Hepático α (Liver Orphan Receptor α)
MAPK	Proteína Cinasa Activada por Mitógenos (Mitogen-Activated Protein Kinase)
MCC	3-metilcrotonil CoA Carboxilasa
mg/día	Miligramos diarios
mg/kg	Miligramos por cada kilogramo
min	Minutos
mm	Milímetros
mmol	Milimoles
nm	Nanómetros
nmol/d	Nanomoles por cada decilitro
NPR	Receptor de Péptidos Natriuréticos (Natriuretic Peptide Receptor)
NY	Neuropéptido Y
ODQ	1H-(1,2,4)oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona
PABC	Proteína Acarreadora del Biotinil Carboxilo
PC	Piruvato Carboxilasa
PCC	Propionil-CoA Carboxilasa
PDE-3B	Fosfodiesterasa 3B (Phosphodiesterase 3B)
PEPCK	Fosfoenolpiruvato Carboxicinasa (Phosphoenolpyruvate carboxykinase)
pH	Potencial Hidrógeno
PI3K	Cinasa de Inositol-3-Fosfato (Phosphoinositide 3-Kinase)
PKA	Proteína Cinasa A (Protein Kinase A)
PKB	Proteína Cinasa B (Protein Kinase B)
PKG	Proteína Cinasa G (Protein Kinase G)
PPAR- γ	Receptor Activado por el Proliferador de Peroxisomas tipo γ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ)
PYY	Péptido YY
RA	Receptores adrenérgicos
RI	Receptor de Insulina
RNA	Ácido Ribonucleico (Ribonucleic Acid)
RNAm	RNA mensajero
Rp-GMPcS	Rp-Guanosin-3',5'- monophosphorothioate cíclico
rpm	Revoluciones por Minuto
SDS-PAGE	Electroforesis en Geles de Poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Sodio (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
SREBP-1c	Proteína de Enlace al Elemento de Respuesta a Esteroles 1-c (Sterol Response Element Binding Protein 1c)
TG	Triglicéridos
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral α (Tumor Necrosis Factor α)
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
V	Voltios
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad (Very Low Density Lipoproteins)
μ g/d	Microgramos por cada decilitro
μ g/ μ L	Microgramos por cada microlitro
μ L	Microlitros
μ mol	Micromoles

Ser	Serina
Asp	Asparagina
His	Histidina
Thr	Treonina (Threonine)
Met	Metionina
Lis	Lisina

Resumen.

Introducción: El estudio de las vitaminas han puesto de manifiesto que, además de su efecto clásico, las vitaminas poseen otros mecanismos de acción y que éstos pueden variar dependiendo de su concentración. La biotina es una vitamina hidrosoluble perteneciente al complejo B que participa en el metabolismo como grupo prostético de las carboxilasas. La ingesta recomendada de la vitamina es de 30 µg. Se ha demostrado que en concentraciones farmacológicas, aproximadamente 1.5 a 3 órdenes de magnitud por arriba de sus requerimientos diarios, esta vitamina es capaz de modificar procesos celulares y sistémicos del organismo. Estos efectos se encuentran relacionados con la expresión de genes y son independientes de su acción como grupo prostético de las carboxilasas. Existen dos teorías para explicar el mecanismo de acción de la biotina sobre la expresión de genes: la biotinilación de histonas y la activación de la vía de señalización de la Guanilato Ciclasa Soluble/Proteína Cinasa G. Varios estudios han demostrado que concentraciones farmacológicas de biotina modifican el metabolismo de lípidos tanto en seres humanos como en modelos animales normo o hiperlipidémicos. En estudios realizados previamente, nuestro grupo de trabajo reportó que la biotina reduce la expresión de genes de enzimas y factores transcripcionales de la vía lipogénica y que estos efectos difieren entre el hígado y el tejido adiposo. De igual manera se demostró que dicho efecto hipolipemiante está relacionado con un aumento en las concentraciones de GMPc y la activación de la proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK) en el hígado. Se ha documentado que las acciones farmacológicas de la biotina difieren entre los tejidos y que la AMPK es regulada de manera tejido-específica. En este trabajo se investigaron los efectos de la suplementación con biotina sobre la AMPK, así como de sus blancos moleculares: acetil-CoA carboxilasa-1 y -2 en el tejido adiposo. Así mismo, se estudió el efecto de la suplementación con biotina sobre la lipólisis en el mismo tejido. Metodología: Se utilizaron ratones sanos machos Balb/cAnNHsd los cuales fueron destetados a los 21 días de nacidos y alimentados durante 8 semanas con una dieta control o una suplementada con biotina (la concentración de biotina en cada formulación fue de 1.76 o 97.7 mg/kg respectivamente) a partir de este punto. Se determinó el contenido de GMPc, la abundancia de las formas fosforiladas de AMPK, acetil-CoA carboxilasa-1 y -2, la tasa lipolítica basal Resultados: Los datos obtenidos durante el desarrollo del presente trabajo mostraron que los ratones que recibieron la suplementación con una dieta conteniendo 56 veces el contenido de biotina presente en la dieta control tuvieron en el tejido adiposo un aumento en el contenido de GMPc. Además se observó un incremento en la abundancia relativa de las formas fosforiladas de AMPK (activa). Acorde con

la activación de esta enzima se encontró un aumento en las formas inactivas (fosforiladas) de la acetil-CoA carboxilasa 1 y 2. Los niveles basales de lipólisis no sufrieron cambios en respuesta al tratamiento. Conclusiones: Estos resultados demostraron por primera vez los efectos de la suplementación de biotina en el tejido adiposo sobre la activación de AMPK y el incremento en el contenido de GMPc. De igual manera, estos datos constituyen la primera demostración experimental de que la biotina no afecta el proceso de lipólisis en el tejido adiposo. Los resultados de este trabajo enriquecen el conocimiento sobre el mecanismo molecular de acción de la biotina sobre la regulación del metabolismo de lípidos.

Abstract.

Introduction: Vitamin studies have shown that they possess other actions on biological functions beside its classical function, and that these actions may vary depending on their concentration. Biotin is a complex B water soluble vitamin that acts as prosthetic groups for carboxylases. The adequate intake level of biotin is 30 µg/d for adults. It has been demonstrated that at pharmacological concentration, about 1.5-3 orders of magnitude its daily requirements of 30 µg, this vitamin modifies over cellular and systemic process, and that these effects are related to gene expression. There are two theories to explain the possible mechanism of action of biotin over gene expression: histones biotinylation and activation of Soluble Guanylate Cyclase/Protein Kinase G signalling pathway. Several studies have demonstrated that pharmacological concentrations of biotin modifies lipid metabolism in humans and in animal models in normoglycemic and hyperglycemic conditions. In previous studies, our work group reported that biotin reduces gene expression of enzymes and transcriptional factors related to lipogenic and that these effects are different between liver and adipose tissue. In the same way it was demonstrated that this hypolipemic effect is related to a rise in GMPc concentration and activation of AMP Dependent Protein Kinase (AMPK) in liver. It has been documented that pharmacological action of biotin differs between tissues and that AMPK is regulated in a tissue-specific manner. In this work effects of biotin supplementation over AMPK, as well as its molecular targets: Acetyl-CoA Carboxylase-1 and -2 in adipose tissue were studied. In the same way, effect of biotin supplementation over lipolysis in the same tissue was analyzed. Methodology: Male healthy Balb/cAnNHsd mice were used as experimentation animals, they were weaned 21 days after birth and fed during 8 weeks with a biotin-control or a biotin-supplemented diet (biotin concentration in each formulation was 1.76 or 97.7 mg/kg respectively) since this point. cGMP content, relative abundance of phosphorylated forms of AMPK, Acetyl-CoA Carboxylase-1 and -2, basal lipolytic rate were determined. Results: Data obtained during this work shows that mice whose diet contained 56 times the amount of biotin present in the control diet increased cGMP content in the adipose tissue. Besides this, an increment in the relative abundance of the phosphorylated (active) form of AMPK. According with enzyme activation, a rise in inactive forms (phosphorylated) of Acetyl-CoA-1 and -2 were found. Basal Lipolytic rate were not modified by the treatment. Conclusions: These results by the first time demonstrates the effects of biotin supplementation over AMPK activation and the increment in cGMP content in adipose tissue. In the same way, these data constitutes the first experimental demonstration that biotin does not affect lipolytic

process in adipose tissue. Results obtained in the present work enriches knowledge about molecular mechanism of biotin action over lipid metabolism regulation.

1. Introducción.

1.1 La Biotina.

La biotina, también conocida como vitamina B7 o vitamina H (Melo y Cuamatzi 2007), es una vitamina del complejo B, esencial para la homeostasis metabólica y el crecimiento celular (Zempleni 2005). Fue originalmente descubierta por Boas (1927) y caracterizada años después como un factor indispensable para el crecimiento (Kögl y Tönnis 1936).

Estructuralmente, la biotina es un compuesto heterocíclico que cuenta con un anillo de imidazolidona unido a un anillo de tetrahidrotiofeno el cual tiene una cadena lateral de ácido valérico (Fig. 1). La biotina es hidrosoluble, insoluble en compuestos orgánicos y estable en un rango de pH entre 5 y 8 (Jitrapakdee y Wallace 2003). Su función más conocida es la de participar como grupo prostético de las carboxilasas: acetil-CoA carboxilasa (EC 6.4.1.2), piruvato carboxilasa (EC 6.4.1.1); propionil-CoA carboxilasa (EC 6.4.1.3) y 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa (EC 6.4.1.4), enzimas que participan en diversos procesos metabólicos como la gluconeogénesis, la lipogénesis, la oxidación de lípidos y el catabolismo de aminoácidos (Jitrapakdee y Wallace 2003).

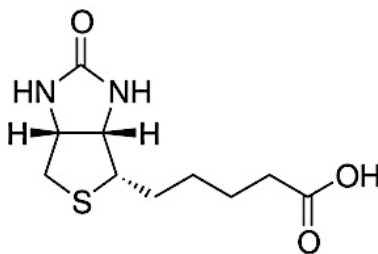


Figura 1.- Estructura química de la biotina. Es un compuesto heterocíclico que cuenta con un anillo de imidazolidona unido a un anillo de tetrahidrotiofeno el cual tiene una cadena lateral de ácido valérico

Para llevar a cabo su función como grupo prostético de las enzimas carboxilasas, la biotina se une covalentemente a las apoenzimas por medio de la Holocarboxilasa Sintetasa (HCS) (EC 6.3.4.10) mediante una reacción en dos etapas: 1) la biotina reacciona con una molécula de ATP para activarse y forma un intermediario de reacción conocido como biotinil-5'-AMP; 2) el grupo biotinil es transferido a la apoenzima por la acción de la HCS formando un enlace semipeptídico

con un residuo de Lisina colocado en una secuencia Met-Lis-Met altamente conservada en las carboxilasas (Lamhonwah et al. 1987).

Las carboxilasas, al ser hidrolizadas liberan residuos de lisina covalentemente unidos a biotina, los cuales son conocidos como biocitina (Fig. 2). La fracción molar de biotina en la biocitina es liberada por la acción de la biotinidasa (EC 3.5.1.12) y puede ser reciclada integrándose a unidades de carboxilasa recién sintetizadas (Chauhan & Dakshinamurti 1988) o bien, catabolizarse para ser excretada en forma de sus derivados como bisnorbiotina, tetranorbiotina sulfóxido y biotina sulfona (Zempleni & Donald M Mock 1999).

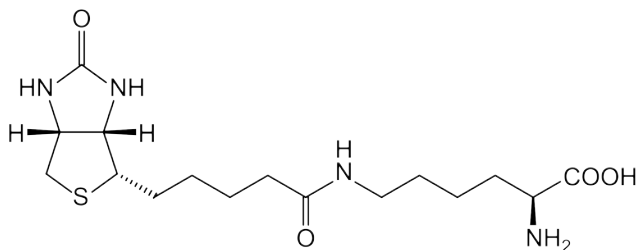


Figura 2.- Estructura Química de la biocitina. Se compone de un residuo de Lisina enlazado covalentemente a una unidad de biotina la cual es hidrolizada por acción de la biotinidasa

Los mamíferos no pueden sintetizar la biotina por lo que es necesario consumirla en la dieta, aunque en cierta proporción es posible obtenerla de los microorganismos intestinales (Melo y Cuamatzi 2007). En los alimentos, la biotina puede encontrarse en forma de dímeros de biocitina, como parte de péptidos biotinilados o bien de forma libre (Dakshinamurti y Chauhan 1994). Cuando la biotina dietaria se encuentra en forma libre, es absorbida por los enterocitos de la porción distal del duodeno y proximal del yeyuno para pasar al torrente sanguíneo (Said et al. 1987); cuando se encuentra unida a péptidos, se debe romper el enlace covalente por acción de la biotinidasa pancreática (Hymes y Wolf 1996). La biotina es introducida a las células a través del Transportador Múltiple de Vitaminas Dependiente de Sodio el cual reconoce la fracción molar de ácido valérico de la vitamina (Cohen y Thomas 1982) mediante un proceso electrogénico, fenómeno que ha sido reportado en placenta, riñón, hígado, páncreas, corazón, cerebro, pulmón y músculo esquelético humanos (H. Wang et al. 1999).

Basado en estudios realizados en las décadas de los 80's y 90's, el valor de la ingesta adecuada de biotina para seres humanos adultos y mujeres en estado de embarazo se considera de 30 µg/d (123 nmol/d) (Yates et al. 1998); durante la lactancia la recomendación aumenta a 35 µg/d (143 nmol/d) y para infantes entre 0 y 5 meses de edad, dicho valor se establece en 5 µg/d (20 nmol/d) (Food and Nutrition Board 1989; Innis y Allardyce 1983).

La biotina en los alimentos puede encontrarse libre o unida covalentemente a proteínas por un residuo de lisina. Una vez que la biotina es ingerida en la dieta, las proteínas unidas a la biotina son digeridas por peptidasas y proteasas hasta generar la biocitina, que es la biotina con un residuo de lisina, y péptidos pequeños unidos a biotina. La biotinidasa, una enzima presente en el jugo pancreático, rompe el enlace entre la biotina y la lisina, y la biotina libre se absorbe por los enterocitos de la porción distal del duodeno y la proximal del yeyuno. La biotina requiere un transportador para cruzar las membranas plasmáticas. Este transportador es el SMVT (Transportador múltiple de vitaminas dependiente de sodio), que se encuentra en la porción apical de los enterocitos (Said 2012). El transporte de biotina por el SMVT es dependiente de la temperatura y acoplado a sodio: en presencia de un gradiente de sodio, el transporte ocurre en contra de un gradiente de concentración (Mock 2006). Una vez que la biotina cruza la membrana apical, su salida del enterocito también se da a través de un transportador. Sin embargo, este transporte es independiente de sodio y la acumula biotina en contra de un gradiente de concentración, ésta sale libremente (Mock 2006).

Posterior a su absorción intestinal, en el plasma esta se puede encontrar libre o unida a proteínas: de manera covalente (12%) o reversible (7%) (Mock & Malik 1992). De la circulación, la biotina es transportada hacia los órganos periféricos por el SMVT. Aún existe controversia acerca de la existencia de reservas de biotina en los tejidos. La biotina en el hígado se encuentra principalmente en la mitocondria y en el citoplasma, mientras que solo el 0.7% se encuentra en el núcleo (Zempleni 2005). El hígado es el órgano que absorbe la mayor cantidad de biotina para su metabolismo y utilización, y lo realiza a través del SMVT, el cual se ha demostrado su existencia en riñón, cerebro, corazón y placenta (Said 2012). También, hay evidencia de que la biotina puede ser transportada por más de un acarreador. Se ha sugerido que existe un transporte de biotina de alta afinidad en células mononucleares de sangre periférica. La Km estimada para este transportador

es de 2.6 nM, valor cercano a los niveles de biotina reportados en plasma de individuos sanos (Zempleni & Mock 1998).

La biotina libre que ha sido internalizada hacia la célula es utilizada por la mitocondria en reacciones de carboxilación. Se ha propuesto que la biotina entra al espacio intramitocondrial en su forma protonada (neutra), para posteriormente disociarse en su forma aniónica ($pK_a = 4.5$) en el pH alcalino de la mitocondria, con lo cual queda atrapada dentro de ella (Said 2012). La biotina es degradada mediante el proceso de β -oxidación que toma la cadena de ácido valérico de la vitamina como sustrato produciendo bisnorbiotina y bisnorbiotinmetilcetona (Mock et al. 1993). También el anillo de tiofeno puede sufrir oxidaciones convirtiéndose en biotin-d, l-sulfóxido y biotin sulfona que son excretados por la orina (Zempleni & Donald M. Mock 1999). Estos cuatro metabolitos no tienen actividad alguna como vitaminas. La biotina es desechada por el organismo mediante la orina, en donde se pueden encontrar entre 18 y 79 nmol/24 horas, además de una cantidad similar de metabolitos de la vitamina ya que en su forma nativa solamente significa al rededor de la mitad de las sustancias que se enlazan a la avidina en la orina (Mock et al. 1995).

1.1.1. Carboxilasas Dependientes de Biotina.

La biotina actúa como cofactor de cuatro carboxilasas que participan en el metabolismo intermediario. Las carboxilasas dependientes de biotina se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y pueden ser encontradas en bacterias, archaea, hongos, algas, plantas y animales; y tienen un papel crucial en el metabolismo de ácidos grasos, aminoácidos y carbohidratos (Wakil et al. 1983; Cronan y Waldrop 2002; Tong 2005; Jitrapakdee et al. 2008). Estas enzimas poseen dos distintas actividades y catalizan sus reacciones en dos pasos (Attwood y Wallace 2002; Knowles 1989): primero, un componente biotinilado de la carboxilasa dependiente de ATP y Mg^{2+} cataliza la carboxilación del átomo N1' del cofactor de biotina, usando bicarbonato como donador de CO_2 . La vitamina se une de forma covalente a través de un enlace amida a la cadena lateral de un residuo de lisina en el componente acarreador del elemento biotinil-carboxilo de la proteína. En el segundo paso, la actividad carboxil transferasade la enzima cataliza la transferencia del grupo CO_2 desde el biotinil-carboxilo hacia el aceptor del grupo carboxilo, que es referido regularmente como el sustrato de la enzima (Fig. 3). Los sustratos de estas enzimas son ésteres de ácidos orgánicos de Coenzima A (CoA) y su sitio de carboxilación es el carbono α de un ácido saturado (ACC, PC) o bien, el carbono γ de un ácido α - β insaturado (MCC). También pueden

servir como sustratos algunas moléculas pequeñas, como el piruvato. Dependiendo de la enzima y el organismo, los componentes biotín-carboxilo, el acarreador del biotín-carboxilo y la carboxiltransferasa pueden ser subunidades separadas o bien, parte de una proteína multidominio. Además, mientras los componentes que interactúan con el grupo CO_2 están altamente conservados entre las especies, el sitio que ejerce la actividad transferasa depende en su secuencia y estructura de la naturaleza química del sustrato (Tong 2013).

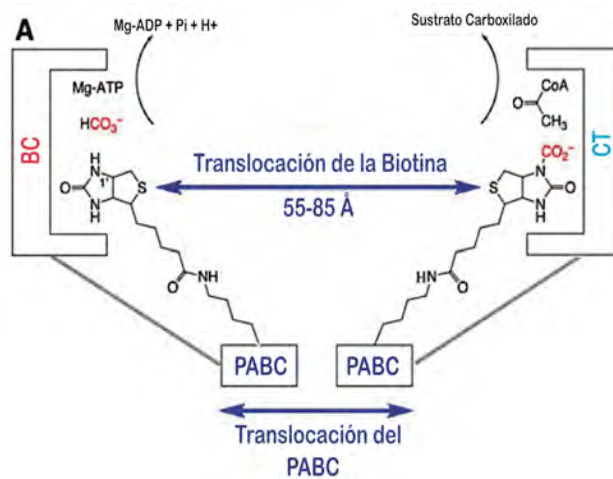


Figura 3.- Actividad bioquímica de las carboxilasas dependientes de biotina. La biotina es carboxilada en el sitio activo de una carboxilasa dependiente de biotina (BC) usando bicarbonato como donador de CO_2 e hidrolizando ATP. Después, la biotina es translocada al sitio activo de la carboxil transferasa (CT), mientras el CO_2 es translocado al sustrato de la enzima. En la reacción, la biotina se transloca entre ambos sitios activos (BC y CT) junto con el componente de la proteína acarreadora del biotín carboxilo (PABC) que permanece estacionario (modelo de dominio oscilatorio) (Modificado de Tong 2013).

Las carboxilasas dependientes de biotina pueden ser clasificadas de acuerdo a la identidad de su sustrato, teniendo así como principal clase a aquellas enzimas que reconocen ésteres de CoA y ácidos orgánicos pequeños llamadas genéricamente Acil-CoA carboxilasas. En esta clase se encuentran la Acetil-CoA Carboxilasa, Propionil-CoA Carboxilasa y la 3-Metilcrotonil-CoA Carboxilasa (Tong 2013). Éstas serán revisadas brevemente de manera individual a continuación.

La Acetil-CoA Carboxilasa (ACC, EC 6.4.1.2) cataliza la conversión de Acetil-CoA en Malonil-CoA (Saggerson 2008). En los mamíferos existen dos isoenzimas, acetil-CoA Carboxilasa-1 (ACC1 también nombrada $\text{ACC}\alpha$) que es citoplásmica y cataliza la reacción limitante de la biosíntesis de

ácidos grasos de cadena larga en los tejidos lipogénicos (Wakil et al. 1983); y acetil-CoA carboxilasa-2 (ACC2 o ACC β) que en el ser humano comparte un 73% de identidad con la acetil-CoA carboxilasa-1. Esta carboxilasa está asociada a la cara exterior de la membrana mitocondrial a través de un segmento de 140 residuos en el extremo N-terminal que no existen en acetil-CoA carboxilasa-1 (Abu-Elheiga et al. 2000). La producción de Malonil-CoA en el contexto mitocondrial sirve como regulación para el transporte de ácidos grasos de cadena larga hacia el interior de la mitocondria para el proceso de β -oxidación ya que dicho compuesto es un potente inhibidor de la Carnitin-Palmitoil Transferasa 1 (EC 2.3.1.21) (Ramsay et al. 2001). La actividad de ambas isoformas se encuentra altamente regulada por una variedad de estímulos de diferentes tipos: hormonales (Mabrouk et al. 1990; Witters et al. 1979), dietarios (Clarke & Jump 1996; Kim & Freaque 1996), del desarrollo (Batenburg & Whitsett 1989; Iritani et al. 1993) y genéticos (Cheema & Thomas Clandinin 1996; Pape et al. 1988); por ejemplo, la actividad enzimática de ACCes aumentada por la presencia de citrato, inhibida por ésteres de CoA de ácidos grasos de cadena larga y son inactivadas por fosforilación, por el glucagon y por la Proteína Cinasa dependiente de AMP (AMP dependant Protein Kinase, AMPK; EC 2.7.11.31). A pesar de la sensibilidad a diversos estímulos, un gran número de ellos afecta la actividad de estas enzimas a través de mecanismos de fosforilación reversible (Kim 1997). Para la AMPK se conoce que sus sitios de fosforilación son Ser80 en acetil-CoA carboxilasa-1 y Ser222 en la isoenzima mitocondrial (Brownsey et al. 2006).

La Propionil-CoA Carboxilasa (PCC, EC 6.4.1.3) cataliza la conversión de Propionil-CoA en *D*-metilmalonil-CoA, compuesto que es crucial para el metabolismo de los aminoácidos ramificados, de la metionina, de las cadenas laterales del colesterol y de los ácidos grasos de cadena impar. En los mamíferos, La propionil-CoA carboxilasa se encuentra en la matriz mitocondrial y es activada por la presencia de cationes inorgánicos monovalentes como el K⁺, NH₄⁺ y el Cs⁺ (Giorgio y Plaut 1967; Edwards y Keech 1968; Kalousek et al. 1980). Las deficiencias de PCC en seres humanos se relacionan a acidosis propiónica que en casos graves puede ser mortal. La PCC también es expresada en el cerebro y se ha propuesto que puede intervenir en el desarrollo neurológico, ya que su deficiencia puede provocar retardo mental, epilepsia y ataques (Ballhausen et al. 2009; Haberlandt et al. 2009; Rigo et al. 2006).

La enzima 3-Metilmalonil-CoA Carboxilasa (MCC, EC 6.4.1.4) convierte 3-metilmalonil-CoA en 3-metilglutaconil-CoA, compuesto esencial para el metabolismo de leucina e isovalerato en la

mayoría de los organismos (Nikolau et al. 2003). En células eucariotas, la MCC se encuentra en la matriz mitocondrial (Stadler et al. 2005). La deficiencia de esta carboxilasa en seres humanos constituye uno de los errores innatos del metabolismo que se presentan con mayor frecuencia cuyas manifestaciones clínicas son tan variables que pueden existir individuos asintomáticos en el estado neonatal hasta casos severos mortales contando síntomas como retardo sicomotor, ataques y coma (Baumgartner et al. 2001).

La conversión de piruvato en oxalacetato es catalizada por la Piruvato Carboxilasa (PC, EC 6.4.1.1), lo que la convierte en una enzima de suma importancia en el metabolismo intermedio (Attwood 1995). En mamíferos, la PC se localiza en la matriz mitocondrial y tiene roles cruciales en la gluconeogénesis en hígado y riñón; lipogénesis y glicerolneogénesis en adipocitos y biosíntesis de glutamato en astrocitos; también cuenta con un importante papel anaplerótico reponiendo en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos los intermediarios que fueron sustraídos para la biosíntesis de glucosa, ácidos grasos, aminoácidos y otros compuestos (Owen et al. 2002). La deficiencia de la actividad de la piruvato carboxilasa en seres humanos es un desorden metabólico autosómico recesivo que puede conducir a diferentes grados de acidemia láctica, retraso sicomotor e hipotonía, hipoglucemia, hiperamonemia, anorexia y convulsiones; muchos pacientes con este padecimiento mueren a pocos días de haber nacido (Marin-Valencia et al. 2010).

A continuación se presenta un esquema de las rutas metabólicas en las que se involucran las carboxilasas dependientes de biotina (Fig. 4).

encontrado en cultivos de hepatocitos con concentraciones de $1\mu\text{M}$ por Spence y Koudelka (1984). En años posteriores, se demostró que el aumento en la actividad de la enzima está dado por un incremento en la transcripción del gen que la codifica (Chauhan y Dakshinamurti, 1991). En un modelo de ratas diabetizadas con aloxano, se encontró que la administración de dosis farmacológicas de biotina (2 mg/kg de peso corporal) produjo un incremento en la actividad de las enzimas glucolíticas fosfofructocinasa (EC 2.7.1.11) y piruvato cinasa (EC 2.7.1.40) (K Dakshinamurti y Hong, 1970). Aunado a esto, un estudio realizado en ratas diabetizadas con estreptozotocina reportó en 1994 que la abundancia del RNA mensajero de la enzima fosfoenolpiruvato carboxicinas (Phosphoenolpyruvate Carboxykinase, PEPCK, EC 4.1.1.32) disminuyó en el hígado como respuesta al tratamiento con concentraciones farmacológicas de la vitamina (1 mg/kg de peso corporal) (K Dakshinamurti y Li, 1994), lo que concuerda con la un perfil de expresión que favorece la reducción de la hiperglucemia en individuos con diabetes mellitus. Cabe señalar que la expresión de la PEPCK no se vio modificada en riñón, lo que indica que la acción de la biotina es diferente según el tejido que se estudie.

Un estudio de microarreglos de cDNA obtenido de personas adultas sanas (Wiedmann, Rodriguez-Melendez, Ortega-Cuellar, y Zemleni, 2004) encontró que la administración diaria de 2.15 mg de biotina modificó la expresión de 270 genes, aumentando la actividad de 139 de ellos y disminuyendo la de otros 131, lo que pone en evidencia el amplio efecto que puede presentar la suplementación con biotina sobre la expresión genética. Por otro lado, se ha reportado que la biotina regula la abundancia del RNAm de aquellas proteínas que se relacionan directamente con ella para llevar a cabo sus actividades como son la holocarboxilasa sintetasa (Rodriguez-Melendez, Cano, Méndez, y Velazquez-Arellano, 2001), piruvato cinasa y propionil CoA carboxilasa (Solórzano-Vargas, Pacheco-Alvarez, y León-Del-Río, 2002) y el transportado múltiple de vitaminas (Pacheco-Alvarez et al. 2004). También se ha publicado que los cambios en la concentración de biotina en diversos modelos de estudio modifica la abundancia del RNAm de proteínas que no tienen relación de sustrato o cofactor con ella como la interleucina 2 y su receptor (Rodriguez-Melendez et al. 2003), NF κ B (Rodriguez-Melendez et al. 2004), N-myc, c-myb, N-ras, raf (Scheerger y Zemleni 2003) y la bomba de calcio SERCA-3 (EC 3.6.3.8) (Griffin et al. 2006).

La regulación que ejerce la biotina sobre la actividad de las proteínas no sólo se produce a nivel transcripcional ya que existen reportes donde se ha demostrado que esta vitamina modifica

diversas proteínas a nivel traduccional y postraduccional. En células hepáticas HepG2 se encontró mediante estudios de proteómica que más de 40 proteínas modificaban al menos en un 25% su abundancia en respuesta al tratamiento de biotina (Rodríguez-melendez et al. 2005). Por otro lado, en 1988 se reportó la influencia de un evento post-transcripcional dependiente de biotina que permite la expresión completa del receptor de asialoglicoproteínas en cultivos de células HepG2 (Collins et al. 1988). Cabe mencionar que hasta la fecha, no existen trabajos publicados que reporten la aparición de efectos adversos a nivel sistémico debido a la ingesta de biotina en dosis farmacológicas.

1.2.1. Mecanismos de Acción de la Biotina en la Regulación Genética.

Existen numerosos reportes acerca del efecto de la biotina sobre la expresión de diversos genes, sin embargo el mecanismo molecular por el cual esta vitamina ejerce dicho efecto no ha sido completamente dilucidada y aún existe controversia en este aspecto. Dos teorías mecanísticas han sido propuestas a la fecha: la biotinilación de histonas (Stanley et al. 2001) y otra más que se relaciona a la ruta de señalización de la Guanilato Ciclasa Soluble y a la Proteína Cinasa dependiente de Guanilil Mono Fosfato cíclico (GMPC) (GC/PKG).

1.2.1.1. Biotinilación de Histonas.

Diversos estudios han reportado la unión de moléculas de biotina en diversos sitios específicos de las histonas en varios tipos celulares y sugieren que la biotina puede modificar la expresión de genes a través de este proceso (Hassan y Zemleni 2006). El primer trabajo que reportó la biotinilación de histonas fue el publicado por Hymes, Fleischhauer, y Wolf (1995) quienes encontraron que las histonas de células de timo de ternera eran biotiniladas al incubarse con suero normal humano que contenía de 5 a 12 unidades de biotinidasa/mL en presencia de biocitina, pero esta modificación no fue encontrada al utilizar suero de niños con deficiencia de biotinidasa. Entre los efectos que han sido atribuidos a la biotinilación de histonas se encuentran: disminución de linfocitos polimorfonucleares durante la proliferación celular (Zemleni et al. 2001), cambios durante el ciclo celular en Células de Sangre Periférica Humana (Stanley et al. 2001), reparación del DNA en daños por exposición a luz ultravioleta en células Jurkat (Peters et al. 2002) y afectación en la duración de vida y la resistencia al estrés en *Drosophila melanogaster* (Smith et al. 2007).

A pesar de los diversos trabajos que apoyan los diferentes efectos de la biotilación de histonas, existe una fuerte controversia alrededor de este fenómeno. En 2008, un equipo de investigación de la Universidad de Adelaide en Australia, reportó que la detección de histonas biotiladas mediante el análisis con estreptavidina es un artificio ya que dicha sustancia reacciona con estas proteínas independientemente de si la biotina se enlaza a ellas o no (Bailey et al. 2008). Por otro lado Healy et al. (2009) reportaron que la biotina puede ser detectada en carboxilasas nativas o histonas *in vitro*, mas no en histonas aisladas de sistemas vivos por medio de diversos métodos utilizados de manera común para la determinación de histonas biotiladas. Pese a estos reportes, en años recientes se publicó un estudio integrativo que contempla el uso de diferentes métodos de análisis, anticuerpos, líneas celulares, clases de histonas y radiodetectores que asegura proveer evidencia definitiva de que la biotilación es una modificación natural, aunque rara, de las histonas (Kuroishi et al. 2011).

1.2.1.2. Vía de Señalización de la Guanilato Ciclasa soluble/Proteína Cinasa G.

A principios de la década de los 80's, un estudio reportó el incremento en el contenido de GMPc en diversos tejidos de ratas tratadas con biotina, debido a un aumento en la actividad de la guanilato ciclasa soluble (EC 4.6.1.3) (Vesely 1982). Pocos años después, un estudio realizado en hepatocitos aislados de rata encontró que el tratamiento de estos con 1 μ molar de biotina produce un aumento en la actividad de la glucocinasa hepática y que este fenómeno es precedido por un aumento en la concentración intracelular de GMPc, sugiriendo que este segundo mensajero puede ser el mediador del efecto que concentraciones farmacológicas de biotina ejercen en el organismo (Spence y Koudelka 1984). Desde este punto, pocos pero sólidos estudios han identificado como común denominador en el efecto de la biotina sobre la expresión genética un incremento en las concentraciones de GMPc y la participación de la Proteína Cinasa Dependiente de GMPc (Protein Kinase G, PKG, EC 2.7.11.12). Esta teoría mecanística (Fig. 5) propone que en la activación de la guanilato ciclasa soluble participa el biotinil-5'-AMP, que es el producto catalítico de la holocarboxilasa sintetasa, aunque no se ha determinado específicamente el mecanismo por el cual se produce el aumento en la actividad ciclasa (Solórzano-Vargas et al. 2002).

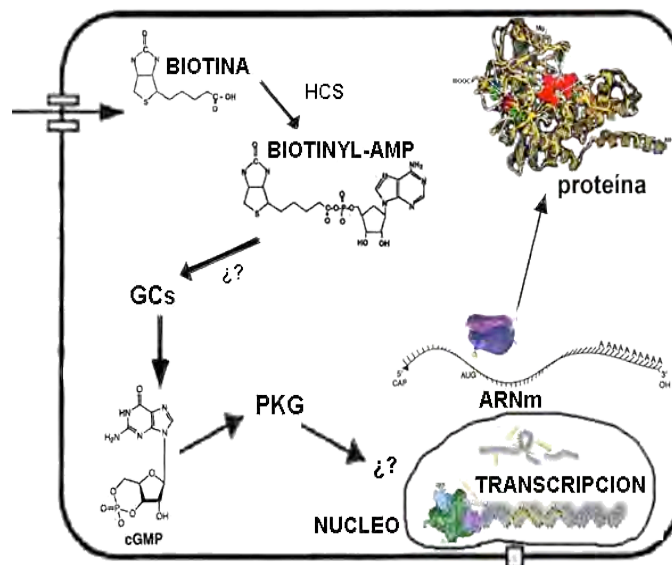


Figura 5.- Mecanismo de acción de la biotina por la vía de señalización de Guanilato Ciclasa soluble/PKG. La Holocarboxilasa Sintetasa (HCS) produce el intermediario biotinylo-AMP, el cual mediante un mecanismo aún desconocido aumenta la actividad de la Guanilato Ciclasa soluble (GCs). El incremento en la concentración intracelular de cGMP que esto produce activa a la Proteína Kinasa G (PKG), la cual puede fosforilar diferentes proteínas que participan en la regulación genética (Tomada de Vilches-Flores y Fernández-Mejía 2005)

Entre los genes cuya expresión se ha demostrado que se encuentra modulada por este mecanismo están la acetil-CoA carboxilasa-1 y la piruvato carboxilasa (Solórzano-Vargas et al. 2002), el transportador múltiple de vitaminas dependiente de sodio (Pacheco-Alvarez et al. 2004), el receptor de asialoglicoproteínas (Stockert y Morell 1990), el receptor de insulina (De La Vega y Stockert 2000); además, en nuestro equipo de trabajo se demostró que la glucocinasa pancreática es modificada en su expresión por medio de este mecanismo (Vilches-Flores et al. 2010). Adicionalmente se ha reportado que en ratas sanas y ratas propensas a hipertensión sometidas a tratamiento con biotina se reduce la presión arterial por un mecanismo que incluye la acción del cGMP (Watanabe-Kamiyama et al. 2008). Otro trabajo en nuestro laboratorio, reportó que el tratamiento con biotina durante 8 semanas a través de la dieta aumenta la fosforilación y la actividad de AMPK en el hígado de ratones sanos y aumenta el contenido de cGMP en el tejido hepático (Aguilera-Méndez y Fernández-Mejía 2012).

1.3. Efectos de la Biotina en el Metabolismo de los Lípidos.

Aún cuando se conocen diversos efectos de la biotina sobre el metabolismo de carbohidratos, poco se sabe sobre la inferencia que puede tener esta vitamina sobre las rutas metabólicas de los lípidos. Del hecho de que la biotina participa directamente como grupo prostético de enzimas que participan en estas rutas (acetil CoA carboxilasa-1 y 2) es posible deducir una relación directa entre dicha vitamina y el metabolismo de lípidos (Dakshinamurti y Cheah-Tan 1968; Suchy et al. 1986).

Existen diversas publicaciones que reportan modificaciones benéficas en marcadores del metabolismo de lípidos, como la reducción de las concentraciones sanguíneas de triglicéridos (TG) y colesterol, en respuesta a tratamientos de suplementación con biotina. En un estudio realizado en ratas BHE (cepa de rata desarrollada en el U. S. D. A. Bureau of Home Economics/U. S. D. A. Human Nutrition Research Institute), que a pesar de ser tener propensión a desarrollar intolerancia a la glucosa en la edad adulta, hígado graso, lipemia y deficiencia renal, no desarrollan obesidad (Berdanier 1991), se encontró que el tratamiento con biotina disminuyó los niveles plasmáticos de lípidos totales, colesterol y fosfolípidos (Marshall et al. 1976). Experimentos llevados a cabo en conejos, demostraron que la administración de biotina previno el desarrollo de aterosclerosis experimental en estos animales (Dokusova y Klimov 1967). Adicionalmente, en nuestro laboratorio se publicó un estudio realizado en ratones sanos de la cepa Balb/cAnNHsd (cepa de ratón derivada de un núcleo de crianza obtenido del National Health Institute, Bethesda, MA, U. S. A.) donde se demostró que debido a la suplementación con biotina en concentraciones farmacológicas a través de la dieta durante un periodo de 8 semanas se redujeron los niveles séricos de triglicéridos en un 35% (Larrieta et al. 2010); esta disminución se encontró asociada a una menor expresión del RNAm de enzimas y factores transcripcionales lipogénicos. En el tejido adiposo, la abundancia del RNAm de la Proteína de Enlace al Elemento de Respuesta a Esteroles 1-c (Sterol Response Element Binding Protein 1c, SREBP-1c), acetil-CoA carboxilasa-1, ácido graso sintasa y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 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 RNAm de SREBP-1c, así como de acetil-CoA carboxilasa-1, ácido graso sintasa y el transportador de glucosa-2 (GLUT2); pero no en el RNAm de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que se vio aumentada. No se encontraron diferencias entre los grupos en la abundancia del RNAm del

Receptor Activado por Proliferador de Peroxisomas tipo γ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ , PPAR- γ) en hígado, pero sí en tejido adiposo en los individuos tratados con biotina. En tanto que el RNAm de PPAR- α no se modificó ni en hígado ni en tejido adiposo (Larrieta et al. 2010). Estas diferencias apoyan observaciones previas sobre acciones diferentes de la biotina al estudiar su efecto en diferentes tejidos.

También en seres humanos se han reportado modificaciones en los perfiles lipídicos como resultado del tratamiento con biotina. En un estudio realizado en seres humanos adultos sanos donde se les administró una inyección única de 100 mg de vitamina se encontró que la concentración de lípidos séricos totales fue disminuida 30 minutos después de la aplicación (Steigerwal & Bohele 1962). Por otro lado, la administración de 5 mg de biotina diarios durante 4 semanas a pacientes con aterosclerosis e hipercolesterolemia produjo una disminución del colesterol total (Dokusova y Krivoruchenko 1972). También en seres humanos, se encontró que la administración de 0.9 mg/día de biotina produjo cambios en los niveles séricos de lípidos con un comportamiento cambiante dependiente del tiempo de administración ya que, durante las primeras dos semanas de tratamiento se incrementaron los niveles de lípidos totales, fosfolípidos y lipoproteínas α y β mientras que pasado este período se produjo una disminución en dichos marcadores siendo más evidente esta modificación en pacientes con hiperlipemia (Marshall y Kliman 1980). Directamente nuestro grupo de trabajo reportó que la ingesta de 5 mg de biotina 3 veces diarias durante 28 días disminuyó la concentración plasmática de triglicéridos en individuos cuyos niveles iniciales se encontraban al menos 25% arriba del rango normal (Báez-Saldaña et al. 2004; Revilla-Monsalve et al. 2006). Cabe señalar que existen suplementos vitamínicos comerciales que contienen dosis farmacológicas de biotina (2 mg/día) en combinación con picolinato de cromo que producen reducciones significativas en los niveles de triglicéridos séricos y en la relación Lipoproteínas de muy baja densidad/Lipoproteínas de alta densidad (Very Low Density Lipoproteins/High Density Lipoproteins, VLDL/HDL) (Geohas et al. 2007; Singer y Geohas 2006)

1.4 Toxicidad de la biotina.

Existen pocos estudios abordando los efectos tóxicos de la biotina. En humanos la biotina se ha administrado en un rango de 0.25 to 50 mg hasta por 40 días, tanto oral, intramuscular, o

intravenosa, a niños y a adultos sanos sin reportarse efectos adversos (Andersen 2001). La administración de dosis orales de 100 mg/d a pacientes con deficiencias de Holocrboxylase Sintetasa y Biotinidasa no provocó efectos adversos en los sujetos de prueba (Baumgartner & Suormala 1997). Estudios realizados en pacientes diabéticos mostraron que la administración de 9 mg diarios de biotina no induce un empeoramiento de las condiciones clínicas ni efectos secundarios indeseables en un período de prueba que duró 48 meses (Maebashi et al. 1993). Tampoco fueron observados efectos adversos a la administración intravenosa de 50 mg de biotina tres veces a la semana durante dos meses en pacientes a los cuales se les practicaban procesos de hemodiálisis (Koutsikos et al. 1996). De forma similar, dosis de biotina que iban de 50 a 100 veces el requerimiento diario fueron bien tolerados durante 1 a 2 años por pacientes con neuropatía periférica derivada de diabetes (Koutsikos et al. 1990).

Debido a las implicaciones éticas que se presentan en cuanto al estudio de la toxicidad de la biotina sobre seres humanos, los trabajos realizados sobre este aspecto se han llevado a cabo bajo pruebas clásicas, como la prueba de Ames (SRI-International 1979; Hayes et al. 1984; Ma et al. 1984) y ensayos en modelos murinos (Bonjour 1991; Fiume 2001). En la prueba de Ames que utiliza *Salmonella typhimurim* y *Escherichia coli*, el potencial mutagénico de 10 mg/pozo de biotina en dimetilsulfóxido mostró que la vitamina no es mutagénica o tóxica (SRI-International 1979). En la prueba bacteriana RK, la biotina (1 mg/ml, pH 7.4) no mostró efectos mutagénicos (Hayes et al. 1984). En contraste con estos resultados, una prueba de Tradescantia-Micronucleous mostró que la biotina es mutagénica registrando una concentración mínima efectiva de 244.3 mg/ml (Ma et al. 1984).

Los valores de dosis letal media (DL_{50}) de toxicidad aguda oral e intraperitoneal de biotina han sido reportados para rata en 354 y 29 mg/kg de peso corporal respectivamente (Bonjour 1991). Para ratón, la DL_{50} para la vía intravenosa es de 1000 mg/kg de peso corporal (Bonjour 1991). Un estudio determinó el valor de la DL_{50} para la administración de dosis orales repetidas (10 días), reportando un valor de 350 mg/kg de peso corporal, sin embargo el estudio no provee datos suficientes (Fiume 2001).

En la década de los 90's un reporte de Watanabe y col. demostró que no existen diferencias en la cantidad de embarazos exitosos y reabsorción o muerte de fetos en hembras de

ratón que recibieron cantidades excesivas de biotina en forma oral o subcutánea; solamente se presentó una acumulación mayor de la vitamina en los tejidos de los animales que recibieron la suplementación (Watanabe 1996). En otro estudio, una dieta que contenía 1,000 mg/kg (99 mg biotina/kg peso corporal/d) no afectó los parámetros de peso corporal o ingesta de alimento en ratas (Sawamura et al. 2015); los valores obtenidos en la medición de parámetros bioquímicos de toxicidad, como las actividades alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa, contenido de creatinina y urea en sangre no fueron modificados por el contenido de biotina en la dieta (100 a 1000 mg/kg) (Sawamura et al. 2015). Otro estudio examinó los efectos de la suplementación de biotina en la función hepática y renal y en marcadores de toxicidad en ratas diabetizadas con estreptozotocina; los niveles de urea, creatinina, alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa se encontraron disminuidos en las ratas suplementados con biotina en comparación con el grupo diabético de control que presentaron un aumento anormal en sus niveles (Sahin et al. 2013).

Una publicación del 2007 reporta que en ratas que recibieron una dieta cuya formulación contiene un 0.5% d biotina provocó diarrea, dieta con 0.8% de biotina provoca muerte en el 25% de los individuos estudiados (1 de 4), y al ingerir una dieta con 1% de biotina en su contenido, se provocó la muerte en 2 de 4 individuos. Adicionalmente, este mismo trabajo reporta que en las concentraciones más altas de biotina en la dieta que se utilizaron, disminuyen los pesos tisulares de corazón, riñón, hígado y testículos (Sawamura et al. 2007). Un trabajo más reciente presentado por el mismo grupo de investigación reporta una acumulación de biotina en hígado y testículos de ratas jóvenes suplementadas con la vitamina a través de la dieta; este aumento en el contenido de biotina de los tejidos se presentó de forma dosis dependiente. Además, el proceso de espermatogénesis se vió afectado por el tratamiento disminuyendo los valores de espermatozoides encontrados de $35 \pm 25 \times 10^6/\text{mL}$ en los grupos control hasta $<1 \times 10^6/\text{mL}$ en los individuos que ingirieron la dosis más alta de biotina (1% de biotina en la dieta, aproximadamente 2500 veces más la cantidad contenida en la dieta control, durante 6 u 8 semanas) (Sawamura et al. 2015). Sin embargo, la escasa continuidad de estos trabajos, la baja cantidad de individuos experimentales (4-6) y la dosis de biotina excesivamente alta utilizada en estos estudios no permite el esclarecimiento total de los efectos detrimentales del exceso de biotina para el desarrollo ni proporcionan conocimiento suficiente para la determinación de niveles seguros de consumo de esta vitamina en animales o seres humanos.

1.5. El Tejido Adiposo Blanco.

En términos cuantitativos, el tejido adiposo blanco es el mayor almacén de energía en el cuerpo ya que en un adulto no obeso, se encuentran aproximadamente entre 10 y 15 kg de grasa en promedio, lo que sería equivalente a 135,000 kcal o a la energía que pueden proporcionar 200 comidas. Durante muchos años, el tejido adiposo fue considerado como un órgano pasivo y silente que almacenaba el exceso de energía en forma de triglicéridos y liberaba ésta como ácidos grasos no esterificados. Hoy en día, el tejido adiposo goza de un creciente reconocimiento como un órgano dinámico que tiene participación en el sistema endócrino secretando una variedad de hormonas, citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento que influyen procesos como el metabolismo vascular y la función endotelial, saciedad y apetito, inmunidad, fertilidad, inflamación, crecimiento tumoral, entre otros procesos metabólicos (Schäffler et al. 2006).

Cabe señalar que se especifica “tejido adiposo blanco” ya que en el cuerpo humano existe un tipo distinto de tejido adiposo llamado “café” o “pardo”, el cual es un órgano especializado involucrado en los procesos de termogénesis inducida por dieta y/o frío y que cuenta con un elevado número de mitocondrias por cada célula en comparación con su contraparte blanca (Seydoux 1983). Hace más de 20 años, en 1987, el tejido adiposo blanco fue identificado como un sitio importante para el metabolismo de esteroides sexuales (Siiteri 1987) y para la producción de adiposina, un factor endócrino que está marcadamente regulado de forma negativa en la obesidad de ratones (Flier et al. 1987). El concepto del tejido adiposo como un órgano endócrino se establece de manera firme con la posterior identificación y caracterización de la leptina en 1994 (Zhang et al. 1994). Actualmente se conoce que este órgano expresa y secreta una variedad de péptidos bioactivos, conocidos como adipocinas, que actúan tanto a nivel local (autocrino/paracrino) como a nivel sistémico (endócrino). Entre las moléculas que produce el tejido adiposo se encuentran la leptina (Zhang et al. 1994), adiponectina (Scherer et al. 1995), visfatina (Moschen et al. 2007), resistina (Karady et al. 1951), cartonectina (Schäffler et al. 2007), omentina (Schäffler et al. 2005) entre otras. Adicionalmente a estas señales, dicho tejido es capaz de producir diversos receptores que permiten generar respuestas a numerosas señales del sistema tradicional de hormonas y al Sistema Nervioso Central por lo que se ha reconocido que cuenta con la maquinaria metabólica necesaria para entablar comunicación con órganos distantes incluyendo al mismo Sistema Nervioso Central. A través de esta red integrativa, el tejido adiposo blanco

participa integralmente en la coordinación de una variedad de procesos biológicos que incluyen el metabolismo energético, la función neuroendócrina y la función inmune (Kershaw y Flier 2004).

1.5.1. Metabolismo de Lípidos en el Tejido Adiposo.

El metabolismo de lípidos en el tejido adiposo blanco (principalmente almacenamiento de triglicéridos y liberación de ácidos grasos no esterificados) se encuentra altamente regulado, principalmente por medio de la insulina y las catecolaminas en los seres humanos, además de otros factores como el estado nutricional (Large y Arner 1998). La integridad de los mecanismos que regulan el metabolismo de los adipocitos es importante para el mantenimiento de la homeostasis energética corporal y su desregulación puede jugar un papel importante en padecimientos como la obesidad, resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipo 2 (Large et al. 2004).

1.5.1.1. Lipogénesis.

La lipogénesis *de novo* es la síntesis de ácidos grasos a partir de sustratos no lipídicos, principalmente carbohidratos y en especial glucosa. Este proceso se lleva de manera importante en dos lugares: el hígado y los adipocitos.

La contribución del tejido adiposo a la lipogénesis *de novo* se encuentra bien definida en condiciones generales y particularmente en situaciones patológicas como la diabetes mellitus y la obesidad en el organismo humano. Las enzimas claves para este proceso son la Sintasa de Ácidos Grasos (Fatty Acids Synthase, FAS, EC 2.3.1.85) y la acetil-CoA carboxilasa-1, ambas presentes en los adipocitos (Letexier et al. 2003; Shrago et al. 1971; Shrago et al. 1969; Angel y Bray 1979). Aunque puede existir una mayor actividad lipogénica en el hígado que en el tejido adiposo si se expresa por peso, generalmente se acepta que 1.5 kg de hígado y 10-15 kg de grasa en un ser humano adulto producen aproximadamente la misma cantidad de ácidos grasos no esterificados por día (1-2 g por cada tejido) (Marin et al. 1992).

En términos generales, el proceso lipogénico es estimulado por la presencia de insulina y glucosa e inhibido por glucagón y ácidos grasos poliinsaturados. La regulación de la lipogénesis *de novo* está dada por diferentes mecanismos según el estímulo empleado: la regulación por insulina se da principalmente por acción de SREBP-1c y en parte por el Receptor Huérfano Hepático α

(Liver X Receptor α , LXRA) mientras que la respuesta a ácidos grasos poliinsaturados y a glucosa se da mediante la Proteína Enlazante al Elemento de Respuesta a Carbohidratos (Carbohydrate Response Element Binding Protein, ChREBP) (Veech 2003; Kersten 2001; Uyeda et al. 2002; Fofelle y Ferré 2002).

1.5.1.2. Síntesis de Triglicéridos.

Transporte e Internamiento de Ácidos Grasos.

Los ácidos grasos de cadena larga no pueden ser internados de manera pasiva a través de las membranas plasmáticas y su absorción necesita de procesos específicos en los adipocitos (Bernlohr et al. 1999). El mecanismo real del flujo transmembranal de los ácidos grasos no esterificados se mantiene aún en controversia. Las células del tejido adiposo blanco en seres humanos expresan numerosas proteínas transportadoras que facilitan y regulan el transporte de los ácidos grasos no esterificados a través de la membrana celular: la proteína CD36 (Abumrad et al. 1993), la Proteína Transportadora de Ácidos Grasos (Schaffer y Lodish 1994) y la Proteína de Enlace de Ácidos Grasos en membrana plasmática (Isola et al. 1995). Algunos estudios han sugerido que el mal funcionamiento de los sistemas de transporte de los ácidos grasos no esterificados puede tener un papel importante en el desarrollo de padecimientos metabólicos como la resistencia a la insulina, la diabetes mellitus y la obesidad (Luiken et al. 2001). Dentro de la célula, los ácidos grasos no esterificados y los lípidos en general son llevados de membrana a membrana o hacia el sitio activo de la Acil-CoA Sintetasa (EC 6.2.1.10) por la acción de FABP o Proteína Enlazante de Lípidos en Adipocitos (Fisher et al. 2002).

Producción de Acil-CoA y Glicerol-3-Fosfato.

La síntesis de triglicéridos requiere de glicerol y de los ácidos grasos no esterificados que deben ser transformados en Glicerol-3-Fosfato (Glicerol-3P) y Acil-CoA respectivamente para poder utilizarse como sustratos. En ratones y seres humanos sanos, la actividad glicerol cinasa es despreciable en las células adiposas. El Glicerol-3P necesario para este proceso es producido a partir de la glucosa mediante la primera fase de la glucólisis y a través de la glicerolneogénesis (Reshef et al. 2003). La entrada de glucosa al adipocito es controlada por la insulina, que promueve la translocación del Transportador de Glucosa tipo 4 desde las vesículas citoplásmicas hasta la membrana celular. La glicerolneogénesis es la producción de Glicerol-3P a partir de sustratos gluconeogénicos como el piruvato, la cual es una versión abreviada de la

gluconeogénesis, principalmente regulada a nivel citosólico por la PEPCCK (Reshef et al. 1969; Reshef et al. 1970; Ballard et al. 1967; Gorin et al. 1969).

En el citoplasma celular, moléculas de ácidos grasos y de CoA son esterificados para formar acil-CoA por la acción enzimática del grupo de Acil-CoA Sintetasas. Moléculas de ácidos grasos de cadena larga y mediana son acarreadas al interior de la célula por la Proteína de Enlace de Acil-CoA que tiene una gran afinidad por estos compuestos pero no por los ácidos grasos cortos (Kragelund et al. 1999; Knudsen et al. 2000).

Producción de Triglicéridos, esterificación del Glicerol-3-Fosfato.

La biosíntesis de triglicéridos es la esterificación sucesiva de los grupos funcionales del Glicerol-3P por la acción de diferentes enzimas que son llamadas Glicerol-3-fosfato Aciltransferasa (EC 2.3.1.15) (Bell y Coleman 1980); 1-Acilglicerol-3-fosfato Aciltransferasa (EC 2.3.1.51) (Leung 2001) y Diacilglicerol Aciltransferasa (EC 2.3.1.20) (Cases et al. 1998). La síntesis de triglicéridos se da principalmente en microsomas donde se concentran todas las enzimas involucradas en el proceso. Los intermediarios de estas rutas, como son el ácido lisofosfatídico, el ácido fosfatídico y los diacilgliceroles participan en importantes procesos celulares como la transducción de señales (Pagès et al. 2001; Sprong et al. 2001; Fang et al. 2001; Hla et al. 2001).

1.5.1.3. Lipólisis.

Durante la lipólisis, los triglicéridos son degradados de forma secuencial, pasando por diacilgliceroles y monoglicéridos hasta producir finalmente tres moléculas de ácidos grasos no esterificados y una de glicerol por cada mol de triglicéridos inicial que es hidrolizada en forma completa. En condiciones normales, los triglicéridos son hidrolizados completamente, aunque cerca del 10% pueden ser parcialmente degradados a diacilgliceroles y monoglicéridos, lo que puede ocasionar una acumulación de estos compuestos o bien, que el proceso lipolítico inicie con una molécula de diacilgliceroles como sustrato inicial (Hla et al. 2001). En la ruta lipolítica intervienen distintas proteínas, con y sin actividad enzimática que serán descritas a continuación.

Lipasas.

Durante mucho tiempo, la Lipasa Sensible a Hormonas (EC 3.1.1.79) fue considerada la enzima clave para el proceso de la lipólisis en el tejido adiposo. Un solo gen puede dar lugar a diferentes isoformas de esta lipasa con un rango de peso molecular entre 88 y 110 kDa usando promotores alternativos en diferentes tejidos (Mairal et al. 2002; Grober et al. 2003; Grober et al. 1997; Langin et al. 1993; Holst et al. 1996). La Lipasa Sensible a Hormonas del tejido adiposo cuenta con un dominio C-terminal catalítico, el cual es idéntico en todas las formas conocidas de la enzima. Este dominio contiene el sitio activo compuesto por la triada catalítica Ser-Asp-His, así como un modulo regulador con todos los sitios catalíticos conocidos de la lipasa. La Lipasa Sensible a Hormonas tiene dos actividades conocidas: cataliza la conversión de triglicéridos en diacilgliceroles y la degradación de diacilgliceroles a monoglicéridos, aunque su afinidad por los diacilgliceroles es 10 veces mayor que la que tiene por los triglicéridos. La Lipasa Sensible a Hormonas presenta mayor afinidad por hidrolizar acil ésteres en la posición 1 y 3 de la molécula de glicerol (Raclot et al. 1997). La fosforilación de esta lipasa por la Proteína Cinasa A (PKA, EC 2.7.11.11) conduce a su activación. Se han caracterizado 3 importantes sitios de fosforilación en la enzima obtenida de rata: Ser563, Ser559 y Ser 560 (Anthonsen et al. 1998), de los cuales se ha demostrado que los últimos dos sitios son responsables de la regulación *in vitro* de su actividad (Greenberg, AGreenberg AS, Shen W-J, Muliro K et al. 2001). La fosforilación de la Lipasa Sensible a Hormonas es necesaria para disparar el cambio conformacional que produce el aumento en su actividad. En el contexto *in vivo*, un paso adicional se lleva a cabo para la activación de la lipólisis que consiste en la translocación de la lipasa desde su localización citosólica hasta la superficie de las gotas donde se almacenan los TG interaccionando con éstos y con la Perilipina A para iniciar el proceso lipolítico (Hirsch y Rosen 1984; Egan et al. 1992; Brasaemle, Levin, et al. 2000; Granneman et al. 2007).

En el año de 2004, tres diferentes grupos de investigación reportaron una enzima capaz de hidrolizar triglicéridos aún en ausencia de actividad de Lipasa Sensible a Hormonas la cual fue denominada Lipasa de Triglicéridos de Tejido Adiposo (EC 3.1.1.3), adiponutrina, fosfolipasa A2ζ o desnutrina (Villena et al. 2004; Jenkins et al. 2004; Zimmermann et al. 2004) aunque después se determinó que la adiponutrina es una enzima distinta (Patatin-like Phospholipase 3, PNPLA3 (Steinberg et al. 2007). La Lipasa de Triglicéridos de Tejido Adiposo está compuesta por 486 residuos de aminoácidos y tiene un peso molecular de 54 kDa. Cuenta con un tramo hidrofóbico

entre los residuos 315 y 360 que ha sido propuesto como el responsable del enlace entre la enzima y la gota de grasa. Al igual que HSL, la desnutrina presenta tanto actividad hidrolasa de triglicéridos y de diacilglicerol sin embargo, su afinidad por los triglicéridos es 10 veces mayor que por los diacilglicerol (Zimmermann et al. 2004). La activación funcional de la Lipasa de Triglicéridos de Tejido Adiposo ha sido descrita por Rudolf Zechner et al (2009). Alteraciones en los niveles de expresión de esta enzima provocan cambios generales drásticos en la lipólisis celular. Si la enzima es sobreexpresada se incrementa la lipólisis basal, pero si es inhibida se elimina la lipólisis estimulada por hormonas (Lafontan y Langin 2009). En años recientes fue publicado un trabajo que reporta la activación de la Lipasa de Triglicéridos de Tejido Adiposo debido a su fosforilación mediada por AMPK (Ahmadian et al. 2011).

La Lipasa de Monoglicéridos (EC 3.1.1.23) tiene una secuencia de aminoácidos predicha de 302 residuos que corresponden a un peso molecular de 33 kDa. La actividad de esta enzima es requerida para la hidrólisis final de los 2-monoacilglicerol producidos por la activación de la Lipasa Sensible a Hormonas (Fredrikson et al. 1986). La Lipasa de Monoglicéridos hidroliza el enlace éster entre un radical acilo y una molécula de glicerol en los monoglicéridos sin preferencia por alguna posición de sustitución. La triada catalítica putativa que ha sido reportada para esta enzima se compone de Ser122, Asp239 e His269, los cuales han sido confirmados por experimentos de mutación sitio específica. Debido a que se expresa abundantemente de manera constitutiva, se cree que no tiene función reguladora en el proceso de lipólisis (Karlsson et al. 1997), es decir que la tasa lipolítica no depende directamente de la actividad de esta enzima.

Perilipinas.

Las perilipinas son una familia de fosfoproteínas que cubren la superficie de las gotas intracelulares donde los triglicéridos son almacenados (Servetnick et al. 1995) y que regulan el almacenaje y la utilización de los lípidos en varios tipos de células (Ducharme y Bickel 2008; Brasaemle, Rubin, et al. 2000). Originalmente, las perilipinas fueron identificadas como una fosfoproteína de 60 kDa de peso en adipocitos de rata que es susceptible de ser fosforilada por la acción de PKA en condiciones de estimulación lipolítica (Egan et al. 1990). La isoforma A de la perilipina es la que se encuentra en mayor abundancia en adipocitos maduros (Greenberg et al. 1993). La perilipina A, que es la forma de Perilipina que se encuentra en las gotas de grasa de los

adipocitos, puede ser fosforilada por PKA y por PKG (Sengenès et al. 2003), lo que es indispensable para el aumento de la lipólisis ante la estimulación por hormonas (García et al. 2004).

Regulación de la Lipólisis.

La regulación de la lipólisis es esencial para asegurar la provisión adecuada de lípidos a los tejidos que pueden utilizar los ácidos grasos no esterificados como combustible. En sujetos normales, la regulación lipolítica en respuesta a la ingesta de alimentos, el ayuno y/o la actividad física está controlada por la expresión y/o actividad de las lipasas y la interacción entre numerosos reguladores (Frayn et al. 2003).

La estimulación de la lipólisis, con respecto a procesos metabólicos a nivel corporal, puede darse por el ayuno (o restricción calórica) (Sengenès et al. 2002) o el ejercicio físico (Horowitz y Klein 2000), ambos procesos se basan molecularmente en un aumento de la respuesta del tejido adiposo blanco a la acción lipolítica de las catecolaminas. Otras condiciones que pueden incrementar la tasa lipolítica es el estrés, provocado por un incremento en la actividad del Sistema Nervioso Central, la exposición prolongada a bajas temperaturas (Mulligan et al. 2007) y la secreción de hormonas (Wolfe 1997). La inhibición del proceso de degradación de los triglicéridos puede ser provocada fisiológicamente por la ingesta de alimentos, lo que estimula la secreción de insulina (Coppack et al. 1989) o bien por el envejecimiento, proceso que provoca una disminución en la señalización β -adrenérgica (Lönnqvist et al. 1992).

A nivel mecanístico, el proceso lipolítico en el tejido adiposo puede ser mediado por diversas rutas. El factor más importante para la regulación de la lipólisis es la concentración intracelular de AMPc (revisado por Max Lafontan y Dominique Langin 2009). En este proceso es de vital importancia el fenómeno de comunicación cruzada o “cross-talking” entre las rutas de señalización estimuladora e inhibitoria que median la actividad de la Adenilato Ciclasa (EC 4.6.1.1) y de las Fosfodiesterasas de Nucleótidos (EC 3.1.4.-). El control clásico de la lipólisis responde a estímulos transmitidos a través de Receptores Acoplados a Proteínas G, conocidos como Receptores Adrenérgicos del subtipo β 1, 2 y 3 (β_1 -AR, β_2 -AR y β_3 -AR) (Lafontan y Berlan 1993).

Una ruta lipolítica diferente, responsiva a hormonas fue descubierta en células grasas humanas (Sengenès et al. 2000). Los péptidos natriuréticos de tipo A (de válvula Atrial cardiaca) y

1.5.1.4. Oxidación de Ácidos Grasos.

La oxidación de ácidos grasos de cadena larga para producir Acetil-CoA, llevada a cabo en la matriz mitocondrial, es un proceso para la producción de energía en muchos organismos y tejidos ya que puede proveer hasta el 80% de la energía total necesaria en circunstancias de ayuno prolongado (Large et al. 2004). Este proceso metabólico se da principalmente en el tejido muscular. Los electrones que son removidos de los ácidos grasos no esterificados durante su oxidación pasan a través de la cadena respiratoria mitocondrial dirigiendo la síntesis de ATP; la Acetil-CoA que se produce en este proceso puede ser completamente oxidada para producir CO₂ en el ciclo del ácido cítrico, resultando en un paso adicional de conservación de la energía. Este proceso también es conocido como β -oxidación (Lehninger et al. 2009).

El proceso global de la β -oxidación consiste en cuatro fases en las cuales se remueve la unidad de Acetil-CoA del extremo carboxílico del sustrato mediante:

1. La deshidrogenación de los carbonos α y β , reacción catalizada por tres isoenzimas distintas que son Acil-CoA Deshidrogenasa de Ácidos de Cadena muy Larga (12-18 unidades de carbono; EC 1.1.1.211), de Cadena Media (4-12 unidades de carbono; EC 1.3.8.7) y de cadena corta (4-8 unidades de carbono; EC 1.3.8.1). Los electrones removidos del sustrato original son transferidos a una molécula de Flavín Adenina Dinucleótido que además funciona como grupo prostético de estas deshidrogenasas.
2. La hidratación del doble enlace resultante, llevada a cabo por la Enoil-CoA Hidratasa (EC 4.2.1.17). Esta reacción es análoga a la que ocurre en el ciclo del ácido cítrico (reacción de la Fumarasa).
3. La deshidrogenación del L- β -hidroxiacil-CoA producido por la acción de la β -hidroxiacil-CoA Deshidrogenasa (EC 1.1.1.35). En esta reacción, el aceptor de electrones es el Nicotinamida Adenina Dinucleótido reducido.

4. Finalmente, el rompimiento del β -cetoacil-CoA formado para liberar Acetil-CoA y un acil-CoA que tiene dos átomos de carbono menos que aquel que el sustrato original. Este proceso es llevado a cabo por la Acil-CoA Aciltransferasa (Tiolasa; EC 2.3.1.16).

El Acil-CoA liberado, entra nuevamente a la secuencia oxidativa siempre y cuando tenga 4 o más unidades de carbono.

La regulación de la β -oxidación es compleja y está controlada a diferentes niveles como el transporte de los ácidos grasos no esterificados a través de la membrana celular, el citoplasma y la membrana mitocondrial; la capacidad enzimática de oxidación de la mitocondria; la retroalimentación de la vía oxidativa y la relativa abundancia de carbohidratos que puedan servir como fuente de energía a la célula. La importancia en la regulación varía de acuerdo al contexto energético celular es decir, el paso limitante en una condición dada no necesariamente lo es en condiciones diferentes (Thomson y Winder 2009).

De los dos tipos de tejido adiposo existentes en los organismos, el tejido adiposo blanco es el que se conoce primordialmente por su capacidad oxidativa para la realización del proceso termogénico, de hecho, es más oscuro en comparación con su contraparte blanca debido al elevado número de mitocondrias con las que cuentan sus células. No obstante, existen reportes que aseguran que el tejido adiposo blanco también puede llevar a cabo la oxidación de ácidos grasos no esterificados (Rosenbaum et al. 2002; Orci et al. 2004; Z.-W. Wang et al. 1999; Shimabukuro et al. 1997).

1.5.1.5. Regulación del Metabolismo de Lípidos.

Existen diversos procesos que pueden regular las rutas metabólicas de los lípidos en el tejido adiposo por ejemplo, la actividad lipogénica puede ser modulada alostéricamente por la presencia de citrato y glutamato que son activadores de acetil-CoA carboxilasa y puede ser disminuida por Acil-CoA, ácidos grasos no esterificados y Malonil-CoA que actúan como sus inhibidores. Una alta concentración citosólica de ácidos grasos no esterificados igualmente inhibe la actividad de la Sintasa de Ácidos Grasos, disminuyendo así la lipogénesis *de Novo* (Iritani 1992).

De manera similar, la acetil-CoA carboxilasa-2 es regulada de manera positiva por citrato y glutamato y de manera negativa por altas concentraciones de ácidos grasos no esterificados, lo que provoca un aumento en la oxidación de éstos (Tong 2005); la β -oxidación es inhibida por el producto final del proceso, acetil-CoA que provoca un proceso de retroalimentación que disminuye la actividad oxidativa (Liang et al. 2001).

Además de las modulaciones alostéricas, existen diferentes rutas de señalización que modulan el metabolismo de lípidos. Una de ellas es la señalización por insulina que activa la Proteína Kinasa B (EC 2.7.11.1) a través de la interacción de dicha hormona con su receptor, la proteína Sustrato del Receptor de la Insulina tipos 1 y 2 (IRS1 y 2) principalmente que activan a la PI3K (EC 2.7.1.150) cuyo producto promueve la actividad de la Kinasa Dependientes de Fosfoinositol la cual fosforila a PKB en su residuo de Thr308. Esta ruta favorece la lipogénesis y la síntesis de colesterol (Cross et al. 1995).

Otra posible ruta que es activada por la insulina es la de las Proteínas Kinasas Activadas por Mitógenos (EC 2.7.12.2), la cual transmite la señal a través de factores de intercambio de nucleótidos de guanina GRB2 y de SOS a la proteína Ras que activa secuencialmente distintas kinasas para finalmente activar a las enzimas Kinasas Reguladas por Señales Extracelulares (EC 2.7.11.24), las cuales regulan la transcripción de diversos genes (Wortzel y Seger 2011).

Por otro lado, hormonas como el glucagón, la adrenalina y la noradrenalina al actuar con sus respectivos receptores acoplados a proteínas G provocan el intercambio de GDP por GTP y promueven la unión de la subunidad G- α de los receptores con la AC, produciendo AMPc lo que provoca la activación de la PKA que modula la actividad de diversas enzimas modificando el metabolismo (Kirschner et al. 2009).

Los cambios en el perfil energético de la célula también influyen en el metabolismo de lípidos, estos fenómenos se encuentran gobernados por la vía de señalización de AMPK. Esta kinasa es un complejo heterotrimérico con una subunidad catalítica (α) y dos regulatorias (β y γ) (Woods et al. 1996). Se han identificado diversas isoformas de todas las subunidades de AMPK, las cuales pueden formar 12 complejos distintos que muestran diferentes propiedades (Hardie y Carling 1997). En el tejido adiposo, la isoforma más abundante de la subunidad catalítica es la $\alpha 1$

(Lihn et al. 2004; Daval et al. 2005). La principal función de AMPK es detectar los niveles de AMP o bien, la relación de AMP/ATP, que al estar elevada denota un panorama de baja energía celular, para activar las rutas catabólicas que producen ATP y desactivar las anabólicas consumidoras de energía para así mejorar el perfil energético (Daval et al. 2006).

La activación de AMPK se da por fosforilación en su residuo Thr-172 (Hardie y Carling 1997), como resultado de la acción de dos diferentes cinasas: la Cinasa Hepática B1 (Liver Kinase B1, LKB1, EC 2.7.11.1) (Hawley et al. 2003; Woods et al. 2003; Shaw et al. 2004) y la Cinasa de Calmodulina dependiente de Ca tipo β (Ca^{2+} / calmodulin-dependant protein Kinase β , CaMK β , EC 2.7.11.17) (Hawley et al. 2005; Woods et al. 2005). En años recientes, se ha reportado otros mecanismos que pueden activar a AMPK iniciados por especies reactivas de oxígeno (Hawley et al. 2010) y daño en el DNA (Fu et al. 2008; Ji et al. 2010; Sanli et al. 2010) los cuales comprenden oxidación o adición de glutatión a residuos de cisteína de la subunidad catalítica (Zmijewski et al. 2010) o la acción de una cinasa distinta a LKB1 y CaMK β aún desconocida (Alexander et al. 2010).

AMPK actúa sobre proteínas participantes involucradas en el metabolismo de lípidos como acetil-CoA carboxilasa 1 y 2, cuya actividad se ve reducida por la acción de la cinasa (Sullivan et al. 1994; Daval et al. 2005). La disminución de la actividad de acetil-CoA carboxilasa 1 provoca que el proceso de lipogénesis de novo sufra una regulación negativa debido a que disminuye la concentración de Malonil-CoA que sirve como sustrato inicial de la ácido graso sintasa. Aunque la fosforilación de acetil-CoA carboxilasa-2 por AMPK provoca también que la concentración de Malonil-CoA disminuya, esta enzima se encuentra en la matriz mitocondrial donde el compuesto funciona como un inhibidor de la Carnitin Palmitoil Transferasa-1.

En el tejido adiposo AMPK puede ser activada por ejercicio, ayuno y exposición al frío (Mulligan et al. 2007; Daval et al. 2005; Koh et al. 2007) provocando la disminución antes mencionada en los niveles de Malonil-CoA debido a la fosforilación de acetil-CoA carboxilasa 1 (Park et al. 2002). Existen reportes de que estos efectos son concomitantes con una reducción en la producción del RNAm de enzimas lipogénicas en el tejido adiposo (Orci et al. 2004), así como la modificación de los estados de fosforilación en el hígado de proteínas participantes en esta ruta (Aguilera-Méndez y Fernández-Mejía 2012). Esta reducción en la lipogénesis concuerda con otro

efecto que ha sido adjudicado a la activación de AMPK que es la reducción de la adiposidad, la cual se refiere a una disminución en la masa adiposa del cuerpo (Rossmeisl et al. 2004).

En adipocitos se ha reportado la capacidad de AMPK para inhibir la lipogénesis regulando directamente enzimas y factores transcripcionales relacionados al metabolismo de lípidos (Sullivan et al. 1994; Ahmadian et al. 2011; Li et al. 2011), lo que ha provocado el desarrollo de una gran cantidad de trabajos acerca del efecto de dicha cinasa sobre la regulación del metabolismo lipídico en el tejido adiposo. Como ya se ha establecido, AMPK aumenta la actividad oxidativa en las células. Pese a esto, en lo que respecta a la lipólisis aún se considera controversial tanto el efecto que ejerce como el mecanismo que utiliza AMPK sobre esta ruta metabólica en el tejido adiposo (Ahmadian et al. 2011). Desde 1989 se han publicado reportes acerca del tema. El primer trabajo que salió a la luz pública estableció que AMPK fosforila a la Lipasa Sensible a Hormonas en su residuo de Ser565 sin modificar su actividad basal pero previniendo el incremento en esta al no permitir la fosforilación adicional de la lipasa en Ser563 por la acción de PKA (Garton et al. 1989). A este trabajo se han unido una serie de reportes que apoyan el “efecto clásico” de AMPK sobre la ruta lipolítica en el tejido adiposo e incluso algunos de los más recientes han robustecido esta posición al reportar que otro mecanismo por el cual AMPK disminuye la tasa lipolítica es la inhibición de la Lipasa de Triglicéridos de Tejido Adiposo mediante su inhibición en Ser406 (Ahmadian et al. 2011). Existe incluso un estudio sobre control glicémico, lipídico y reducción de peso corporal en ratones con obesidad inducida por diabetes y por background genético donde al activar AMPK se encuentra reducción en la lipólisis del tejido adiposo, resultado que es utilizado para explicar los demás efectos del agonista de la cinasa sobre el metabolismo de los roedores (Anil et al. 2014). No obstante, desde 1998 algunos trabajos que demostraban una relación directamente proporcional entre AMPK y la actividad lipolítica en el tejido adiposo comenzaron a hacerse públicos. En ese año se publicó un trabajo que reportaba un aumento en la actividad de AMPK como consecuencia de un incremento en la ruta de las MAPK como respuesta a la estimulación adrenérgica con isoproterenol en ratas (Moule & Denton 1998). De la misma manera que con la ideología clásica, numerosos trabajos han apoyado la teoría de una relación directa entre AMPK y la actividad lipolítica e incluso existen trabajos recientes que han encontrado aumentos parados de actividad de AMPK y lipólisis en el tejido adiposo de ratas como respuesta al tratamiento con extractos vegetales (Ok et al. 2013; Chen et al. 2014).

Aunado a este controvertido panorama, en el 2006 un trabajo publicado por Watt et al. demostró que el efecto de AMPK sobre la lipólisis podía ser ambos, estimulador o inhibitorio, según el orden en que las células cultivadas recibieran los estímulos, AICAR para activar AMPK y epinefrina para estimular la lipólisis por la ruta adrenérgica; cuando el primer estímulo recibido era la epinefrina la lipólisis no era reducida por la activación de AMPK pero en el orden inverso el resultado fue contradictorio. Además de esto, dicho estudio definió importantes diferencias en la regulación de AMPK y del proceso lipolítico entre el tejido adiposo y el músculo esquelético (Watt et al. 2006). Por otro lado existen autores que aseguran que AMPK puede incrementar su actividad como consecuencias de un aumento en la lipólisis (Gauthier et al. 2008) o incluso que la relación AMPK-lipólisis necesita de la activación selectiva de los complejos de AMPK que tienen la variante 2 de la subunidad catalítica α (Souza et al. 2011).

2. Justificación.

El estudio de las vitaminas han puesto de manifiesto que además de su efecto clásico, las vitaminas poseen otros mecanismos de acción y que éstos pueden variar dependiendo de su concentración (Carlberg 1999; Al-Mohaisen et al. 2010). El conocimiento de los mecanismos moleculares de las vitaminas sobre la expresión genética ha permitido la comprensión de sus efectos sobre diversas funciones biológicas. Los estudios de vitaminas se han llevado a cabo principalmente sobre las especies liposolubles A y D (Carlberg 1999), pero se conoce poco sobre los efectos de las vitaminas hidrosolubles en la expresión de genes.

La biotina es una vitamina del complejo B cuya función es participar como grupo prostético de las carboxilasas. Se ha encontrado que en dosis farmacológicas es capaz de modificar la expresión de genes y diversas funciones biológicas mediante un mecanismo que no se encuentra relacionado con su acción como grupo prostético. Este efecto es intrigante ya que tradicionalmente se ha considerado que el exceso de las vitaminas hidrosolubles son eliminadas por el organismo. Sin embargo, cabe señalar que otra vitamina del complejo B, la niacina o vitamina B3 participa metabólicamente en concentraciones de 16 mg como cofactor de enzimas en forma de NAD/NADP, en tanto que en concentraciones farmacológicas de 500 a 3,000 mg, tiene efectos sobre diversas células actuando a través de un receptor de membrana tipo Gi mediante un mecanismo independiente a su acción fisiológica como cofactor de enzimas (Al-

Mohaissen et al. 2010). Como se señaló previamente en la Introducción, la biotina en concentraciones farmacológicas entre 30 a 650 veces sus requerimientos diarios de 30 μg ., disminuye las concentraciones de lípidos sanguíneos en individuos normo (Steigerwal & Bohele 1962; Marshall & Kliman 1980) (Larrieta et al. 2010) (Aguilera-Mendez y Fernandez-Mejia 2012). e hiperlipémicos (Dokusova & Krivoruchenko 1972a; Marshall et al. 1976; Báez-Saldaña & Ortega 2004; Singer & Geohas 2006; Revilla-Monsalve et al. 2006; Geohas et al. 2007) (Sahin et al. 2013). Se conoce poco sobre los mecanismos moleculares mediante los cuales esta vitamina produce sus efectos. En estudios realizados previamente, nuestro grupo de trabajo reportó que la biotina disminuye la expresión de genes de enzimas y factores transcripcionales de la vía lipogénica en ratones normolipémicos y que estos efectos difieren entre el hígado y el tejido adiposo % (Larrieta et al. 2010). De igual manera se demostró que dicho efecto hipolipemiante está relacionado con un aumento en las concentraciones de GMPc y la activación de la proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK) en el hígado (Aguilera-Mendez y Fernandez-Mejia 2012). Se ha documentado que las acciones farmacológicas de la biotina difieren entre los tejidos y que la AMPK es regulada de manera tejido-específica. En este proyecto proponemos estudiar los efectos de la biotina sobre estas proteínas reguladoras del metabolismo de los lípidos en el tejido adiposo. El proyecto se realizó en un modelo experimental de ratón normolipémico previamente usado en el laboratorio en donde se han observado los efectos farmacológicos de la vitamina. Los resultados permitirán ampliar el conocimiento actual sobre el efecto de la biotina en el adipocito.

3. Hipótesis.

La suplementación con biotina modifica el metabolismo de lípidos en el tejido adiposo mediante un mecanismo asociado a la Proteína Cinasa Dependiente de AMP.

4. Objetivo General.

Determinar el efecto de la suplementación con biotina sobre la forma activa de la AMPK y de distintas proteínas que son reguladas por ésta.

5. **Objetivos Particulares.**

Determinar los efectos que produce la administración durante 8 semanas de una dieta suplementada con biotina mediante el análisis de:

- La concentración de GMPc en el tejido adiposo.
- El estado de fosforilación de la enzima AMPK en el tejido adiposo, como enzima clave en la regulación del metabolismo energético.
- El estado de fosforilación de las enzimas Acetil-CoA Carboxilasa-1 y Acetil-CoA Carboxilasa-2 en el tejido adiposo como puntos de regulación en el metabolismo de lípidos responsivos a la activación de AMPK.
- La tasa lipolítica basal del tejido adiposo.

6. Materiales.

6.1 Dietas de alimentación para ratones.

Las dietas con las que fueron alimentados los animales de experimentación durante el tratamiento fueron obtenidas de la compañía Harlan Teklad (WI, EUA) con las siguientes denominaciones:

- 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 ambas dietas ha sido publicada anteriormente (Báez-Saldaña y Ortega 2004).

6.2 Reactivos y Soluciones.

Extracción y cuantificación de proteínas totales

- Solución de lisis (HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 0.1%, Glicerol 1%, 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 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)
- Reactivo de Bradford para cuantificación de proteína (Bradford Protein Assay, Bio-Rad)

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 (SIGMA) 1.5 M pH 8.8 y Tris-base 1 M pH 6.8
- SDS (SIGMA) 10 %
- TEMED (SIGMA)
- Persulfato de amonio 10 % (SIGMA)

- Solución amortiguadora de corrida (Glicina 192 mM, Tris-base 25 mM y SDS 0.1 %)

Transferencia en cámara húmeda

- Membrana de nitrocelulosa de 0.45 μm (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)

Tinción de membrana con rojo de Ponceau

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

Inmunodetección

- Solución de TBS 1X (Tris-base 100 mM y NaCl 150 mM)
- Solución de TBS-T 0.1% (Solución de TBS 1X y 0.1 % de Tween 20)
- Solución de bloqueo (5% de leche libre de grasa Blotto marca Santa Cruz Biotechnology en solución de TBS-T 0.1 %)
- Anticuerpos policlonales anti-fosfo-ACC-1, anti-AMPK- α y anti-fosfo-AMPK- α , Cell Signaling; anti-ACC-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)

Cuantificación de GMPc.

- Estuche comercial de reactivos para la detección colorimétrica de GMPc basado en ELISA (Cyclic GMP EIA kit, Cayman Chemical, Ann Harbor, MI, EUA).

7. Metodología.

7.1. Modelo Experimental.

Se utilizó el modelo experimental previamente usado por nuestro grupo, (Larrieta et al. 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 que se señalan. 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 una dieta que contiene 97.7 mg de biotina/kg de alimento (TD-01363, Harlan Teklad). 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 aproximadamente 56 veces la concentración del control, proporción comparable a la de los suplementos vitamínicos que contienen biotina y son recomendados para el tratamiento de dislipidemia (Albarracin et al. 2007; 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 sometieron a un período de ayuno de 16 h, se anestesiaron con Sevoflurano® (Sevoflurano), se les extrajo sangre y se les extirparon ambos paquetes de tejido adiposo epididimal. Al término del procedimiento quirúrgico, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical.

7.2. Cuantificación de Proteínas.

El método de Bradford para la cuantificación de proteínas se basa en el hecho de que el reactivo utilizado contiene cobre (como colorante Azul brillante de Coomassie G 250) en solución con ácido ortofosfórico y metanol. Cuando la proteína se une al cobre, su longitud de onda de máxima absorción cambia de 465 nm a 595 nm (Bradford 1976). Este método es altamente sensible y lineal. Se utilizó albúmina de suero bovino (BSA) como estándar en rango de 1-20 µg/µL. La cuantificación proteica se realizó utilizando el método comercial Kit Protein Assay siguiendo las

instrucciones del fabricante (Bio-Rad). Brevemente, a 798 μL de agua grado MiliQ se le agregaron 2 μL de las muestras a determinar y 200 μL del reactivo comercial, se mezclaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min, se midió la absorbancia del blanco, los patrones y las muestras a 595 nm en un volumen final de 1 mL en cubetas de plástico óptico de 1 cm de longitud del paso de luz.

7.3. Análisis de Proteínas por Western Blot.

Se utilizó este método para cuantificar la abundancia de las proteínas en su forma total y fosforilada. Se homogenizaron 250 mg de tejido adiposo epididimal con un homogenizador de tejidos tipo politron en solución de lisis fría. Se centrifugaron los extractos de tejido a 12000*g durante 15 minutos a 4°C para eliminar material insoluble y la concentración de proteínas se cuantificó por el método descrito previamente. Se cargaron un total de 50 μg de proteína por carril en un gel de SDS-PAGE al 10% para la detección de AMPK o al 8% para las isoenzimas de acetil.CoA carboxilasa, usándose un aparato para electroforesis vertical “Mini-Protean III” (Bio-Rad).

La electrotransferencia de las proteínas desde el gel de poliacrilamida hacia membranas de nitrocelulosa se realizó durante 4 h a 50 V (voltage constante) con un aparato de electrotransferencia húmeda (Bio-Rad). Al terminar, se lavó la membrana con TBS 1X y la eficiencia de la transferencia se comprobó con solución colorante rojo de Ponceau. Este colorante tiñe las proteínas de color rojo en una forma inespecífica, permitiendo comprobar su integridad y su correcta transferencia de manera general. Para eliminar la tinción se lavó la membrana dos veces con TBS-T 0.1 % durante 5 min. La membrana se bloqueó con solución de bloqueo por 1 h a temperatura ambiente para impedir uniones inespecíficas con el anticuerpo primario. Después de bloquear se incubó durante toda la noche (14 hs) a 4°C, con los respectivos anticuerpos primarios. Al día siguiente se lavó cuatro veces durante 5 min con solución TBS-T 0.1% y se incubó con el anticuerpo secundario policlonal anti-IgG-HRP correspondiente en solución TBS-T 0.1% con 5% de leche por 1 h a temperatura ambiente, al terminar se lavó nuevamente en la forma ya descrita.

Se añadió solución de quimioluminiscencia a las membranas y se detectaron las bandas inmunorreactivas con el equipo Molecular Imager Chemidoc XRS (Bio-Rad). La intensidad de las

bandas se cuantificó digitalmente por densitometría usando el software Image J 1.40 (HIMH, Bethesda, MD, USA). Para corroborar la homogeneidad en la cantidad de proteínas, se reutilizaron las membranas para detectar una proteína de expresión constante susceptible de ser utilizada como control de carga (α -Tubulina). Las membranas fueron sometidas a un proceso de “stripping”, que consiste en la desunión de los anticuerpos para poder proceder a incubar con un anticuerpo primario diferente sin que haya una interferencia entre ellos. Se lavaron las membranas con la solución de stripping durante 30 min en agitación suave y después se lavaron 3 veces durante 5 min con TBS-T 0.1% con agitación fuerte para volver a ser bloqueadas e incubadas.

7.4. Cuantificación del Contenido de GMPc en el Tejido Adiposo.

Se realizó mediante la detección colorimétrica por inmunoensayo enzimático competitivo. La construcción de la curva patrón, así como la determinación de GMPc en las muestras de interés se llevaron a cabo bajo las especificaciones del fabricante (Cayman Chemical Company, Ann Harbor, MI, USA). La concentración de GMPc en cada una de las muestras se determinó después de realizar las correcciones matemáticas correspondientes. Brevemente: los tejidos se congelaron en nitrógeno líquido inmediatamente después de ser retirados del animal de experimentación y fueron conservados a -70°C hasta su utilización. Las muestras se homogenizaron en una solución acuosa de ácido tricloroacético utilizando un homogenizador de tejidos tipo politrón y manteniendo la muestra en hielo. Después de centrifugar a $1500 \times g$ por 10 min, el sobrenadante se colocó en tubos limpios y se lavó con éter saturado de agua, el cual fue removido por calentamiento a 70°C . Las muestras se colocaron en una placa óptica de plástico de 96 pozos mezclándose con un suero anti-GMPc. La placa fue incubada en refrigeración durante 18 h y después de lavar 3 veces con un buffer de lavado proporcionado por el fabricante, se añadió la solución rastreadora de GMPc a las muestras. Se tomaron lecturas de densidad óptica a 405 y 420 nm. Los datos fueron procesados de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

7.5. Cuantificación de la Actividad Lipolítica.

La cuantificación de la tasa lipolítica del tejido adiposo epididimal se llevó a cabo a través de la cuantificación colorimétrica indirecta del glicerol liberado por las células grasas aisladas del

tejido adiposo epididimal de los animales de experimentación, en condiciones apropiadas para que la lipólisis fuera llevada a cabo.

7.5.1. Aislamiento de Adipocitos.

Se realizó mediante la técnica reportada por Rodbell (1961), con ligeras modificaciones y estandarizada para ser realizada a microescala. Una vez que el animal de experimentación se encontró debidamente anestesiado, se extrajeron ambos paquetes de grasa epididimal, cortando con cuidado para evitar que las venas principales fueran cortadas y la sangre contaminara el tejido. Los paquetes de grasa se colocaron en una solución de Ringer-Krebs adicionada con Albúmina Sérica Bovina libre de ácidos grasos (4%) y colagenasa de rábano picante tipo II (1 mg/mL) y se trituraron mecánicamente con tijeras para obtener trozos de tejido de tamaño pequeño (3 a 5 mm). La suspensión de tejido adiposo se sometió a un proceso de digestión enzimática durante 30 min, a una temperatura de 37 °C en agitación constante (200 rpm) en un baño metabólico. La composición de la solución de Ringer-Krebs se detalla en la tabla 1.

Tabla 1. Composición de la solución Ringer-Krebs utilizada para la digestión de tejido adiposo y aislamiento de adipocitos.

Compuesto	Concentración Final
NaCl 4.5%	100 mL
KCl 7%	4 mL
KH ₂ PO ₄ 10.5%	1 mL
MgSO ₄ 19.1%	1 mL
NaHCO ₃ 6.5%	1 mL
Agua	514 mL
CaCl ₂ 2.5 mM	231.39 mg
HEPES 25 mM	3.7592 g
Glucosa 2mM	227.16 mg
Adenosina 2nM	3.3 ng/mL

Transcurrido el período de digestión, la suspensión de células se pasó a través de un filtro de nylon para separar las células grasas de la fracción estromo-vascular del tejido hidrolizado. Los adipocitos aislados se lavaron 2 veces con un volumen de solución Ringer-Krebs con Albúmina libre de ácidos grasos (1%) a pH 7.5 para eliminar los residuos de colagenasa y se separaron de la solución mediante centrifugación suave (1 min, 1000 rpm). Se evitó que el paquete celular

permaneciera bajo condiciones ambientales por más de 30 min para evitar que la supervivencia celular fuera afectada.

7.5.2. Incubación Lipolítica y Cuantificación de Glicerol.

Se llevó a cabo mediante una adaptación a microescala de la técnica de Honnor (Honor et al. 1985). En microtubos se colocó el medio de incubación para la lipólisis de los adipocitos que consistió en solución de Ringer-Krebs con Albúmina libre de ácidos grasos (4%). El 10% del volumen de reacción fue ocupado por las células grasas. Los tubos se incubaron a 37 °C durante 45 min con agitación moderada (150 rpm).

Para detener la reacción una vez transcurrido el tiempo necesario, los microtubos se colocaron en un baño de hielo durante 5 min. Después, se centrifugaron a 13500 rpm durante 10 min a 4 °C. Se tomó la fase líquida que se forma entre el pastel de grasa flotante y el paquete celular que queda al fondo del tubo y se pasó a un nuevo microtubo para evitar contaminaciones que puedan causar interferencia en la determinación de glicerol. Se tomó una alícuota de 150 µL de la fase que contiene el glicerol y se hizo reaccionar durante 15 min a 37 °C en agitación moderada (150 rpm) con una mezcla de reacción cuya composición detallada se encuentra en la tabla 2.

Tabla 2. Composición de mezcla de reacción para la determinación colorimétrica indirecta de glicerol.

Triton X-100	0.008000 g
MgSO ₄	0.009800 g
HEPES	0.476600 g
EDTA	0.007400 g
4-amoniantipirina	0.020300 g
4-clorofenol	0.006940 g
ATP	0.022040 g
Peroxidasa	0.000512 g
Glicerol-3-P-oxidasa	1.5 UI
Glicerol cinasa	4.5 UI

Transcurrido el tiempo de reacción, la concentración de glicerol se determinó mediante la densidad óptica de las muestras a 505 nm reportándose los resultados como µmoles de glicerol por unidad de volumen de células. Para la determinación de la concentración se debe construir

una curva patrón de glicerol utilizando como disolvente solución de Ringer-Krebs-Albúmina 4% que comprenda concentraciones desde 50 μmol hasta 1 mmol.

7.6. Análisis Estadístico.

Los cálculos necesarios para el análisis estadístico se realizaron mediante el programa informático *Statview* 4.57.0.0 de Abacus Concepts Inc (Berkeley, CA, USA). Los datos fueron presentados como el promedio de las mediciones \pm el error estándar (ES). Las diferencias significativas entre los grupos fueron determinadas mediante una prueba de Fisher no pareada. Se consideró que una diferencia significativa existe cuando el valor de $P < 0.05$.

8. Resultados.

8.1. Contenido de GMPc en Tejido Adiposo Epididimal

Un aumento en la concentración intracelular de GMPc ha sido reconocido como la base de la teoría más aceptada del mecanismo de acción de la biotina tanto *in vitro* (Solórzano-Vargas et al. 2002; De La Vega y Stockert 2000) como *in vivo* (Aguilera-Méndez y Fernández-Mejía 2012). Los resultados del efecto de la biotina sobre el GMPc se han obtenido en el tejido hepático, sin embargo no ha sido investigado en adipocitos. Debido a esto, analizamos los niveles de GMPc contenidos en el tejido adiposo epididimal de ratones a los que se les administró una dieta conteniendo 56 veces la cantidad de biotina presente en la dieta control. Como puede observarse en la figura 7, el consumo de la dieta suplementada con biotina originó un incremento en el contenido de GMPc del tejido adiposo de los animales de experimentación al comparar con el grupo control .

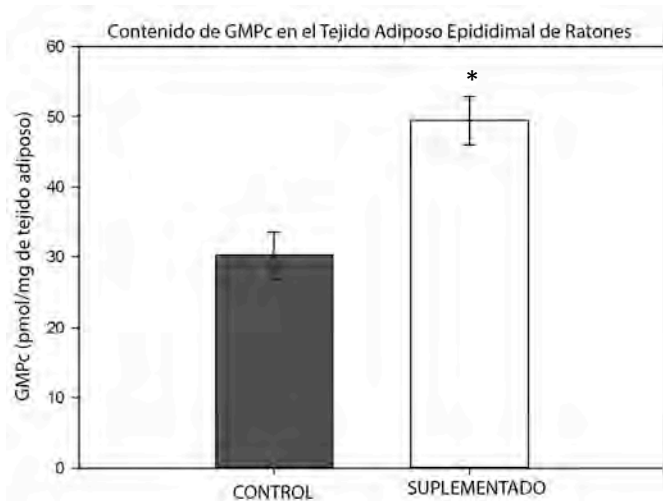


Figure 7. Contenido de GMPc en el tejidos adiposo epididimal de ratones control (■) y ratones suplementados con biotina (□). * indica diferencia estadística significativa comparado con el control. n = 9.

8.2. Análisis de Proteínas por Western Blot

8.2.1. AMPK.

Se ha encontrado que existen diferencias tejido-específicas en el efecto farmacológico de la biotina así como la regulación de AMPK (Larrieta et al. 2010; Lim et al. 2010; Bijland et al. 2013; Dakshinamurti & Li 1994). En este trabajo se determinó la acción de la suplementación de biotina sobre la AMPK del tejido adiposo. Los resultados revelaron la presencia más abundante de la forma activa de AMPK en los paquetes de tejido graso obtenido de los animales tratados en comparación con los animales sin tratar (Fig. 8).

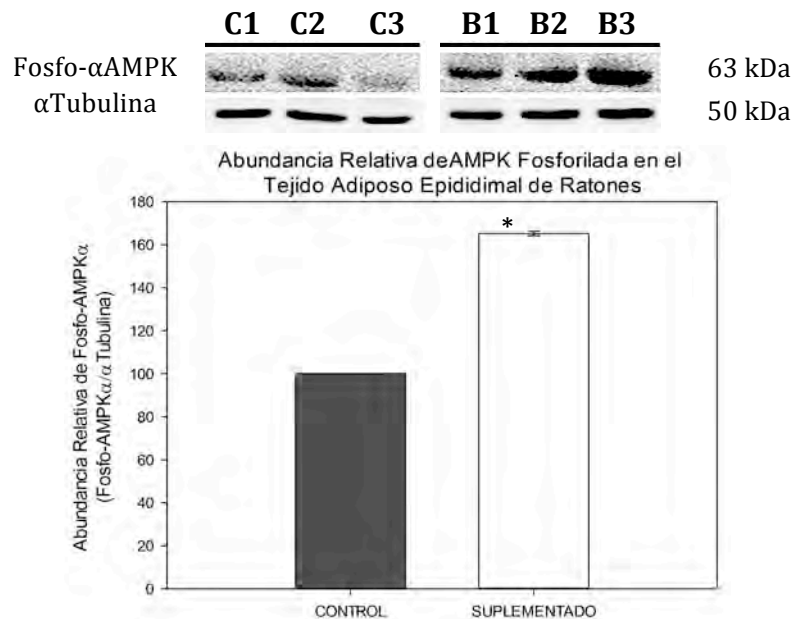


Figure 8. Análisis semicuantitativo por Western blot (arriba) y densitometría semicuantitativa (abajo) de Fosfo-AMPK (fosforilada) de tejido adiposo epididimal de ratones control (C, ■) y ratones suplementados con biotina (B, □). * indica diferencia estadística significativa comparado con el control. Imagen representativa de 4 experimentos independientes. n=16. Los carriles del Western blot se encuentran identificados en la parte superior y corresponden a extractos proteicos obtenidos del tejido adiposo de diferentes ratones de cada uno de los grupos experimentales utilizados.

Como indicativo del aumento en la actividad de la AMPK se procedió a analizar blancos moleculares de la AMPK, como lo son las isoformas fosforiladas de la acetil-CoA carboxilasa

8.2.2. Acetil-CoA carboxilasa-1 fosforilada.

El aumento en la forma fosforilada de esta carboxilasa provoca su inhibición, dando lugar a una disminución en la producción de malonil-CoA que tiene como significado la limitación del sustrato inicial de la lipogénesis utilizado por la ácido graso sintasa, disminuyendo en forma global el proceso lipogénico (Sullivan et al. 1994).

Para determinar la abundancia de la acetil-CoA carboxilasa Los resultados revelaron que la acetil-CoA carboxilasa-1 fosforilada se encontró en mayor abundancia en los extractos totales del

tejido adoso epididimal de los animales suplementados con biotina en comparación con los ratones pertenecientes al grupo control (Fig. 9). Debido al alto peso molecular de la enzima fue necesario efectuar el corrimiento de las proteínas en geles de acrilamida al 8%, esto provocó dificultades en el manejo de los geles y se observaron algunas diferencias en el control de carga. Sin embargo, esta diferencia estadísticamente significativa a pesar de la variación experimental que el tejido adiposo produce de forma intrínseca en estas técnicas.

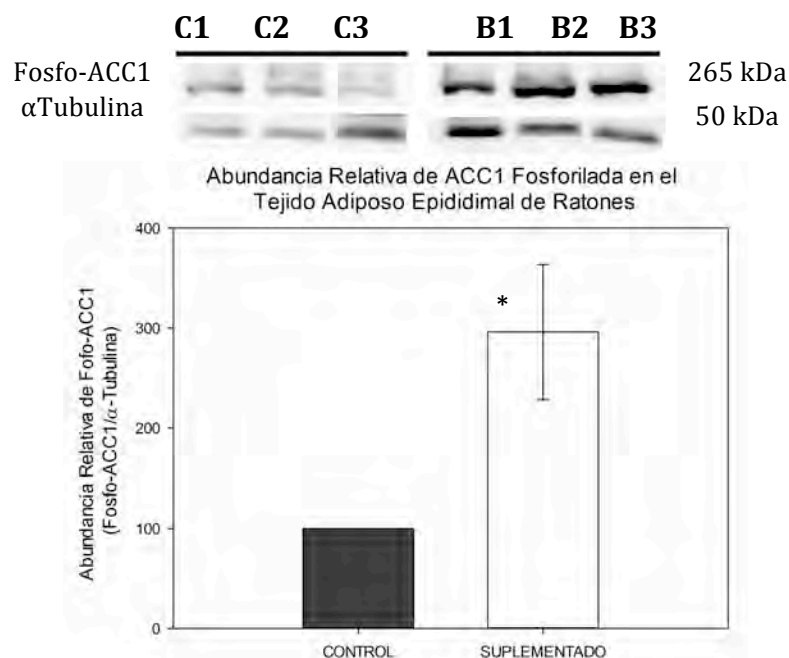


Figure 9. Análisis semicuantitativo por Western blot (arriba) y densitometría semicuantitativa (abajo) de ACC1-P (fosforilada) de tejido adiposo epididimal de ratones control (C, ■) y ratones suplementados con biotina (B, □). * indica diferencia estadística significativa comparado con el control. Imagen representativa de 4 experimentos independiente .con 4 muestras por grupo. n=16. Los carriles del Western blot se encuentran identificados en la parte superior y corresponden a extractos proteicos obtenidos del tejido adiposo de diferentes ratones de cada uno de los grupos experimentales utilizados.

8.2.3. Acetil-CoA carboxilasa-1 fosforilada-2

La fosforilación de la acetil-CoA carboxilasa-2 inhibe su actividad. A diferencia de la acetil-carboxilasa-1 que se encuentra en el citosol, la isoforma acetil-CoA carboxilasa-2 se localiza en la mitocondria y su función se encuentra involucrada en el proceso de internalización de los ácidos grasos hacia la matriz de la mitocondria para su posterior utilización en el proceso de β -oxidación (Abu-Elheiga et al. 2000), en donde la fosforilación de la acetil-CoA carboxilasa-2, origina una menor formación de Malonil-CoA,

lo que resulta en una des-represión de la inhibición de la beta-oxidación y, por ende, un aumento de la b-oxidación de éstos.. De igual manera al efecto observado sobre la acetil-CoA carboxilasa citoplásmica, la isoforma mitocondrial, se encontró con un estado de fosforilación aumentado en el grupo suplementado al comparar con el grupo control (Fig. 10).

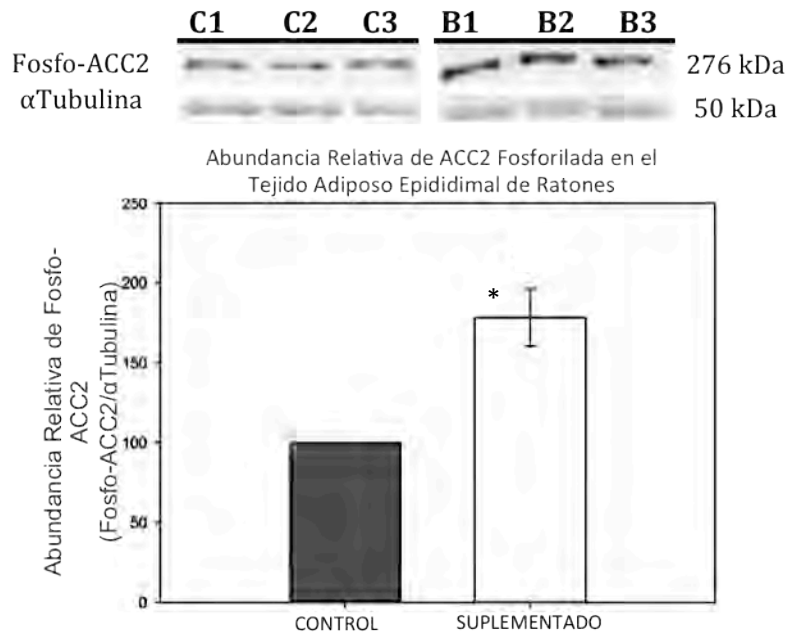


Figure 10. Análisis semicuantitativo por Western blot (arriba) y densitometría semicuantitativa (abajo) de ACC2-P (fosforilada) de tejido adiposo epididimal de ratones control (■) y ratones suplementados con biotina (□). * indica diferencia estadística significativa comparado con el control. Imagen representativa de 4 experimentos independiente con 4 muestras por grupo. n=16. Los carriles del Western blot se encuentran identificados en la parte superior y corresponden a extractos proteicos obtenidos del tejido adiposo de diferentes ratones de cada uno de los grupos experimentales utilizados.

8.3. Lipólisis.

La lipólisis en el tejido adiposo es un proceso crítico en la regulación de los niveles séricos de ácidos grasos no esterificados (Kolditz & Langin 2010). El efecto de la biotina sobre la lipólisis no ha sido reportada. Para determinar si este proceso participa en la disminución de los ácidos grasos provocada por el tratamiento con la vitamina (Boone-Villa et al. 2015) se determinó la tasa lipolítica analizando los niveles de glicerol liberado al medio de reacción por adipocitos aislados de la grasa epididimal de los animales sometidos a la dieta suplementada con biotina. No se

observaron diferencias significativas entre ambos grupos experimentales ($0.29 \pm 0.05 \mu\text{mol/mL}$ para el grupo control vs $0.33 \pm 0.08 \mu\text{mol/mL}$ para el grupo suplementado, Fig. 11).

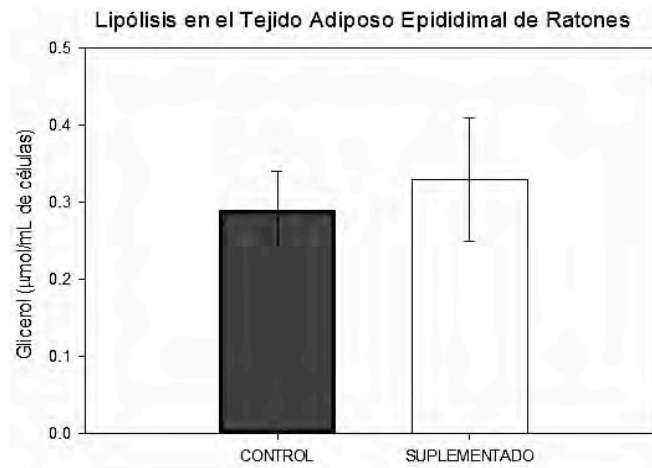


Fig. 11.- Efecto de la suplementación de biotina en el nivel de lipólisis basal en ratones suplementados con biotina durante 8 semanas. (■) Grupo control; (□) Grupo suplementado. La gráfica representa la media \pm EE.
* denota diferencia significativa entre los grupos experimentales ($P > 0.05$) ($n = 18$).

9. Discusión.

Numerosos estudios han demostrado que concentraciones farmacológicas de biotina provocan disminuciones en los niveles de los lípidos plasmáticos, estos efectos se han observado tanto en condiciones normo (Steigerwal & Bohele 1962; Marshall & Kliman 1980) (Larrieta et al. 2010) (Aguilera-Mendez y Fernandez-Mejia 2012) e hiperlipidémicas hiperlipémicos (Dokusova & Krivoruchenko 1972a; Marshall et al. 1976; Báez-Saldaña & Ortega 2004; Singer & Geohas 2006; Revilla-Monsalve et al. 2006; Geohas et al. 2007) (Sahin et al. 2013). Los mecanismos por los cuales la suplementación farmacológica de biotina modifica el metabolismo de lípidos son poco conocidos. Nuestro laboratorio ha estudiado los mecanismos mediante los cuales la biotina ejerce su efecto hipolipemiante, encontrando que la biotina disminuye la expresión de genes de enzimas y factores transcripcionales de la vía lipogénica en ratones normolipémicos y que este efecto difiere entre el hígado y el tejido adiposo % (Larrieta et al. 2010). Posteriormente, investigando las vías de señalización y mecanismos post-transcripcionales de este efecto se demostró que la suplementación con biotina disminuye la lipogénesis hepática mediante un mecanismo que involucra un aumento en el contenido de GMPc y la activación de la AMPK (Aguilera-Méndez y Fernández-Mejía 2012). El tejido adiposo blanco tiene un papel central en la homeostasis lipídica. Como se señaló en la introducción, se ha documentado que las acciones farmacológicas de la biotina difieren entre los tejidos (Larrieta et al. 2012; Dakshinamurti & Chauhan 1994) y que la AMPK es regulada de manera tejido-específica (Lim et al. 2010; Bijland et al. 2013). En este proyecto proponemos estudiar los efectos de la biotina sobre estas proteínas reguladoras del metabolismo de los lípidos en el tejido adiposo.

Los resultados obtenidos en este trabajo encontraron que en el tejido adiposo la suplementación de biotina en la dieta aumentó el contenido de GMPc. Este efecto ha sido descrito en extracto celulares de hígado (Vesely 1982), en línea celular hepática HepG2 el hígado (Solórzano-Vargas et al. 2002; De La Vega y Stockert 2000) y en hepatocitos aislados (Spence y Koudelka 1984). La mediación del GMPc en la acción de la biotina también fue encontrado por nuestro grupo en islotes pancreáticos aislados de ratas Wistar, efecto que es eliminado cuando se bloquea selectivamente la ruta de señalización de PKG proponiendo a ésta como la mediadora de los efectos de la biotina en los islotes pancreáticos (Vilches-Flores et al. 2010). En conjunto, estos

resultados indican que la activación de la vía de señalización de GMPc/PKG, es un denominador común en los efectos de la biotina en concentraciones farmacológicas.

Con el fin de investigar si la suplementación con biotina actúa sobre la activación de la AMPK en el tejido adiposo, de la misma manera que observamos en el hígado, estudiamos los efectos de la suplementación con biotina en el tejido adiposo epididimal mediante la determinación de la abundancia relativa de la especie activa de AMPK. Los resultados que se presentan en este trabajo muestran que la abundancia relativa de la forma activa de AMPK se encontró incrementada. De lo que podemos concluir que, en este modelo experimental, la acción de la vitamina es similar entre los dos tejidos.

Este trabajo ha demostrado que existe una relación entre la activación de AMPK y el aumento en el contenido de GMPc en el tejido adiposo. Además del incremento de la relación AMP/ATP, la cinasa hepática LKB1 (Hawley et al. 2003) y la Cinasa de Calmodulina dependiente de Ca, CaMK β (Hawley et al. 2005; Gormand et al. 2011), en estudios recientes (Deshmukh et al. 2010; Ramnanan et al. 2010; Souza et al. 2011) se ha encontrado que la ruta de señalización de GMPc/PKG actúa como un activador río arriba de AMPK. Deshmuk et al., en 2010 encontraron que un nivel aumentado de GMPc promueve el transporte de glucosa de manera concomitante con la activación de AMPK tanto en músculo esquelético como en línea celular muscular L6, efectos que fueron prevenidos al añadir un inhibidor de la Guanilato Ciclasa (Deshmukh et al. 2010). En el caracol desértico *Otala lacteal*, se llevaron a cabo experimentos donde se inhibió la actividad Guanilato Ciclasa para demostrar que la ruta de señalización de PKG regula la actividad de AMPK (Ramnanan et al. 2010). En cultivos de células de tejido adiposo humano, la activación de PKG-1 por acción de los péptidos natriuréticos incrementa los niveles de la forma activa de AMPK (Souza et al. 2011). Dada la complejidad que conlleva la corroboración de rutas metabólicas en modelos experimentales in vivo, el presente trabajo, aunado a los estudios anteriores de este laboratorio (Aguilera-Méndez & Fernández-Mejía 2012), representa un primer intento de elucidar la influencia de la suplementación de biotina en la concentración de GMPc que puede actuar como un activador de AMPK. Los resultados aquí presentados han dado una nueva luz a nuestra comprensión de los mecanismos de acción de la biotina sobre la relación que guardan dicho segundo mensajero y una de las enzimas más importantes en la regulación del metabolismo: AMPK. Sin embargo, son necesarios futuros estudios especialmente diseñados para esclarecer si

existe una relación causa-efecto directa entre el aumento de GMPc y la activación de AMPK en respuesta a la biotina en el tejido adiposo.

Estudios *in vitro* han encontrado que los péptidos natriuréticos, hormonas que aumentan la concentración de GMPc, incrementan la lipólisis y esto es atenuado al inhibir la actividad de AMPK indicando una relación directa entre la cinasa y el proceso lipolítico (Souza et al. 2011). En el presente trabajo encontramos que los paquetes de grasa epididimal de ratones alimentados con una dieta suplementada con biotina durante 8 semana incrementaron sus niveles de GMPc y la abundancia relativa de la forma activada de AMPK, pero sin modificar su tasa lipolítica. Como ha sido encontrado para algunos activadores de AMPK (Bijland et al. 2013), podemos especular que las diferencias entre la duración de los tratamientos y las condiciones de estudio pueden ser factores de las diferencias observadas entr los dos estudios. En el caso de los estudios por Souza los experimentos se llevaron a cabo *in vitro* y el tratamiento se realizó de forma aguda. En tanto que en nuestros estudios el tratamiento con un agonista del GMPc se llevó a cabo *in vivo* mediante la alimentación y la determinación de la lipólisis se realizó *ex vivo*. Estas diferencias podrían explicar la obtención de resultados contrastantes en la relación de GMPc, AMPK, y lipólisis, entre los dos trabajos. En apoyo a esta observación, es necesario recordar que, a pesar de la idea general de que la activación de AMPK reduce la actividad lipolítica, los trabajos que han sido realizados sobre este tema no han podido llegar a un concenso sobre la relación que tienen la cinasa y la actividad lipolítica (Garton et al. 1989; Moule & Denton 1998; Watt et al. 2006; Higa et al. 2014; Lee & Lee 2015; Rocha et al. 2015; Boone-Villa et al. 2015). Si bien varios estudios han reportado efectos anti-lipolíticos con la activación de AMPK (Garton et al. 1989; Daval et al. 2005; Koh et al. 2007; Anthony et al. 2009; Gaidhu et al. 2009; Lee & Lee 2015) otros estudios apoyan que la activación de esta cinasa estimula la lipólisis (Moule & Denton 1998; Watt et al. 2006; Ahmadian et al. 2011; Rocha et al. 2015) y que estos estudios se han realizado en su gran mayoría en condiciones *in vitro*. Recientemente, un estudio *in vivo* en el cual se alimentaron ratones C57BL/6J con diferentes dietas, una de ellas alta en grasa, combinado con entrenamiento físico reportó que la de AMPK se relacionó de forma negativa con la lipólisis en el grupo que recibió la dieta alta en grasa pero no fue entrenado, y presentó una relación directa con la tasa lipolítica en los animales que se alimentaron con dieta alta en grasa pero que llevaron a cabo un entrenamiento físico; esto pone en evidencia una relación AMPK-lipólisis dependiente de las condiciones generales del organismo (Higa et al. 2014). Otro factor que interviene en las

discrepancias encontradas es el orden de los estímulos lipolíticos. En el 2006 un trabajo publicó que si la lipólisis es inducida por adrenalina y después se añade AICAR al medio, la actividad lipolítica aumenta al igual que la fosforilación de AMPK pero la adición de los estímulos en orden inverso disminuyen la degradación de triglicéridos y la fosforilación de la lipasa pero se aumenta la fosforilación de la cinasa (Watt et al. 2006). Otro estudio reporta que el Orlistat, una droga que se utiliza para el tratamiento de la obesidad ya que previene parcialmente la absorción de la grasa dietaria mediante la inhibición de la actividad lipasa general, provoca incremento en la concentración de AMPc pero no en la actividad de AMPK inducida por forskolina concluyendo que el cambio en la actividad de la cinasa es un reflejo del incremento en la actividad lipolítica ocasionado por la activación de la PKA por la vía adrenergica y no tiene relación con la concentración del nucleótido o incluso la fosforilación de LKB1 (Gauthier et al. 2008).

En el tejido adiposo, AMPK juega un rol clave en la regulación del metabolismo de grasas (Bijland et al. 2013). Cuando AMPK se encuentra en su forma activa (fosforilada en su residuo Thr172), fosforila las isoenzimas acetil-Coa carboxilasa-1 y -2 inhibiendo su actividad (Daval et al. 2005; Watanabe-Kamiyama et al. 2008). En concordancia con esto, en este trabajo se encontró que la suplementación con biotina incrementa la presencia de la forma fosforilada de ambas isoenzimas de acetil-CoA carboxilasa. En cuanto a la acetil-CoA carboxilasa-1, el aumento en la forma fosforilada de esta enzima provoca su inhibición, dando lugar a una disminución en la producción de malonil-CoA que tiene como significado la limitación del sustrato inicial de la lipogénesis utilizado por ácido graso sintasa, disminuyendo en forma global el proceso lipogénico (Sullivan et al. 1994). En el año 2002 Levert y col. publicaron un reporte donde se demostró que un análogo cloroacetilado de la biotina que puede atravesar la membrana por difusión pasiva disminuye la actividad de acetil-CoA carboxilasa-1 sin afectar su expresión; de la misma forma el proceso de diferenciación de preadipocitos 3T3-L1 se ve afectado al inhibir la expresión de PPAR γ , STAT1 (Transductor de Señales y Transcripción Activada 1, Signal transducer and activated transcription 1) y STAT5A así como la acumulación de lípidos que ocurren normalmente en la adipogénesis. El bloqueo que esta sustancia provoca en la expresión de PPAR γ se traduce en una disminución de la diferenciación de las células en adipocitos maduros (Levert et al. 2002). Este trabajo postula la hipótesis de que tal derivado de la biotina interacciona con la Coenzima A intracelular y puede inhibir tanto la forma citosólica como la forma mitocondrial de la acetil-CoA carboxilasa, basada en que el derivado cloroacetilado de biotina no tuvo efecto sobre la actividad

de estas enzimas en extractos celulares aislados, aunque los datos de estos experimentos no son mostrados en la publicación (Levert et al. 2002). Estos resultados concuerdan con lo que hasta ahora ha reportado nuestro grupo de investigación acerca del efecto de la biotina sobre el metabolismo de lípidos ya que los resultados publicados anteriormente por nuestro grupo de trabajo demostraron que el tratamiento con la vitamina disminuyó teóricamente la actividad lipogénica en el tejido adiposo de ratones por medio de la expresión disminuída de genes que intervienen en esta ruta metabólica (Larrieta et al. 2010).

La fosforilación de la acetil-CoA carboxilasa-2, igualmente origina una menor formación de Malonil-CoA, sustancia sirve como inhibidor de la enzima Carnitil Palmitoil Transferasa-1 encargada de transportar los ácidos grasos al interior de este organelo para su oxidación dando como resultado una des-represión de la inhibición y, por ende, un aumento de la β -oxidación de éstos. Los datos obtenidos en este trabajo encontrando que que la suplementación con biotina incrementa la presencia de la forma fosforilada de la acetil-CoA carboxilasa-2, sugiere que la vitamina podría incrementar la oxidación de los ácidos grasos en el tejido adiposo. Resulta importante señalar que resultados previos de este laboratorio, efectuados en músculo, encontraron que la administración de biotina en la dieta generó un aumento en la forma fosforilada de la acetil-CoA carboxilasa-2 y en el flujo oxidativo de los ácidos grasos evidenciado por una disminución en la concentración de acil-carnitinas de cadena corta, mediana y larga en el músculo esquelético (Aguilera-Méndez 2012).

Los datos experimentales obtenidos este trabajo, han demostrado que la biotina no ejerce ningún efecto sobre la lipólisis en el tejido adiposo de ratones suplementados con la vitamina. Esto pudiera parecer contradictorio en el contexto de una disminución de los niveles séricos de triglicéridos y de ácidos grasos (Boone-Villa et al. 2015). Sin embargo, la disminución en la actividad lipogénica (menor producción de lípidos de novo) y la mayor actividad del flujo oxidativo de los ácidos grasos, sugerida por los experimentos en músculo y por el aumento de la acetil-CoA carboxilasa-2 en tejido adiposo, podrían explicar la disminución sistémica de triglicéridos y ácidos grasos que se observan en este modelo experimental.

Los datos experimentales obtenidos durante el desarrollo de este trabajo, han demostrado que el consumo de biotina en concentraciones farmacológicas modifica la actividad de la AMPK en

el tejido adiposo de ratones. Ya que la literatura cuenta con diversos reportes que relacionan la actividad de dicha enzima, o su ruta de señalización, con la producción, secreción y/o función de importantes moléculas regulatorias que son sintetizadas por el tejido graso como son la leptina (Harwood 2005; Tong & Harwood Jr. 2006), adiponectina (Dzamko & Steinberg 2009; Wang et al. 2011), Factor de Necrosis Tumoral α (Wiedmann et al. 2004; Kim et al. 2012), vimentina (Bézaire et al. 2009), resistina (Li et al. 2008; Yang et al. 2010) e Interleucinas 1 β y 6 (Rodríguez-Melendez et al. 2003; Jeong et al. 2009), abre la posibilidad de desarrollar diversos proyectos investigando el papel de la biotina a través de la ruta de señalización de AMPK sobre estas moléculas y sus posibles conotaciones metabólicas y/o aplicaciones médicas.

La evidencia obtenida en nuestro laboratorio, en un modelo experimental de ratones normales, de que la suplementación de biotina en la dieta, posee efectos hipotrigliceridemiantes (Larrieta et al. 2010; Aguilera-Méndez & Fernández-Mejía 2012) y aumenta la secreción de insulina (Vilches-Flores et al. 2010; Lazo de la Vega-Monroy et al. 2013), aunado con otros reportes que indican que estos efectos también se realizan en estados patológicos como la diabetes (Lazo de la Vega-Monroy et al. 2013; Hemmati et al. 2013), la hiperlipidemia (Geohas et al. 2007; Hemmati et al. 2013) y el síndrome metabólico (Sahin et al. 2013), sugiere que la biotina en concentraciones farmacológicas podría ser utilizada para la prevención y/o tratamiento estas afecciones. Es mayoritariamente aceptado que las dosis farmacológicas de biotina son inocuas 109. Sin embargo, como se señaló anteriormente en la sección de la Introducción, existen pocos estudios sobre el efecto tóxico de la biotina, la gran mayoría de los reportes señala el uso de concentraciones farmacológicas de biotina entre 30 y 650 veces los requerimientos diarios es seguro. Si bien, se ha considerado que el exceso de las vitaminas hidrosolubles son eliminadas por el organismo, el hecho de que la suplementación con biotina produzca en concentraciones farmacológicas, cambios sobre la expresión de genes y en funciones biológicas, requiere de estudios enfocados a determinar si el uso de la suplementación con biotina a largo plazo podría ser usado como una estrategia terapéutica sin riesgos.

10. Conclusiones.

Con base en los resultados obtenidos durante el desarrollo del presente trabajo, es posible concluir que la suplementación con biotina durante 8 semanas a ratones machos sanos provocó los siguientes efectos en el tejido adiposo:

- Aumento en el contenido de GMPc
- Incremento en la fosforilación de AMPK en Thr172
- Aumento en la fosforilación de ACC1 (Ser79)
- Incremento en el estado de fosforilación de ACC2 (Ser219)
- No hay ninguna influencia del tratamiento sobre la lipólisis de los adipocitos.

Estos resultados demuestran que la biotina en concentraciones farmacológicas modifica el metabolismo de lípidos en el tejido adiposo influyendo sobre la expresión de enzimas reguladoras de las vías de lipogénesis y de β -oxidación de los ácidos grasos. Esta acción está aunada a un incremento en la concentración de GMPc dentro del tejido, sin embargo no se detectó ninguna influencia del tratamiento sobre el proceso lipolítico (Fig. 12).

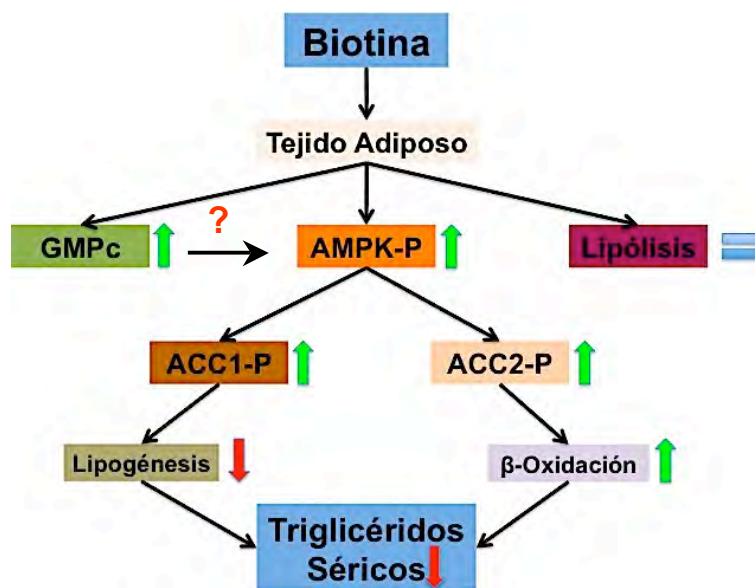


Fig. 12.- Diagrama General de la influencia de la suplementación con biotina sobre las distintas rutas metabólicas de los lípidos en el tejido adiposo de ratones sanos.

11. Perspectivas.

El modelo experimental aquí utilizado no es el ideal para demostrar los mecanismos de señalización utilizados por la vitamina debido a que los sistemas *in vivo* son altamente complejos. Una posible alternativa que puede proporcionar mayor control a los estudios, es utilizar un cultivo primario de adipocitos aislados de rata o bien, una línea celular modelo como los adipocitos 3T3-L1. Estos modelos permitirían el uso de efectores moleculares que permitan confirmar la participación de las vías de señalización propuestas en este trabajo (ODQ y Rp-GMPSc para inhibir Guanilato Ciclasa y PKG respectivamente; 8-Br-GMP y AICAR para activar Guanilato Ciclasa y AMPK respectivamente).

También se propone realizar experimentos que demuestren que la oxidación de ácidos grasos se encuentra incrementada mediante la determinación de la tasa de consumo de oxígeno de células adiposas mediante técnicas de respirometría. También es posible comprobar de forma directa si el proceso de β -oxidación se encuentra aumentado es la utilización de técnicas radiométricas que involucran el uso de ácido palmítico marcado radioactivamente (^{14}C) y rotenona, que es un inhibidor de esta ruta metabólica, como control negativo. Estos experimentos determinarían en forma directa la influencia de la biotina sobre la oxidación de ácidos grasos en el tejido adiposo.

Además de lo anterior, se recomienda complementar los resultados obtenidos en trabajos anteriores sobre la expresión de genes lipogénicos (Larrieta et al. 2010) mediante un análisis de la tasa de lipogénesis por métodos radiométricos para determinar si la disminución en la expresión de dichos genes tiene un reflejo real sobre el proceso de formación de ácidos grasos en el tejido adiposo, lo que daría una prueba definitiva del efecto hipolipemiente de la biotina.

Otra posibilidad de ampliar el conocimiento acerca del efecto de la suplementación con biotina sobre el metabolismo del tejido adiposo sería la determinación de este tratamiento sobre la secreción de importantes moléculas señalizadoras producidas por el tejido adiposo como leptina, adiponectina, Factor de Necrosis Tumoral α , vimentina, resistina, Interleucina 1β y 6, las cuales son sustancias secretadas por el tejido adiposo que tienen gran influencia sobre distintas funciones del organismo y podrían estar moduladas por la suplementación con biotina.

Estos estudios propuestos podrían realizarse tanto en nuestro modelo experimental como en modelos animales que presenten estados patológicos como la hipertrigliceridemia.

12. Bibliografía.

- Abu-Elheiga, L. et al., 2000. The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(4), pp.1444–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=26453&tool=pmcentrez&render type=abstract>.
- Abumrad, N.A. et al., 1993. Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *Journal of Biological Chemistry*, 268(24), pp.17665–17668. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0027240176&partnerID=40&md5=84643624f3bf87699d429a72ec480121>.
- Aguilera-Méndez, A., 2012. *Efecto de la Biotina Sobre Diferentes Vías Metabólicas de los Lípidos*.
- Aguilera-Méndez, A. & Fernández-Mejía, C., 2012. The hypotriglyceridemic effect of biotin supplementation involves increased levels of cGMP and AMPK activation. *BioFactors (Oxford, England)*, 38(5), pp.387–394.
- Ahmadian, M. et al., 2011. Desnutrin/ATGL is regulated by AMPK and is required for a brown adipose phenotype. *Cell metabolism*, 13(6), pp.739–48. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3148136&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 11, 2012].
- Al-Mohaisen, M., Pun, S.C. & Frohlich, J., 2010. Niacin: From Mechanisms of Action to Therapeutic Uses. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 10(3), pp.204–217. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77954719722&partnerID=tZOtx3y1> [Accessed November 4, 2015].
- Albarracín, C. 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. *Journal of the cardiometabolic syndrome*, 2(2), pp.91–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17684468>.
- Alexander, A. et al., 2010. ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(9), pp.4153–4158. Available at: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1206201109> [Accessed March 7, 2013].
- Andersen, F.A., 2001. Final report on the safety assessment of Biotin. *International Journal of Toxicology*, 20(SUPPL. 4), pp.1–12. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0035756644&partnerID=tZOtx3y1>.
- Angel, A. & Bray, G.A., 1979. Synthesis of fatty acids and cholesterol by liver, adipose tissue and intestinal mucosa from obese and control patients. *European Journal of Clinical Investigation*, 9(5), pp.335–362. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0018524408&partnerID=40&md5=fa81128762529f4f693e2daebeeac1bd>.
- Anil, T.M. et al., 2014. CNX-012-570, a direct AMPK activator provides strong glycemic and lipid control along with significant reduction in body weight; studies from both diet-induced obese mice and db/db mice models. *Cardiovascular diabetology*, 13(1), p.27. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3906767&tool=pmcentrez&ren>

dertype=abstract.

- Anthonsen, M.W. et al., 1998. Identification of novel phosphorylation sites in hormone-sensitive lipase that are phosphorylated in response to isoproterenol and govern activation properties in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 273(1), pp.215–221. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-2642614548&partnerID=40&md5=de3ace2c3c233c79df78399a2b425edd>.
- Anthony, N.M., Gaidhu, M.P. & Ceddia, R.B., 2009. Regulation of visceral and subcutaneous adipocyte lipolysis by acute AICAR-induced AMPK activation. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 17(7), pp.1312–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19214174> [Accessed December 4, 2012].
- Attwood, P. V., 1995. The structure and the mechanism of action of pyruvate carboxylase. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 27(3), pp.231–249. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0029035048&partnerID=40&md5=c5b86901152ee3aee5d4670f37c6ba7d>.
- Attwood, P. V & Wallace, J.C., 2002. Chemical and catalytic mechanisms of carboxyl transfer reactions in biotin-dependent enzymes. *Accounts of Chemical Research*, 35(2), pp.113–120. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0036183336&partnerID=40&md5=f8849eabb28294bb4ae4545427a80e79>.
- Báez-Saldaña, A. et al., 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. *The American journal of clinical nutrition*, 79(2), pp.238–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14749229>.
- Báez-Saldaña, A. & Ortega, E., 2004. Biotin deficiency blocks thymocyte maturation, accelerates thymus involution, and decreases nose-rump length in mice. *The Journal of nutrition*, 134(8), pp.1970–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15284385>.
- Bailey, L.M. et al., 2008. Artifactual detection of biotin on histones by streptavidin. *Analytical biochemistry*, 373(1), pp.71–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17920026> [Accessed December 4, 2012].
- Ballard, F.J., Hanson, R.W. & Leveille, G.A., 1967. Phosphoenolpyruvate carboxykinase and the synthesis of glyceride-glycerol from pyruvate in adipose tissue. *Journal of Biological Chemistry*, 242(11), pp.2746–2750. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/content/long/242/11/2746> [Accessed October 9, 2013].
- Ballhausen, D. et al., 2009. Evidence for catabolic pathway of propionate metabolism in CNS: expression pattern of methylmalonyl-CoA mutase and propionyl-CoA carboxylase alpha-subunit in developing and adult rat brain. *Neuroscience*, 164(2), pp.578–587. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-70349747285&partnerID=40&md5=66618ccc3a92f02f4afd89d3f31514aa>.
- Batenburg, J.J. & Whitsett, J.A., 1989. Levels of mRNAs coding for lipogenic enzymes in rat lung upon fasting and refeeding and during perinatal development. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1006(3), pp.329–334. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0024802442&partnerID=tZOtx3y1> [Accessed September 21, 2015].

- Baumgartner, E.R. & Suormala, T., 1997. Multiple carboxylase deficiency: Inherited and acquired disorders of biotin metabolism. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 67(5), pp.377–384. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0030869743&partnerID=tZOtx3y1>.
- Baumgartner, M.R. et al., 2001. The molecular basis of human 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency. *Journal of Clinical Investigation*, 107(4), pp.495–504. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0035114251&partnerID=40&md5=22ad1a8669d45f2cf354b92c707cf66b>.
- Bell, R.M. & Coleman, R.A., 1980. Enzymes of Glycerolipid Synthesis in Eukaryotes. *Annual Review of Biochemistry*, 49(1), pp.459–487. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.bi.49.070180.002331>.
- Berdanier, C.D., 1991. The BHE rat: an animal model for the study of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 5(8), pp.2139–2144.
- Bernlohr, D.A., Coe, N.R. & LiCata, V.J., 1999. Fatty acid trafficking in the adipocyte. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 10(1), pp.43–49. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0033069990&partnerID=40&md5=363652cb6bc5ad5fc3b98bd29c8e9d>.
- Bézaire, V. et al., 2009. Chronic TNF α and cAMP pre-treatment of human adipocytes alter HSL, ATGL and perilipin to regulate basal and stimulated lipolysis. *FEBS letters*, 583(18), pp.3045–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19695247> [Accessed December 4, 2012].
- Bijland, S., Mancini, S.J. & Salt, I.P., 2013. Role of AMP-activated protein kinase in adipose tissue metabolism and inflammation. *Clinical science (London, England : 1979)*, 124(8), pp.491–507. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23298225> [Accessed January 31, 2013].
- Boas, M.A., 1927. The effect of desiccation upon the nutritive properties of egg-white. *The Biochemical journal*, 21(3), pp.712–724. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1260675&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Bonjour, J., 1991. Biotin. In L. J. Machlin & M. Dekker, eds. *Handbook of vitamins: Nutritional, biochemical, and clinical aspects*. New York: Wiley Subscription Services, Inc., p. 403.
- Boone-Villa, D. et al., 2015. Effects of Biotin Supplementation in the Diet on Adipose Tissue cGMP Concentrations, AMPK Activation, Lipolysis, and Serum-Free Fatty Acid Levels. *Journal of Medicinal Food*, 18(10), pp.1150–6. Available at: <http://dx.doi.org/10.1089/jmf.2014.0170>.
- Boulware, S.D. et al., 1992. Diverse effects of insulin-like growth factor I on glucose, lipid, and amino acid metabolism. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 262(1 25-1), pp.E130–E133. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0026510708&partnerID=40&md5=1ae619d7fc3a5ca8dc2b62d1f8bb10be>.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), pp.248–254. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0017184389&partnerID=40&md5=d37800a613e1031390539ddeb76e860f>.

- Brasaemle, D.L., Rubin, B., et al., 2000. Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis. *The Journal of biological chemistry*, 275(49), pp.38486–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10948207> [Accessed November 15, 2012].
- Brasaemle, D.L., Levin, D.M., et al., 2000. The lipolytic stimulation of 3T3-L1 adipocytes promotes the translocation of hormone-sensitive lipase to the surfaces of lipid storage droplets. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1483(2), pp.251–262. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0033961989&partnerID=40&md5=acaeb5e595b817cd80fa7cd5b180beee>.
- Brownsey, R.W. et al., 2006. Regulation of acetyl-CoA carboxylase. *Biochemical Society Transactions*, 34(2), pp.223–227. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33645993596&partnerID=40&md5=7141998afa6bd64435bdb3afad3b1a12>.
- Carlberg, C., 1999. Lipid soluble vitamins in gene regulation. *BioFactors (Oxford, England)*, 10(2-3), pp.91–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10609868> [Accessed August 9, 2013].
- Cases, S. et al., 1998. Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(22), pp.13018–23. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=23692&tool=pmcentrez&render type=abstract>.
- Chauhan, J. & Dakshinamurti, K., 1988. Role of human serum biotinidase as biotin-binding protein. *Biochemical Journal*, 256(1), pp.265–270. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0023724757&partnerID=40&md5=e76df4e0e24455cf034a2dacef323d44>.
- Chauhan, J. & Dakshinamurti, K., 1991. Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats. *Journal of Biological Chemistry*, 266(16), pp.10035–10038. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2037560>.
- Cheema, S.K. & Thomas Clandinin, M., 1996. Diet fat alters expression of genes for enzymes of lipogenesis in lean and obese mice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1299(3), pp.284–288. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0005276095002197> [Accessed September 21, 2015].
- Chen, Y.C. et al., 2014. Methanolic extract of black garlic ameliorates diet-induced obesity via regulating adipogenesis, adipokine biosynthesis, and lipolysis. *Journal of Functional Foods*, 9, pp.98–108. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2014.02.019>.
- Clarke, S.D. & Jump, D.B., 1996. Polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. In *Journal of Nutrition*. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0029915914&partnerID=tZOTx3y1>.
- Cohen, N.D. & Thomas, M., 1982. Biotin Transport into Fully Differentiated 3T3-L1 Cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 108(4), pp.1508–1516.
- Collins, J.C. et al., 1988. Biotin-dependent expression of the asialoglycoprotein receptor in HepG2.

- The Journal of biological chemistry*, 263(23), pp.11280–3. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2457019>.
- Coppack, S.W. et al., 1989. Effects of insulin on human adipose tissue metabolism in vivo. *Clinical Science*, 77(6), pp.663–670. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0024842008&partnerID=40&md5=03b65fd61984db5b27eb5ce5c7a20736>.
- Cronan, J.E.J. & Waldrop, G.L., 2002. Multi-subunit acetyl-CoA carboxylases. *Progress in Lipid Research*, 41(5), pp.407–435. Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163782702000073>.
- Cross, D. a et al., 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, 378(6559), pp.785–9. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8524413> [Accessed May 24, 2013].
- Dakshinamurti, K. & Chauhan, J., 1994. *Vitamin Receptors . Vitamins as Ligands in Cell Communication* Cambridge ., Cambridge University Press. Available at:
<http://books.google.com.mx/books?id=RbGkNpRqZyoC>.
- Dakshinamurti, K. & Cheah-Tan, C., 1968. Biotin-mediated synthesis of hepatic glucokinase in the rat. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 127(0), pp.17–21. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5681418>.
- Dakshinamurti, K. & Hong, H.C., 1970. Regulation of key hepatic glycolytic enzymes. *Enzymologia biologica et clinica*, 11(5), pp.423–428. Available at:
<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0014913245&partnerID=40&md5=9c9ad6ba840113c9e7ace2596bd63388>.
- Dakshinamurti, K. & Li, W., 1994. Transcriptional regulation of liver phosphoenolpyruvate carboxykinase by biotin in diabetic rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 132(2), pp.127–132. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0028094488&partnerID=40&md5=20efbee8107c4a1f9867fc215cd11ffd>.
- Daval, M. et al., 2005. Anti-lipolytic action of AMP-activated protein kinase in rodent adipocytes. *The Journal of biological chemistry*, 280(26), pp.25250–7. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15878856> [Accessed November 29, 2012].
- Daval, M., Foufelle, F. & Ferré, P., 2006. Functions of AMP-activated protein kinase in adipose tissue. *The Journal of physiology*, 574(Pt 1), pp.55–62. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1817807&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 19, 2012].
- Deshmukh, a S. et al., 2010. Nitric oxide increases cyclic GMP levels, AMP-activated protein kinase (AMPK)alpha1-specific activity and glucose transport in human skeletal muscle. *Diabetologia*, 53(6), pp.1142–50. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2860569&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 9, 2013].
- Dokusova, O.K. & Klimov, A.N., 1967. Prevention of the development of experimental atherosclerosis by biotin [Predotvrashchenie biotinom razvitiia éksperimental'nogo ateroskleroza.]. *Doklady Akademii nauk SSSR*, 172(6), pp.1454–1456. Available at:
<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0014212839&partnerID=40&md5=dc793f93ecee6e127c7ffc9add5ee0a0>.

- Dokusova, O.K. & Krivoruchenko, I. V, 1972a. [The effect of biotin on the level of cholesterol in the blood of patients with atherosclerosis and essential hyperlipidemia]. *Kardiologija*, 12(12), p.113. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-18744419294&partnerID=40&md5=a7eaeac7eb89c07c0b0994f05dd7944a> [Accessed August 8, 2013].
- Dokusova, O.K. & Krivoruchenko, I. V, 1972b. The effect of biotin on the level of cholesterol in the blood of patients with atherosclerosis and essential hyperlipidemia [Vlianie biotina na uroven' kholesterina krovi u bol'nykh aterosklerozom i éssentsial'noï giperlipidemieï.]. *Kardiologiya*, 12(12), p.113. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-18744419294&partnerID=40&md5=a7eaeac7eb89c07c0b0994f05dd7944a>.
- Ducharme, N.A. & Bickel, P.E., 2008. Minireview: Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis. *Endocrinology*, 149(3), pp.942–949. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-40849145708&partnerID=40&md5=55fc0a8f07a7023852e8ee0248f2a86e>.
- Dzamko, N.L. & Steinberg, G.R., 2009. AMPK-dependent hormonal regulation of whole-body energy metabolism. *Acta physiologica (Oxford, England)*, 196(1), pp.115–27. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19245657> [Accessed December 4, 2012].
- Edwards, J.B. & Keech, D.B., 1968. Activation of pig heart propionyl-CoA carboxylase by potassium ions. *BBA - Enzymology*, 159(1), pp.167–175. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0014428380&partnerID=40&md5=71c445419fdadfa6a29c9724395f57e9>.
- Egan, J.J. et al., 1990. Control of endogenous phosphorylation of the major cAMP-dependent protein kinase substrate in adipocytes by insulin and β -adrenergic stimulation. *Journal of Biological Chemistry*, 265(31), pp.18769–18775. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0025131389&partnerID=40&md5=1fbc10a72411fb3f85c96dda5d0ffe6e>.
- Egan, J.J. et al., 1992. Mechanism of hormone-stimulated lipolysis in adipocytes: translocation of hormone-sensitive lipase to the lipid storage droplet. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(18), pp.8537–8541. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=49955&tool=pmcentrez&render type=abstract>.
- Fang, Y. et al., 2001. Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science*, 294(5548), pp.1942–1945. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0035976615&partnerID=40&md5=90547607d869ccd766abff38bdc339fc>.
- Fisher, R.M. et al., 2002. Fatty acid binding protein expression in different human adipose tissue depots in relation to rates of lipolysis and insulin concentration in obese individuals. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 239(1-2), pp.95–100. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-17644438820&partnerID=40&md5=b4f52e27565675b704a3e2052fec9198>.
- Fiume, M.Z., 2001. Final report on the safety assessment of biotin. *International journal of toxicology*, 20 Suppl 4(3), pp.1–12.
- Flier, J.S. et al., 1987. Severely impaired adiponin expression in genetic and acquired obesity. *Science*, 237(4813), pp.405–408. Available at:

<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0023663610&partnerID=40&md5=6ce92efd8a9bd457faf58955014c1772>.

- Food and Nutrition Board, 1989. *Recommended Dietary Allowances: 10th Edition*, National Academies Press. Available at: <http://books.google.com.mx/books?id=l6q-sDEO7CgC>.
- Foufelle, F. & Ferré, 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. *Biochemical Journal*, 366(2), pp.377–391. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0036711553&partnerID=40&md5=21cad052ae7c750e3206fb195747c19e>.
- Frayn, K.N. et al., 2003. Integrative physiology of human adipose tissue. *International Journal of Obesity*, 27(8), pp.875–888. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0042166015&partnerID=40&md5=648738a4c17673c24bbaaa860c2a6496>.
- Fredrikson, G., Tornqvist, H. & Belfrage, P., 1986. Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol. *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism*, 876(2), pp.288–293. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0022477311&partnerID=40&md5=f22fb49c7755332c8129887df1d7d0f5>.
- Fu, X. et al., 2008. Etoposide induces ATM-dependent mitochondrial biogenesis through AMPK activation. *PLoS one*, 3(4), p.e2009. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2329593&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 3, 2013].
- Gaidhu, M.P. et al., 2009. Prolonged AICAR-induced AMP-kinase activation promotes energy dissipation in white adipocytes: novel mechanisms integrating HSL and ATGL. *Journal of lipid research*, 50(4), pp.704–715. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2656664&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 14, 2012].
- Garcia, A. et al., 2004. The Amino and Carboxyl Termini of Perilipin A Facilitate the Storage of Triacylglycerols. *Journal of Biological Chemistry*, 279(9), pp.8409–8416. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-1542289077&partnerID=40&md5=2033ba53c85a495300b619bd81a12ca7>.
- Garton, a J. et al., 1989. Phosphorylation of bovine hormone-sensitive lipase by the AMP-activated protein kinase. A possible antilipolytic mechanism. *European journal of biochemistry / FEBS*, 179(1), pp.249–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2537200>.
- Gaudiot, N. et al., 1998. Modulation of white adipose tissue lipolysis by nitric oxide. *The Journal of biological chemistry*, 273(22), pp.13475–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9593681>.
- Gauthier, M. et al., 2008. AMP-activated Protein Kinase Is Activated as a Consequence of Lipolysis in the Adipocyte. POTENTIAL MECHANISM AND PHYSIOLOGICAL RELEVANCE. *The Journal of biological chemistry*, 283(24), pp.16514–16524.
- Geohas, J. et al., 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. *American Journal of Medical Sciences*, 333(3), pp.145–153.
- Giorgio, A.J. & Plaut, G.W.E., 1967. The effect of univalent cations of activities catalyzed bovine-liver propionyl-CoA carboxylase. *BBA - Enzymology*, 139(2), pp.487–501. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0014200132&partnerID=40&md5=92bf86e62cf0faa4774fb79f7ba92750>.
- Gorin, E., Tal-Or, Z. & Shafir, E., 1969. Glyceroneogenesis in adipose tissue of fasted , diabetic and triamcinolone treated rats . *European journal of biochemistry / FEBS*, 8(3), pp.370–375.
- Gormand, A.. et al., 2011. Regulation of AMP-activated protein kinase by LKB1 and CaMKK in adipocytes. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112(5), pp.1364–1375. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-79953703435&partnerID=40&md5=fe0ff9c48552f2d9120ae57de22bac75>.
- Granneman, J.G. et al., 2007. Analysis of lipolytic protein trafficking and interactions in adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 282(8), pp.5726–5735. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-34247168090&partnerID=40&md5=a993a150d08da5088952034830634861>.
- Greenberg, A Greenberg AS, Shen W-J, Muliro K, et al (2001) S. of L. and H.L. via the E.S.K.P.J.B.C. 276:45456–45461. doi: 10. 1074/jbc. M.S. et al., 2001. Stimulation of Lipolysis and Hormone-sensitive Lipase via the Extracellular Signal-regulated Kinase Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 276(48), pp.45456–45461. Available at: <http://www.jbc.org/content/276/48/45456.abstract>.
- Greenberg, A.S. et al., 1993. Isolation of cDNAs for perilipins A and B: Sequence and expression of lipid droplet-associated proteins of adipocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(24), pp.12035–12039. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0027145164&partnerID=40&md5=44f7eaa76599ce2da168574a536e11ad>.
- Griffin, J.B. et al., 2006. Biotin supplementation decreases the expression of the SERCA3 gene (ATP2A3) in Jurkat cells, thus, triggering unfolded protein response. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 17(4), pp.272–281. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33645102983&partnerID=40&md5=717dd120cbd83e5d1165b40cdf6c02f1>.
- Grober, J. et al., 1997. Characterization of the promoter of human adipocyte hormone-sensitive lipase. *Biochemical Journal*, 328(2), pp.453–461. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0030717136&partnerID=40&md5=422d0f26b9fc90d8cd9e43feb6a35a5f>.
- Grober, J. et al., 2003. Hormone-sensitive lipase is a cholesterol esterase of the intestinal mucosa. *Journal of Biological Chemistry*, 278(8), pp.6510–6515. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0037458548&partnerID=40&md5=1b28bf29dcfaf0ada7a27ff8bbf48fb2>.
- Haberlandt, E. et al., 2009. Epilepsy in patients with propionic acidemia. *Neuropediatrics*, 40(3), pp.120–125. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77449089049&partnerID=40&md5=428d446f939747edb479d9d691bf45ef>.
- Harant, I. et al., 1994. Response of fat cells to growth hormone (GH): Effect of long term treatment

- with recombinant human GH in GH-deficient adults. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 78(6), pp.1392–1395. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0028335102&partnerID=40&md5=c07b2eb7ae8a056bd66572b814ded82d>.
- Hardie, D.G. & Carling, D., 1997. The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? *European journal of biochemistry / FEBS*, 246(2), pp.259–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9208914>.
- Harwood, H.J., 2005. Treating the metabolic syndrome: acetyl-CoA carboxylase inhibition. *Expert opinion on therapeutic targets*, 9(2), pp.267–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15934915>.
- Hassan, Y.I. & Zemleni, J., 2006. Epigenetic Regulation of Chromatin Structure and Gene Function. *The Journal of nutrition*, (March), pp.1763–1765.
- Hawley, S.A. et al., 2005. Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell metabolism*, 2(1), pp.9–19. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16054095> [Accessed March 4, 2013].
- Hawley, S.A. et al., 2003. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRADalpha/beta and MO25alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *Journal of Biology*, 2(4), pp.28–40.
- Hawley, S.A. et al., 2010. Use of cells expressing gamma subunit variants to identify diverse mechanisms of AMPK activation. *Cell metabolism*, 11(6), pp.554–65. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2935965&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 15, 2013].
- Hayes, S. et al., 1984. RK bacterial test for independently measuring chemical toxicity and mutagenicity: Short-term forward selection assay. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 130(2), pp.97–106. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0165116184901092> [Accessed November 9, 2015].
- Healy, S. et al., 2009. Biotin is not a natural histone modification. *Biochimica et biophysica acta*, 1789(11-12), pp.719–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19770080> [Accessed May 6, 2013].
- Hemmati, M., Babaei, H. & Abdolsalehei, M., 2013. Survey of the effect of biotin on glycemic control and plasma lipid concentrations in type 1 diabetic patients in kermanshah in iran (2008-2009). *Oman medical journal*, 28(3), pp.195–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3679599&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 27, 2014].
- Higa, T.S. et al., 2014. Remodeling of white adipose tissue metabolism by physical training prevents insulin resistance. *Life Sciences*, 103(1), pp.41–48. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2014.02.039>.
- Hirsch, A.H. & Rosen, O.M., 1984. Lipolytic stimulation modulates the subcellular distribution of hormone-sensitive lipase in 3T3-L1 cells. *Journal of Lipid Research*, 25(7), pp.665–677. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0021204081&partnerID=40&md5=a64df757afae24bc17a085a78f12e84d>.

- Hla, T. et al., 2001. Lysophospholipids - Receptor revelations. *Science*, 294(5548), pp.1875–1878. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0035976579&partnerID=40&md5=bb1e144e95c2f04746aaf0113adf0783>.
- Holst, L.S. et al., 1996. Molecular cloning, genomic organization, and expression of a testicular isoform of hormone-sensitive lipase. *Genomics*, 35(3), pp.441–447. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0000537214&partnerID=40&md5=c4ff165e7ac7d0a11db53655649ad785>.
- Honor, R.C., Dhillon, G.S. & Londoss, C., 1985. cAMP-dependent Protein Kinase and Lipolysis in Rat Adipocytes. *The Journal of biological chemistry*, 260(28), pp.15122–15129.
- Horowitz, J.F. & Klein, S., 2000. Lipid metabolism during endurance exercise. *American Journal of Clinical Nutrition*, 72(2 SUPPL.), p.558S–563S. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0033837861&partnerID=40&md5=cfb91c0c80def18892a400f2a95b3d16>.
- Hymes, J., Fleischhauer, K. & Wolf, B., 1995. Biotinylation of histones by Human Serum Biotinidase: Assessment of Biotinyl-Transferase -Activity in Sera from Normal Individuals and Children with Biotinidase Deficiency. *Biochemical and Molecular Medicine*1, 56, pp.76–83.
- Hymes, J. & Wolf, B., 1996. Biotinidase and its roles in biotin metabolism. *Clinica Chimica Acta*, 255(1), pp.1–11. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0009898196063966>.
- Innis, S.M. & Allardyce, D.B., 1983. Possible biotin deficiency in adults receiving long-term total parenteral nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 37(2), pp.185–187. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0020640492&partnerID=40&md5=de1733a23ca5ddec50fd9f6789502430>.
- Iritani, N., 1992. Nutritional and hormonal regulation of lipogenic-enzyme gene expression in rat liver. *European Journal of Biochemistry*, 205(2), pp.433–442. Available at: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb16797.x>.
- Iritani, N., Fukuda, H. & Matsumura, Y., 1993. Lipogenic enzyme gene expression in rat liver during development after birth. *Journal of Biochemistry*, 113(5), pp.519–525. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0027157876&partnerID=tZ0tx3y1>.
- Isola, L.M. et al., 1995. 3T3 fibroblasts transfected with a cDNA for mitochondrial aspartate aminotransferase express plasma membrane fatty acid-binding protein and saturable fatty acid uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(21), pp.9866–9870. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0028786938&partnerID=40&md5=a3974d2976f6d39e858896434ce0398e>.
- Jenkins, C.M. et al., 2004. Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. *Journal of Biological Chemistry*, 279(47), pp.48968–48975. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-10344262633&partnerID=40&md5=8f62cb1c2d45d9d727a55d091e29ce4e>.
- Jeong, H.W. et al., 2009. Berberine suppresses proinflammatory responses through AMPK activation in macrophages. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*,

- 296(4), pp.E955–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19208854> [Accessed November 11, 2012].
- Ji, C. et al., 2010. Exogenous cell-permeable C6 ceramide sensitizes multiple cancer cell lines to Doxorubicin-induced apoptosis by promoting AMPK activation and mTORC1 inhibition. *Oncogene*, 29(50), pp.6557–68. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20802518> [Accessed April 13, 2013].
- Jitrapakdee, S. et al., 2008. Structure, mechanism and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochemical Journal*, 413(3), pp.369–387. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-48249150656&partnerID=40&md5=1e616bcaa9a2cdd511436cdc595f9c0f>.
- Jitrapakdee, S. & Wallace, J., 2003. The Biotin Enzyme Family: Conserved Structural Motifs and Domain Rearrangements. *Current Protein & Peptide Science*, 4(3), pp.217–229. Available at: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-2037&volume=4&issue=3&spage=217> [Accessed April 30, 2013].
- Kalousek, F., Darigo, M.D. & Rosenberg, L.E., 1980. Isolation and characterization of propionyl-CoA carboxylase from normal human liver. Evidence for a protomeric tetramer of nonidentical subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 255(1), pp.60–65. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0018905636&partnerID=40&md5=3626ba12787a31fd0b5e78f0e6110aa4>.
- Karady, S. et al., 1951. Demonstration of a hitherto unknown antihistaminic agent formed in the body (resistin). [Versuche zum Nachweis eines im Organismus entstehenden bisher unbekanntes Stoffes mit Antihistaminwirkung (Resistin)]. *Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie*, 88(3), pp.253–267. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0011004863&partnerID=40&md5=80faa1205ae92c21af9ebf06a649c34a>.
- Karlsson, M. et al., 1997. cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase. Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases. *Journal of Biological Chemistry*, 272(43), pp.27218–27223. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0030767295&partnerID=40&md5=6142ee6d3e657466fa2a42160fc8e1df>.
- Kawakami, M. et al., 1987. Human recombinant TNF suppresses lipoprotein lipase activity and stimulates lipolysis in 3T3-L1 cells. *Journal of Biochemistry*, 101(2), pp.331–338. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0023129921&partnerID=40&md5=d943460aec0e933a95139aebb276c848>.
- Kershaw, E.E. & Flier, J.S., 2004. Adipose tissue as an endocrine organ. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 89(6), pp.2548–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15181022> [Accessed November 1, 2012].
- Kersten, S., 2001. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Reports*, 2(4), pp.282–286. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0035038782&partnerID=40&md5=b2bce842c8f0424f798d4553b4f82494>.
- Kim, K., 1997. Regulation of Mammalian Acetyl-Coenzyme A Carboxylase. *Annual review of nutrition*, 17, pp.77–99.

- Kim, S.Y. et al., 2012. AMP-activated protein kinase- α 1 as an activating kinase of TGF- β -activated kinase 1 has a key role in inflammatory signals. *Cell death & disease*, 3(7), p.e357. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3406594&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 23, 2013].
- Kim, T.S. & Freake, M.C., 1996. High carbohydrate diet and starvation regulate lipogenic mRNA in rats in a tissue-specific manner. *Journal of Nutrition*, 126(3), pp.611–617. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0029878025&partnerID=tZOTx3y1>.
- Kirschner, L.S. et al., 2009. Mouse models of altered protein kinase A signaling. *Endocrine-Related Cancer*, 16(3), pp.773–793. Available at: <http://erc.endocrinology-journals.org/content/16/3/773.abstract>.
- Knowles, J.R., 1989. The mechanism of biotin-dependent enzymes. *Annual Review of Biochemistry*, 58, pp.195–221. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0024315260&partnerID=40&md5=5feac7afc568d5af2fae459e55be8fd2>.
- Knudsen, J. et al., 2000. Role of Acyl-CoA Binding Protein in Acyl-CoA Metabolism and Acyl-CoA-Mediated Cell Signalling. *Journal of Nutrition*, 130, pp.294–298.
- Kögl, F. & Tönnis, B., 1936. Darstellung von krystallisiertem Biotin aus Eigelb. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, 242, pp.1–2.
- Koh, H.-J. et al., 2007. Adrenaline is a critical mediator of acute exercise-induced AMP-activated protein kinase activation in adipocytes. *The Biochemical journal*, 403(3), pp.473–81. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1876380&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 29, 2012].
- Kolditz, C.-I. & Langin, D., 2010. Adipose tissue lipolysis. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 13, pp.377–381.
- Koutsikos, D. et al., 1996. Oral glucose tolerance test after high-dose i.v. biotin administration in normoglycemic hemodialysis patients. *Renal Failure*, 18(1), pp.131–137. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-13344287052&partnerID=tZOTx3y1>.
- Koutsikos, D., Agroyannis, B. & Tzanatos-Exarchou, H., 1990. Biotin for diabetic peripheral neuropathy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 44(10), pp.511–514. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0025696526&partnerID=tZOTx3y1> [Accessed November 6, 2015].
- Kragelund, B.B., Knudsen, J. & Poulsen, F.M., 1999. Acyl-coenzyme A binding protein (ACBP). *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1441(2-3), pp.150–161. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0032701322&partnerID=40&md5=1cdb0141dd7d5f3fc56a4bc8fbabeb4a>.
- Kuroishi, T. et al., 2011. Biotinylation is a natural, albeit rare, modification of human histones. *Molecular genetics and metabolism*, 104(4), pp.537–45. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3224183&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 22, 2013].
- De La Vega, L.A. & Stockert, R.J., 2000. Regulation of the insulin and asialoglycoprotein receptors via cGMP-dependent protein kinase Regulation of the insulin and asialoglycoprotein

- receptors via cGMP-dependent protein kinase. *American journal of physiology. Cell physiology*, 279, pp.2037–2042.
- Lafontan, M. & Berlan, M., 1993. Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *Journal of Lipid Research*, 34(7), pp.1057–1091. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0027287413&partnerID=40&md5=58d4eff91482778fadb1a6f69c2ec482>.
- Lafontan, M. & Langin, D., 2009. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Progress in lipid research*, 48(5), pp.275–97. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19464318> [Accessed March 7, 2013].
- Lamhonwah, a M., Quan, F. & Gravel, R. a, 1987. Sequence homology around the biotin-binding site of human propionyl-CoA carboxylase and pyruvate carboxylase. *Archives of biochemistry and biophysics*, 254(2), pp.631–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3555348>.
- Langin, D. et al., 1993. Gene organization and primary structure of human hormone-sensitive lipase: Possible significance of a sequence homology with a lipase of *Moraxella* TA144, an antarctic bacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(11), pp.4897–4901. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0027198857&partnerID=40&md5=7a335ff7072e93df09e206ef5f29cbb6>.
- Large, V. et al., 2004. Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes & metabolism*, 30(4), pp.294–309. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15525872>.
- Large, V. & Arner, P., 1998. Regulation of lipolysis in humans. Pathophysiological modulation in obesity diabetes, and hyperlipidaemia. *Diabetes and Metabolism*, 24(5), pp.409–418. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0031647224&partnerID=40&md5=f40f81471fdd824dae286374ccf322e4>.
- Larrieta, E. et al., 2012. Effects of biotin deficiency on pancreatic islet morphology, insulin sensitivity and glucose homeostasis. *The Journal of nutritional biochemistry*, 23(4), pp.392–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21596550> [Accessed March 8, 2013].
- Larrieta, E. et al., 2010. Pharmacological concentrations of biotin reduce serum triglycerides and the expression of lipogenic genes. *European journal of pharmacology*, 644(1-3), pp.263–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20655901> [Accessed November 25, 2012].
- Lazo de la Vega-Monroy, M.L. et al., 2013. Effects of biotin supplementation in the diet on insulin secretion, islet gene expression, glucose homeostasis and beta-cell proportion. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(1), pp.169–177. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.03.020>.
- Lee, H.-I. & Lee, M.-K., 2015. Coordinated regulation of scopoletin at adipose tissue–liver axis improved alcohol-induced lipid dysmetabolism and inflammation in rats. *Toxicology Letters*, 237(3), pp.210–218. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427415002362>.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L. & Cox, M.M., 2009. *Lehninger : principios de bioquímica*, Ediciones Omega, S.A. Available at: <http://books.google.com.mx/books?id=7kuXQwAACAAJ>.

- Letexier, D. et al., 2003. Comparison of the expression and activity of the lipogenic pathway in human and rat adipose tissue. *Journal of Lipid Research*, 44(11), pp.2127–2134. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0345529871&partnerID=40&md5=04f42d407aa04cee80e04e9f2aa1a5ea>.
- Leung, D.W., 2001. The structure and functions of human lysophosphatidic acid acyltransferases. *Front Biosci*, 6, pp.D944–953. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0010044876&partnerID=40&md5=a39afba0ee761e485b363f06c1f8a40>.
- Levert, K.L., Waldrop, G.L. & Stephens, J.M., 2002. A biotin analog inhibits acetyl-CoA carboxylase activity and adipogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 277(19), pp.16347–16350. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11907024> [Accessed December 4, 2012].
- Li, Y. et al., 2011. AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. *Cell metabolism*, 13(4), pp.376–88. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3086578&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 4, 2013].
- Li, Y. et al., 2008. Homocysteine upregulates resistin production from adipocytes in vivo and in vitro. *Diabetes*, 57(4), pp.817–827. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-42449147456&partnerID=40&md5=f70986ac3a2b347c61f947af78edd183>.
- Liang, X. et al., 2001. Impact of the intramitochondrial enzyme organization on fatty acid oxidation. *Biochemical Society Transactions*, 29(Pt 2), pp.279–283.
- Lihn, A.S. et al., 2004. AICAR stimulates adiponectin and inhibits cytokines in adipose tissue. *Biochemical and biophysical research communications*, 316(3), pp.853–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15033479> [Accessed November 29, 2012].
- Lim, C.T., Kola, B. & Korbonits, M., 2010. AMPK as a mediator of hormonal signalling. *Journal of molecular endocrinology*, 44(2), pp.87–97. Available at: <http://jme.endocrinology-journals.org/content/44/2/87.abstract> [Accessed August 9, 2013].
- Lönnqvist, F. et al., 1992. Lipolytic catecholamine resistance due to decreased beta 2-adrenoceptor expression in fat cells. *The Journal of clinical investigation*, 90(6), pp.2175–86. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=443368&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Lonnroth, P. et al., 1989. Microdialysis of intercellular adenosine concentration in subcutaneous tissue in humans. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*, 256(2), pp.E250–E255. Available at: <http://ajpendo.physiology.org/content/256/2/E250.abstract>.
- Luiken, J.J.F.P. et al., 2001. Increased Rates of Fatty Acid Uptake and Plasmalemmal Fatty Acid Transporters in Obese Zucker Rats. *Journal of Biological Chemistry*, 276(44), pp.40567–40573. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0035798670&partnerID=40&md5=a1e4867baee47a85fdd4b904394d3384>.
- Ma, T.-H. et al., 1984. Tradescantia-micronucleus (Trad-MCN) tests on 140 health-related agents. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 138(2-3), pp.157–167. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0165121884900399> [Accessed November

9, 2015].

- Mabrouk, G.M. et al., 1990. Acute hormonal control of acetyl-CoA carboxylase: The roles of insulin, glucagon, and epinephrine. *Journal of Biological Chemistry*, 265(11), pp.6330–6338. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0025237826&partnerID=tZOtx3y1>.
- Maebashi, M. et al., 1993. Therapeutic Evaluation of the Effect of Biotin on Hyperglycemia in Patients with Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 14(3), pp.211–218.
- Mairal, A. et al., 2002. Characterization of a novel testicular form of human hormone-sensitive lipase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 291(2), pp.286–290. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0036289445&partnerID=40&md5=260a4e85c467f0492f91d9d107ddbda5>.
- Marin-Valencia, I., Roe, C.R. & Pascual, J.M., 2010. Pyruvate carboxylase deficiency: Mechanisms, mimics and anaplerosis. *Molecular Genetics and Metabolism*, 101(1), pp.9–17. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77955653743&partnerID=40&md5=dc59a9bcde69821229716344678930b2>.
- Marin, P. et al., 1992. Uptake of glucose carbon in muscle glycogen and adipose tissue triglycerides in vivo in humans. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 263(3 26-3), pp.E473–E480. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0026781535&partnerID=40&md5=84e27ad726ce5bb46ffb77187d89c381>.
- Marshall, M.W. et al., 1976. Biotin status and lipid metabolism in adult obese hypercholesterolemic inbred rats. *Nutrition and Metabolism*, 20(1), pp.41–61. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0017074112&partnerID=40&md5=81eec6afc360f655f96ad6708c0b33b4>.
- Marshall, M.W. & Kliman, P.G., 1980. Effects of biotin on lipids and other constituents of plasma of healthy mens and womens. *Artery*, 7(4), pp.330–351.
- Melo, V. & Cuamatzi, O., 2007. *Bioquímica de los Procesos Metabólicos* Reverté Ed., México, D. F.
- Mock, D.M., 2006. Biotin. In M. E. Shils et al., eds. *Modern Nutrition in Health and Disease*. Lippincott Williams & Wilkins, pp. 498–506. Available at: <https://books.google.co.in/books?id=S5oCjZZZ1ggC>.
- Mock, D.M., Lankford, G.L. & Cazin, J., 1993. Biotin and biotin analogs in human urine: biotin accounts for only half of the total. *The Journal of nutrition*, 123(11), pp.1844–1851.
- Mock, D.M., Lankford, G.L. & Mock, N.L., 1995. Biotin Accounts for Only Half of the Total Avidin-Binding Substances in Human Serum. *The Journal of nutrition*, pp.941–946.
- Mock, D.M. & Malik, M.I., 1992. Distribution of biotin in human plasma: is not bound to protein13. *The American journal of clinical nutrition*, 56, pp.427–432.
- Møller, N. & Jørgensen, J.O.L., 2009. Effects of Growth Hormone on Glucose, Lipid, and Protein Metabolism in Human Subjects. *Endocrine Reviews*, 30(2), pp.152–177. Available at: <http://edrv.endojournals.org/content/30/2/152.abstract>.
- Moschen, A.R. et al., 2007. Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating properties. *Journal of Immunology*, 178(3), pp.1748–1758. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0->

33846527541&partnerID=40&md5=4dbe70be86f07b7fb09cbc9d6e996c8c.

- Moule, S.K. & Denton, R.M., 1998. The activation of p38 MAPK by the beta-adrenergic agonist isoproterenol in rat epididymal fat cells. *FEBS letters*, 439(3), pp.287–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9845339>.
- Mulligan, J.D. et al., 2007. Upregulation of AMPK during cold exposure occurs via distinct mechanisms in brown and white adipose tissue of the mouse. *The Journal of physiology*, 580(Pt. 2), pp.677–84. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2075554&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 29, 2012].
- Nikolau, B.J., Ohlrogge, J.B. & Wurtele, E.S., 2003. Plant biotin-containing carboxylases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 414(2), pp.211–222. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0038101413&partnerID=40&md5=3fd95797f0da52fab739a83d78eebc5a>.
- Ok, E. et al., 2013. Pomegranate vinegar attenuates adiposity in obese rats through coordinated control of AMPK signaling in the liver and adipose tissue. *Lipids in health and disease*, 12(1), p.163. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24180378>.
- Orci, L. et al., 2004. Rapid transformation of white adipocytes into fat-oxidizing machines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(7), pp.2058–63. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=357051&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Owen, O.E., Kalhan, S.C. & Hanson, R.W., 2002. The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *Journal of Biological Chemistry*, 277(34), pp.30409–30412. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0037163021&partnerID=40&md5=1a4bbadec490e8776ba71923d8c61111>.
- Pacheco-Alvarez, D. et al., 2004. Paradoxical regulation of biotin utilization in brain and liver and implications for inherited multiple carboxylase deficiency. *Journal of Biological Chemistry*, 279(50), pp.52312–52318. Available at: <https://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-10644286348&partnerID=40&md5=0b86c5740cd35180a4a419138d2400d3>.
- Pagès, C. et al., 2001. Lysophosphatidic acid synthesis and release. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 64(1-4), pp.1–10. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0035004560&partnerID=40&md5=db85672916194016bd66be9d53a8d7f2>.
- Pape, M.E., Lopez-Casillas, F. & Kim, K.-H., 1988. Physiological regulation of acetyl-CoA carboxylase gene expression: Effects of diet, diabetes, and lactation on acetyl-CoA carboxylase mRNA. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 267(1), pp.104–109. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0024204719&partnerID=tZOTx3y1> [Accessed September 21, 2015].
- Park, H. et al., 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. *The Journal of biological chemistry*, 277(36), pp.32571–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12065578> [Accessed April 13, 2013].
- Peters, D.M. et al., 2002. Exposure to UV light causes increased biotinylation of histones in Jurkat

- cells. *American journal of physiology. Cell physiology*, 283(3), pp.C878–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12176744>.
- Raclot, T. et al., 1997. Selective release of human adipocyte fatty acids according to molecular structure. *Biochemical Journal*, 324(3), pp.911–915. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0030789804&partnerID=40&md5=944bfe3f6a27ddce0427195a75aeb86d>.
- Ramnanan, C.J. et al., 2010. The regulation of AMPK signaling in a natural state of profound metabolic rate depression. *Molecular and cellular biochemistry*, 335(1-2), pp.91–105. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19756961> [Accessed April 9, 2013].
- Ramsay, R.R., Gandour, R.D. & Van Der Leij, F.R., 2001. Molecular enzymology of carnitine transfer and transport. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1546(1), pp.21–43. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0035831263&partnerID=40&md5=f7c383c1430d5a06ecb97181dbd1b0a9>.
- Reshef, L. et al., 2003. Glyceroneogenesis and the Triglyceride/Fatty Acid Cycle. *Journal of Biological Chemistry*, 278(33), pp.30413–30416. Available at: <http://www.jbc.org/content/278/33/30413.short>.
- Reshef, L., Hanson, R.W. & Ballard, F.J., 1970. A possible physiological role for glyceroneogenesis in rat adipose tissue. *Journal of Biological Chemistry*, 245(22), pp.5979–5984. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0014962893&partnerID=40&md5=2120ba00495a6fa1ee38dca194fd2dde>.
- Reshef, L., Hanson, R.W. & Ballard, F.J., 1969. Glyceride-Glycerol Synthesis from Pyruvate: ADAPTIVE CHANGES IN PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYKINASE AND PYRUVATE CARBOXYLASE IN ADIPOSE TISSUE AND LIVER. *Journal of Biological Chemistry*, 244(8), pp.1994–2001. Available at: <http://www.jbc.org/content/244/8/1994.abstract>.
- Revilla-Monsalve, C. et al., 2006. Biotin supplementation reduces plasma triacylglycerol and VLDL in type 2 diabetic patients and in nondiabetic subjects with hypertriglyceridemia. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomédecine & pharmacothérapie*, 60(4), pp.182–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16677798> [Accessed November 25, 2012].
- Richelsen, B. et al., 1984. Prostaglandin E2 receptor binding and action in human fat cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 59(1), pp.7–12. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0021287224&partnerID=40&md5=3ad5d11c230e97dc746fa4844427f1c2>.
- Rigo, F.K. et al., 2006. Propionic acid induces convulsions and protein carbonylation in rats. *Neuroscience Letters*, 408(2), pp.151–154. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33749333300&partnerID=40&md5=d391c29300ee8acb10e79d5f3ce63d6a>.
- Rocha, A. et al., 2015. Green tea extract activates AMPK and ameliorates white adipose tissue metabolic dysfunction induced by obesity. *European Journal of Nutrition*. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00394-015-1033-8>.
- Rodbell, M., 1961. Metabolism of Isolated Fat Cells. *The Journal of biological chemistry*, 239(2), pp.375–380.

- Rodriguez-Melendez, R. et al., 2001. Biotin Regulates the Genetic Expression of Holocarboxylase Synthetase and Mitochondrial Carboxylases in Rats. *The Journal of nutrition*, (January), pp.1909–1913.
- Rodriguez-melendez, R. et al., 2005. High-Throughput Immunoblotting Identifies Biotin-Dependent Signaling Proteins in HepG2 Hepatocarcinoma Cells. *The Journal of nutrition*, 135(7), pp.1659–1666.
- Rodriguez-Melendez, R. et al., 2003. Interleukin-2 receptor-gamma -dependent endocytosis depends on biotin in Jurkat cells. *American journal of physiology. Cell physiology*, 284(2), pp.C415–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12388078>.
- Rodriguez-Melendez, R., Schwab, L.D. & Zempleni, J., 2004. Jurkat cells respond to biotin deficiency with increased nuclear translocation of NF- κ B, mediating cell survival. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 74(3), pp.209–216. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-3142660234&partnerID=40&md5=9344cc1e5dff60fce9771c33f735d489>.
- Romero-Navarro, G. et al., 1999. Biotin regulation of pancreatic glucokinase and insulin in primary cultured rat islets and in biotin-deficient rats. *Endocrinology*, 140(10), pp.4595–600. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10499515>.
- Rosenbaum, M. et al., 2002. Low Dose Leptin Administration Reverses Effects on Sustained Weight-Reduction on Energy Expenditure and Circulating Concentrations of Thyroid Hormones. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 87(5), pp.2391–2394.
- Rossmeis, M. et al., 2004. Role of energy charge and AMP-activated protein kinase in adipocytes in the control of body fat stores. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*, 28 Suppl 4, pp.S38–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15592485> [Accessed October 26, 2012].
- Saggerson, D., 2008. Malonyl-CoA, a key signaling molecule in mammalian cells. *Annual Review of Nutrition*, 28, pp.253–272. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-50949087166&partnerID=40&md5=acf073bfc86e5bfd90c7e96ff408fe21>.
- Sahin, K. et al., 2013. Anti-diabetic activity of chromium picolinate and biotin in rats with type 2 diabetes induced by high-fat diet and streptozotocin. *British Journal of Nutrition*, 110(02), pp.197–205. Available at: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0007114512004850.
- Said, H., 2012. Biotin: Biochemical, Physiological and Clinical Aspects. In O. Stanger, ed. *Water Soluble Vitamins SE - 1*. Subcellular Biochemistry. Springer Netherlands, pp. 1–19. Available at: http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-2199-9_1.
- Said, H.M., Redha, R. & Nylander, W., 1987. A carrier-mediated, Na⁺ gradient-dependent transport for biotin in human intestinal brush-border membrane vesicles. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 253(5), p.16/5. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0023502155&partnerID=40&md5=3f8617078c252319b4bd24f1d1a3052f>.
- Salazar, B.S., 2006. Vías de Señalización que Participan en la Regulación de la Lipólisis en Adipocitos. *Revista de Educación Bioquímica*, 25(003), pp.80–84.

- Sanli, T. et al., 2010. Ionizing radiation activates AMP-activated kinase (AMPK): a target for radiosensitization of human cancer cells. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 78(1), pp.221–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20615625> [Accessed March 5, 2013].
- Sawamura, H. et al., 2015. Dietary intake of high-dose biotin inhibits spermatogenesis in young rats. *Congenital Anomalies*, 55(1), pp.31–36. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/cga.12070>.
- Sawamura, H., Fukuwatari, T. & Shibata, K., 2007. Effects of Excess Biotin Administration on the Growth and Urinary Excretion of Water-Soluble Vitamins in Young Rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(12), pp.2977–2984. Available at: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/bbb/70381?from=CrossRef> [Accessed December 4, 2012].
- Schaffer, J.E. & Lodish, H.F., 1994. Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell*, 79(3), pp.427–436. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0028152492&partnerID=40&md5=aa91e436a06d17722fad9591817f51c8>.
- Schäffler, A. et al., 2005. Genomic structure of human omentin, a new adipocytokine expressed in omental adipose tissue. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1732(1-3), pp.96–102. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33144479356&partnerID=40&md5=12515c59830397bac1fe9617f63cf12f>.
- Schäffler, A. et al., 2007. Regulation and function of collagenous repeat containing sequence of 26-kDa protein gene product “cartonectin.” *Obesity*, 15(2), pp.303–313. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33947162381&partnerID=40&md5=3521406313671c4dee0a25ecee0a5d3d>.
- Schäffler, A. et al., 2006. Role of adipose tissue as an inflammatory organ in human diseases. *Endocrine Reviews*, 27(5), pp.449–467. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33747076885&partnerID=40&md5=a38d6ff8d4de64308eb45aad6f135c9>.
- Scheerger, S.B. & Zemleni, J., 2003. Expression of Oncogenes Depends on Biotin in Human Small Cell Lung Cancer Cells NCI-H69. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 73(6), pp.461–467. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0242567146&partnerID=40&md5=3c5b8a5506b56b73327de8b66150c7c7>.
- Scherer, P.E. et al., 1995. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 270(45), pp.26746–26749. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0028787490&partnerID=40&md5=1d39423ec71ea1a20d382c5551e67744>.
- Sengenès, C. et al., 2002. Increased lipolysis in adipose tissue and lipid mobilization to natriuretic peptides during low-calorie diet in obese women. *International Journal of Obesity*, 26(1), pp.24–32. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0036154085&partnerID=40&md5=5bb4b95be8ed34be35ae5fe5d0af5f6b>.
- Sengenès, C. et al., 2003. Involvement of a cGMP-dependent pathway in the natriuretic peptide-mediated hormone-sensitive lipase phosphorylation in human adipocytes. *The Journal of biological chemistry*, 278(49), pp.48617–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12970365> [Accessed November 29, 2012].

- Sengenès, C. et al., 2000. Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 14(10), pp.1345–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10877827>.
- Servetnick, D.A. et al., 1995. Perilipins are associated with cholesteryl ester droplets in steroidogenic adrenal cortical and Leydig cells. *Journal of Biological Chemistry*, 270(28), pp.16970–16973. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0028998905&partnerID=40&md5=bc5d0873faafdb173476edc2e3a44a90>.
- Seydoux, J., 1983. Recent evidence for the involvement of brown adipose tissue in body weight regulation. *Diabete et Metabolisme*, 9(2), pp.141–147. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0020894397&partnerID=40&md5=ca1dbd155998d3d54fb45917c5b3eed8>.
- Shaw, R.J. et al., 2004. The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(10), pp.3329–35. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=373461&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Shimabukuro, M. et al., 1997. Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(9), pp.4637–41. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=20776&tool=pmcentrez&renderertype=abstract>.
- Shrago, E., Glennon, J.A. & Gordon, E.S., 1971. Comparative aspects of lipogenesis in mammalian tissues. *Metabolism*, 20(1), pp.54–62. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0014971569&partnerID=40&md5=2f28f815322088daabe8d9c674136744>.
- Shrago, E., Spennetta, T. & Gordon, E., 1969. Fatty acid synthesis in human adipose tissue. *Journal of Biological Chemistry*, 244(10), pp.2761–2766. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0014690521&partnerID=40&md5=f8b70908f1c1a2b14723d0282efca1c9>.
- Siegrist-Kaiser, C. a et al., 1997. Direct effects of leptin on brown and white adipose tissue. *The Journal of clinical investigation*, 100(11), pp.2858–64. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=508492&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Siiteri, P.K., 1987. Adipose tissue as a source of hormones. *American Journal of Clinical Nutrition*, 45(1 Suppl), pp.277–282. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0023210536&partnerID=40&md5=aa5f1fdcf87a8d31b5953d593ad0c4a7>.
- Singer, G.M. & Geohas, J., 2006. The effect of chromium picolinate and biotin supplementation on glycemic control in poorly controlled patients with type 2 diabetes mellitus: A placebo-controlled, double-blinded, randomized trial. *Diabetes Technology and Therapeutics*, 8(6), pp.636–643. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33845341453&partnerID=40&md5=0300f3dcb57b62a28a909f86c1fee589>.
- Smith, E.M. et al., 2007. Feeding Drosophila a Biotin-Deficient Diet for Multiple Generations Increases Stress Resistance and Lifespan and Alters Gene Expression and Histone

- Biotinylations Patterns. *The Journal of nutrition*, 137, pp.2006–2012.
- Solórzano-Vargas, R.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-dependent carboxylases mRNA levels in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(8), pp.5325–30. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=122768&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Souza, S.C. et al., 2011. Atrial natriuretic peptide regulates lipid mobilization and oxygen consumption in human adipocytes by activating AMPK. *Biochemical and biophysical research communications*, 410(3), pp.398–403. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21672517> [Accessed December 4, 2012].
- Spence, J.T. & Koudelka, A.P., 1984. Effects of Biotin upon the Intracellular Level of cGMP and the Activity of Glucokinase in CULTured Rat Hepatocytes. *The Journal of nutrition*, 259(10), pp.6393–6396.
- Sprong, H., Van Der Sluijs, P. & Van Meer, G., 2001. How proteins move lipids and lipids move proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(7), pp.504–513. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0035406208&partnerID=40&md5=db024856dff0d18344caeb6fd97aed91>.
- SRI-International, 1979. *Microbial mutagenesis testing of substances compound report:F76-041, D-Biotin.*
- Stadler, S.C. et al., 2005. Mitochondrial targeting signals and mature peptides of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 334(3), pp.939–946. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-22744442745&partnerID=40&md5=b6601e581fbc8c8afc4bcf5b347bf19e>.
- Stanley, J.S., Griffin, J.B. & Zemleni, J., 2001. Biotinylation of histones in human cells. Effects of cell proliferation. *European journal of biochemistry / FEBS*, 268(20), pp.5424–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11606205>.
- Steigerwal, H. & Bohele, H., 1962. On the influence of biotin upon the intermediated metabolism. In L. D. Wright, ed. *Drugs affecting lipid metabolism. proceedings of the symposium on drugs affecting lipid metabolism, milan 1960*. JAMA, p. 264. Available at: +.
- Steinberg, G.R., Kemp, B.E. & Watt, M.J., 2007. Adipocyte triglyceride lipase expression in human obesity. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 293(4), pp.E958–64. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-35148889090&partnerID=tZOtx3y1> [Accessed September 5, 2015].
- Stockert, R.J. & Morell, a G., 1990. Second messenger modulation of the asialoglycoprotein receptor. *The Journal of biological chemistry*, 265(4), pp.1841–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2153666>.
- Suchy, S.F., Rizzo, W.B. & Wolf, B., 1986. Effect of biotin deficiency and supplementation on lipid metabolism in rats: saturated fatty acids. *The American journal of clinical nutrition*, 44(4), pp.475–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3766434>.
- Sugita, Y. et al., 2008. Effect of Biotin Treatment on Hepatic Gene Expression in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72(5), pp.1290–1298.

Available at: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/bbb/70781?from=CrossRef> [Accessed December 4, 2012].

- Sullivan, J.E. et al., 1994. Inhibition of lipolysis and lipogenesis in isolated rat adipocytes with AICAR, a cell-permeable activator of AMP-activated protein kinase. *FEBS letters*, 353(1), pp.33–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7926017>.
- Thomson, D.M. & Winder, W.W., 2009. AMP-activated protein kinase control of fat metabolism in skeletal muscle. *Acta Physiologica*, 196(1), pp.147–154. Available at: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-1716.2009.01973.x>.
- Tong, L., 2005. Acetyl-coenzyme A carboxylase: crucial metabolic enzyme and attractive target for drug discovery. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 62(16), pp.1784–803. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-23944509003&partnerID=40&md5=fac1a930395d30c68455b3ba35427c1> [Accessed May 29, 2013].
- Tong, L., 2013. Structure and function of biotin-dependent carboxylases. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 70(5), pp.863–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22869039> [Accessed April 19, 2013].
- Tong, L. & Harwood Jr., H.J., 2006. Acetyl-coenzyme A carboxylases: Versatile targets for drug discovery. *Journal of Cellular Biochemistry*, 99(6), pp.1476–1488. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33751579134&partnerID=40&md5=c02719af5956b51d3b0fa795c8996699>.
- Uyeda, K., Yamashita, H. & Kawaguchi, T., 2002. Carbohydrate responsive element-binding protein (ChREBP): A key regulator of glucose metabolism and fat storage. *Biochemical Pharmacology*, 63(12), pp.2075–2080. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0037098291&partnerID=40&md5=66f2255b4cd37dd32fad1e578654e600>.
- Valet, P. et al., 1990. Neuropeptide Y and peptide YY inhibit lipolysis in human and dog fat cells through a pertussis toxin-sensitive G protein. *Journal of Clinical Investigation*, 85(1), pp.291–295. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0025166380&partnerID=40&md5=445c57f9eb27427941309fc861d3fd88>.
- Veech, R.L., 2003. A humble hexose monophosphate pathway metabolite regulates short- and long-term control of lipogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(10), pp.5578–5580. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0037610836&partnerID=40&md5=bb73bb4de74afed1dd2b70e43357347e>.
- Vesely, D.L., 1982. Biotin Enhances Guanylate Cyclase Activity Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/1689397> Biotin Enhances Guanylate Cyclase Activity. *Science*, 216(4552), pp.1329–1330.
- Vilches-Flores, A. et al., 2010. Biotin increases glucokinase expression via soluble guanylate cyclase/protein kinase G, adenosine triphosphate production and autocrine action of insulin in pancreatic rat islets. *The Journal of nutritional biochemistry*, 21(7), pp.606–612. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095528630900076X?showall=true>.
- Vilches-Flores, A. & Fernández-Mejía, C., 2005. Efecto de la biotina sobre la expresión y el metabolismo. *Revista de Investigación Clínica*, 57, pp.716–724. Available at:

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-83762005000500009&nrm=iso.

- Villena, J.A. et al., 2004. Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: Ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(45), pp.47066–47075. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-8744297386&partnerID=40&md5=602221509bad0e5935b18745aa6ab5ec>.
- Wakil, S.J., Stoops, J.K. & Joshi, V.C., 1983. Fatty acid synthesis and its regulation. *Annual review of biochemistry*, 52(1), pp.537–79. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6137188> [Accessed May 7, 2013].
- Wang, H. et al., 1999. Human Placental Na⁺-dependent Multivitamin Transporter: CLONING, FUNCTIONAL EXPRESSION, GENE STRUCTURE, AND CHROMOSOMAL LOCALIZATION. *Journal of Biological Chemistry*, 274(21), pp.14875–14883. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0033591422&partnerID=tZOtx3y1> [Accessed September 21, 2015].
- Wang, Z. et al., 2011. Homocysteine suppresses lipolysis in adipocytes by activating the AMPK pathway. *AJP: Endocrinology and Metabolism*, 301(4), pp.E703–E712. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3191546&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 4, 2012].
- Wang, Z.-W. et al., 1999. Hyperleptinemia Depletes Fat from Denervated Fat Tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 260(3), pp.653–657. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X9990918X>.
- Watanabe-Kamiyama, M. et al., 2008. Antihypertensive effect of biotin in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *The British journal of nutrition*, 99(4), pp.756–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18179728> [Accessed December 4, 2012].
- Watanabe, T., 1996. Morphological and biochemical effects of excessive amounts of biotin on embryonic development in mice. *Experientia*, 52(2), pp.149–154. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0030041408&partnerID=40&md5=3f798e03bfbe633cc878708b10ebd80e>.
- Watt, M.J. et al., 2006. Regulation of HSL serine phosphorylation in skeletal muscle and adipose tissue. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 290(3), pp.E500–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16188906> [Accessed November 29, 2012].
- Wiedmann, S. et al., 2004. Clusters of biotin-responsive genes in human peripheral blood mononuclear cells. *The Journal of nutritional biochemistry*, 15(7), pp.433–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15219929> [Accessed December 4, 2012].
- Witters, L.A., Moriarity, D. & Martin, D.B., 1979. Regulation of hepatic acetyl coenzyme A carboxylase by insulin and glucagon. *Journal of Biological Chemistry*, 254(14), pp.6644–6649. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0018696224&partnerID=tZOtx3y1>.
- Wolfe, R.R., 1997. Substrate utilization/insulin resistance in sepsis/trauma. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism*, 11(4), pp.645–657. Available at:

<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0031410687&partnerID=40&md5=d48c8a57844ce99b9c53fe65eb506f10>.

- Woods, A. et al., 2005. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell metabolism*, 2(1), pp.21–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16054096> [Accessed March 4, 2013].
- Woods, A. et al., 1996. Characterization of AMP-activated Protein Kinase and Subunits: ASSEMBLY OF THE HETEROTRIMERIC COMPLEX IN VITRO. *Journal of Biological Chemistry*, 271(17), pp.10282–10290. Available at: <http://www.jbc.org/content/271/17/10282.abstract>.
- Woods, A. et al., 2003. LKB1 Is the Upstream Kinase in the AMP-Activated Protein Kinase Cascade. *Current Biology*, 13(22), pp.2004–2008. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982203007851> [Accessed March 4, 2013].
- Wortzel, I. & Seger, R., 2011. The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. *Genes & cancer*, 2(3), pp.195–209. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3128630&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 29, 2013].
- Yang, Z. et al., 2010. Macrophage alpha1 AMP-activated protein kinase (alpha1AMPK) antagonizes fatty acid-induced inflammation through SIRT1. *The Journal of biological chemistry*, 285(25), pp.19051–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2885183&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 4, 2013].
- Yates, 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. *Journal of the American Dietetic Association*, 98(6), pp.699–706. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002822398001606>.
- Zechner, R. et al., 2009. Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *Journal of Lipid Research*, 50(1), pp.3–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18952573> [Accessed November 6, 2012].
- Zempleni, J., 2005. Uptake, localization, and noncarboxylase roles of biotin. *Annual review of nutrition*, 25, pp.175–96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16011464> [Accessed November 8, 2012].
- 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. *Journal of Nutrition*, 131(5), pp.1479–1484. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0035013946&partnerID=40&md5=eec382c10dff563812585e4205aff8d6>.
- Zempleni, J. & Mock, D.M., 1999. Advanced analysis of biotin metabolites in body fluids allows a more accurate ... *The Journal of nutrition*, 129, p.494S–497S.
- Zempleni, J. & Mock, D.M., 1999. Bioavailability of biotin given orally to humans in pharmacologic doses. *American Journal of Clinical Nutrition*, 69(3), pp.504–508.
- Zempleni, J. & Mock, D.M., 1998. Uptake and metabolism of biotin by human peripheral blood mononuclear cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 275(2), pp.C382–388. Available at: <http://ajpcell.physiology.org/content/275/2/C382> [Accessed November 6, 2015].

- Zhang, Y. et al., 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372(6505), pp.425–432. Available at:
<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0028139089&partnerID=40&md5=52e778aac8160d0ca538ddf1bc3c2>.
- Zimmermann, R. et al., 2004. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science*, 306(5700), pp.1383–1386. Available at:
<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-8844226709&partnerID=40&md5=4588b5c87d5f4969826b32c7c9477834>.
- Zmijewski, J.W. et al., 2010. Exposure to hydrogen peroxide induces oxidation and activation of AMP-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry*, 285(43), pp.33154–64. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2963401&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 16, 2013].

13. Anexo I (Artículo Publicado).

Effects of Biotin Supplementation in the Diet on Adipose Tissue cGMP Concentrations, AMPK Activation, Lipolysis, and Serum-Free Fatty Acid Levels

Daniel Boone-Villa,* Asdrubal Aguilera-Méndez,† Adriana Miranda-Cervantes,
and Cristina Fernandez-Mejia

Unidad de Genética de la Nutrición, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Pediatría, Mexico City, Mexico.

ABSTRACT Several studies have shown that pharmacological concentrations of biotin decrease hyperlipidemia. The molecular mechanisms by which pharmacological concentrations of biotin modify lipid metabolism are largely unknown. Adipose tissue plays a central role in lipid homeostasis. In the present study, we analyzed the effects of biotin supplementation in adipose tissue on signaling pathways and critical proteins that regulate lipid metabolism, as well as on lipolysis. In addition, we assessed serum fatty acid concentrations. Male BALB/cAnN Hsd mice were fed a control or a biotin-supplemented diet (control: 1.76 mg biotin/kg; supplemented: 97.7 mg biotin/kg diet) over 8 weeks postweaning. Compared with the control group, biotin-supplemented mice showed an increase in the levels of adipose guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP) (control: 30.3 ± 3.27 pmol/g wet tissue; supplemented: 49.5 ± 3.44 pmol/g wet tissue) and of phosphorylated forms of adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase (AMPK; 65.2% \pm 1.06%), acetyl-coenzyme A (CoA), carboxylase-1 (196% \pm 68%), and acetyl-CoA carboxylase-2 (78.1% \pm 18%). Serum fatty acid concentrations were decreased (control: 1.12 ± 0.04 mM; supplemented: 0.91 ± 0.03 mM), and no change in lipolysis was found (control: 0.29 ± 0.05 μ mol/mL; supplemented: 0.33 ± 0.08 μ mol/mL). In conclusion, 8 weeks of dietary biotin supplementation increased adipose tissue cGMP content and protein expression of the active form of AMPK and of the inactive forms of acetyl-CoA carboxylase-1 and acetyl-CoA carboxylase-2. Serum fatty acid levels fell, and no change in lipolysis was observed. These findings provide insight into the effects of biotin supplementation on adipose tissue and support its use in the treatment of dyslipidemia.

KEY WORDS: • adipose tissue • AMPK • biotin • cGMP • free fatty acids • hypertriglyceridemia • lipolysis

INTRODUCTION

HYPERTRIGLYCERIDEMIA IS A component of metabolic syndrome, a common and important risk factor for cardiovascular disease and progression to type-2 diabetes mellitus.¹ The epidemic proportions of these illnesses make it urgent to develop new therapeutic agents for their prevention and control.

Biotin is a water-soluble vitamin that acts as a covalently bound coenzyme of carboxylases. Unrelated to this role, at pharmacological concentrations regulates gene expression at both the transcriptional and translational level,²⁻⁴ and has a wide repertoire of effects on systemic processes such as development,⁵ reproduction,^{6,7} and metabolism.^{4,8}

Several studies have shown that biotin supplementation reduces hyperlipidemia. In healthy humans, biotin supplementation at 0.9 mg/day modified the plasma lipid concentrations.⁹ In patients with hypercholesterolemia, it was found¹⁰ that the daily administration of 5 mg of biotin for 4 weeks decreased the cholesterol levels. Studies in our laboratory¹¹ revealed that supplementation with 15 mg of biotin per day for 28 days decreased serum triglyceride and very low-density lipoproteins (VLDL) in both normal and type-2 diabetic patients with hypertriglyceridemia. Supplements containing biotin in combination with chromium picolinate (2 mg/600 μ g daily for 90 days) significantly reduced the serum triglyceride and low-density lipoprotein to high-density lipoprotein-cholesterol ratio.¹² In type-1 diabetic patients, daily administration of biotin (40 μ g/kg body weight) and insulin over 3 months significantly decreased the plasma triglyceride, total cholesterol, and VLDL compared with the group receiving insulin plus placebo.¹³

Consistent with the hypotriglyceridemic effects of biotin observed in humans, biotin supplementation decreases serum triglyceride levels in experimental animals. In rats, the administration of biotin in drinking water resulted in

*Present address: Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad del Valle de México Saltillo, Saltillo, Coahuila, México.

†Present address: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad Universitaria, Morelia, Michoacán, México.

Manuscript received 3 November 2014. Revision accepted 11 February 2015.

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

reduced concentrations of VLDL in serum.¹⁴ In normal mice, 8 weeks of treatment with a biotin-supplemented diet reduced serum triglyceride concentrations and adipose tissue weight.¹⁵ In rats with diabetes induced by high-fat diet and streptozotocin, biotin supplementation alone or in combination with chromium picolinate decreased blood total cholesterol, triglyceride, and nonesterified fatty acid.¹⁶

Despite the evidence that pharmacological concentrations of biotin possess hypolipidemic effects and its potential role as a pharmacological agent, the molecular mechanisms by which biotin supplementation modifies lipid metabolism are poorly studied. Our laboratory has investigated the molecular mechanisms regulating the hypolipidemic effects of biotin. We found that in both the liver and adipose tissue, 8 weeks of biotin supplementation lowers the messenger ribonucleic acid (mRNA) abundance of *de novo* lipogenic genes.¹⁵ In the liver, we observed a significant decrease in the mRNA levels of sterol response element binding protein-1c (SREBP1-c), phosphofructokinase-1, pyruvate kinase, acetyl-coenzyme A (CoA), carboxylase-1, and fatty acid synthase; however, the glucose-6-phosphate dehydrogenase expression increased. No changes in stearoyl-CoA desaturase-1, forkhead box protein-O1 (FoxO1), or peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-gamma) expression were observed. As in the liver, we observed decreased expression of SREBP1-c, acetyl-CoA carboxylase-1, fatty acid synthase, and phosphofructokinase-1, and no changes in FoxO1 expression in adipose tissue. In contrast with the effects observed in the liver, stearoyl-CoA desaturase-1, glucose-6-phosphate dehydrogenase, and PPAR-gamma expression were decreased with biotin treatment. The differential effects of biotin in the liver and adipose tissue suggest that it acts in a tissue-specific manner. In support of this notion, studies by Dakshinamurti¹⁷ found that in diabetic rats, biotin has dissimilar effects on the hepatic and renal mRNA expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase.

In a recent study, we found that in the liver, the hypotriglyceridemic effect of biotin supplementation involves increased guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP) content and adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase (AMPK) activation.¹⁸ AMPK acts as a key regulator of energy metabolism in the liver, phosphorylating and regulating many proteins involved in nutrient metabolism. AMPK acts largely to suppress anabolic adenosine 5'-triphosphate (ATP)-consuming pathways, such as lipogenesis, while stimulating catabolic ATP-generating pathways. AMPK also plays an important role in conferring the benefits of metformin, resveratrol, and exercise in the management of metabolic syndrome and type-2 diabetes.^{19,20} It has been reported that there are numerous tissue-specific differences in the function and regulation of AMPK,^{19,21} and that the action of AMPK differs between adipose tissue and the liver.²¹

Adipose tissue has a central role in lipid homeostasis. It stores excess energy as triglycerides, releases it in the form of free fatty acids, and orchestrates nutritional adaptation.²² Adipose tissue dysfunction plays a key role in the patho-

genesis of insulin resistance and its associated metabolic complications such as dyslipidemia, type-2 diabetes, and cardiovascular disease.²³ AMPK regulates lipid metabolism in adipose tissue.²¹ AMPK decreases the rate of lipogenesis increasing the amount of inactive acetyl-CoA carboxylase-1 and favors fatty acid oxidation phosphorylating acetyl-CoA carboxylase-2, the mitochondrial isoform of the enzyme.^{19,21} The action of AMPK on lipolysis is still a matter of debate, while several studies report an antilipolytic effect of AMPK, others suggest it stimulates lipolysis.²¹

Given the importance of adipose tissue in lipid homeostasis and that both biotin and AMPK have tissue-specific actions,^{15,17,19-21} we evaluated the effects of biotin supplementation in adipose tissue by measuring the cGMP content and the levels of active form of AMPK and its downstream target proteins: phosphorylated acetyl-CoA carboxylase-1 and-2. As well, we assessed lipolysis and serum fatty acid concentrations.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Chemical reagents were obtained from the following sources: biotin-control (TD-01362) and biotin-supplemented (TD-02458) diets from Harlan Teklad (Madison, WI, USA); anti-phospho-acetyl-CoA carboxylase-1 (serine79) and anti-phospho-AMPK- α (threonine172) polyclonal antibodies were purchased from Cell Signaling (Beverly, MA, USA). Anti-phospho-acetyl-CoA carboxylase-2 (serine219) antibodies, bovine anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) horse-radish peroxidase (HRP), goat anti-mouse IgG HRP, and α -tubulin antibody from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). cGMP enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Cayman Chemical Co, Ann Arbor, MI, USA). Free Fatty Acids Half-Micro test (ROCHE, Switzerland). Glycerol Concentration Assay Kit (Spinreact, Sant Esteve de Bas, Spain).

Animals and experimental design

Mice were handled according to the standard procedures established by the Ethics Committee for Experimentation at the Biomedical Research Institute of the National University of Mexico according to the ethical standards of the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments. Three-week-old weaned male Balb/cAnN Hsd mice were maintained under a 12-h light:12-h dark cycle and consumed food and water ad libitum throughout the experiments. Two lots of 18 mice were divided into two experimental groups and fed either a biotin-control diet (1.76 mg free biotin/kg) or a biotin-supplemented diet (97.7 mg free biotin/kg) for 8 weeks. Complete information on the diet composition has been published elsewhere.²⁴ After 8 weeks of ad libitum feeding, mice were fasted overnight and anesthetized. Epididymal adipose depots were removed, weighted, frozen in liquid nitrogen, and stored at -70°C until utilization as necessary. Finally, mice were sacrificed as per guidelines.

Western blot analysis

The abundance of phosphorylated AMPK- α (threonine172), acetyl-CoA carboxylase-1 (serine 79), and acetyl-CoA carboxylase-2 (serine 219) and the total α -Tubulin protein mass were determined by Western blot techniques as previously described.¹⁸ For phosphorylated acetyl-CoA carboxylase isoforms, we utilized conditions to allow the determination of both separately.

cGMP levels

The cGMP content in adipose tissue was determined using an ELISA kit following the manufacturer's instructions. cGMP concentrations were calculated after normalizing to tissue weight.

Fatty acid concentration analysis

Fasting fatty acid concentrations were determined by spectrophotometry using a commercial assay kit. The limit of detection for fatty acid measurement was 1.5 mM.

Adipocyte isolation and lipolysis assay

Adipose cells were isolated as described by Rodbell.²⁵ Briefly, freshly obtained fat pads were minced and then digested with collagenase type IV (1 mg/mL) in 1% fatty acid-free bovine serum albumin Krebs-Ringer buffer (KRB) under shaking at 37°C for 30 min. The digested tissue was filtered through a nylon mesh. The obtained suspension was centrifuged, washed gently twice with 4% fatty acid-free bovine serum albumin KRB, and then cells were transferred to individual tubes to determine basal lipolysis. Lipolysis was measured as glycerol concentration in the incubation media released by the adipocytes. In each experiment, 10 μ L of packed cells was transferred into plastic tubes with KRB and incubated for 45 min. Lipolysis was stopped by transferring tubes from 37°C into an ice bath for 5 min. Tubes were immediately centrifuged at 10,000 g at 4°C for 10 min. The glycerol concentration was determined by spectrophotometry using a commercial assay kit.

Statistical analysis

The Statview program V.4.5 (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA) was used for statistical analysis. All data are presented as the mean \pm standard error of the mean; n is the number of evaluated subjects. Statistical significance was assessed by nonpaired Student's t -test. P values of less than .05 were considered statistically significant.

RESULTS

cGMP intracellular content

Elevations in the intracellular cGMP content have been recognized by several studies as a mediator of the molecular actions of biotin in hepatic cells²⁶⁻²⁸; however, this effect has not been investigated in the adipose tissue. We analyzed the cGMP levels in adipose tissue of mice treated with a

biotin-supplemented diet for 8 weeks. Our results showed that the cGMP content was elevated in the epididymal adipose tissue of biotin-supplemented mice relative to control mice (Control: 30.3 ± 3.27 pmol/g wet tissue; Supplemented: 49.5 ± 3.44 pmol/g wet tissue; $P < .05$) (Fig. 1).

Phosphorylated AMPK protein mass

In previous studies,¹⁸ we demonstrated that biotin supplementation resulted in a greater abundance of the AMPK active form in the liver. To evaluate whether biotin supplementation also elicits this effect in adipose tissue, the levels of phosphorylated AMPK were measured. Similar to our previous observations in the liver,¹⁸ biotin supplementation increased the protein abundance of the AMPK active form: $65.2\% \pm 1.06\%$, $P < .05$ (Fig. 2).

Phosphorylated acetyl-CoA carboxylase-1 protein mass

AMPK increases the amount of inactive acetyl-CoA carboxylase-1.^{19,21} The phosphorylated enzyme is inactive and activated by dephosphorylation.²⁹ We analyzed the abundance of phosphorylated acetyl-CoA carboxylase-1 at serine 179 as an AMPK downstream target. As in the liver,¹⁸ we found that 8 weeks of biotin supplementation significantly ($P < .05$) increased the levels of phosphorylated acetyl-CoA carboxylase-1 ($196\% \pm 68\%$; $P < .05$) (Fig. 3).

Phosphorylated acetyl-CoA carboxylase-2 protein mass

AMPK phosphorylates and inactivates acetyl-CoA carboxylase-2 [28]. The effect of biotin supplementation on the inactive phosphorylated form of acetyl-CoA carboxylase-2 has not been previously assessed. Our data revealed that biotin supplementation increased the protein abundance by 78.1 ± 18 ($P < .05$) (Fig. 4).

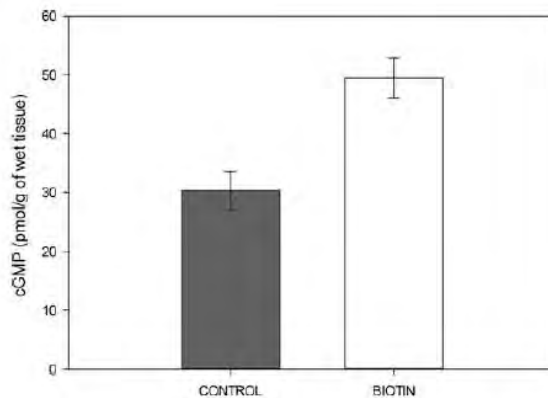


FIG. 1. Effect of biotin supplementation on cGMP content in the epididymal adipose tissue of mice fed a biotin-supplemented diet for 8 weeks. Dark bars: control group; white bars: biotin-supplemented group. Graph data are the mean \pm SE of values from 8 mice of each group. * $P < .05$. cGMP, guanosine 3',5'-cyclic monophosphate.

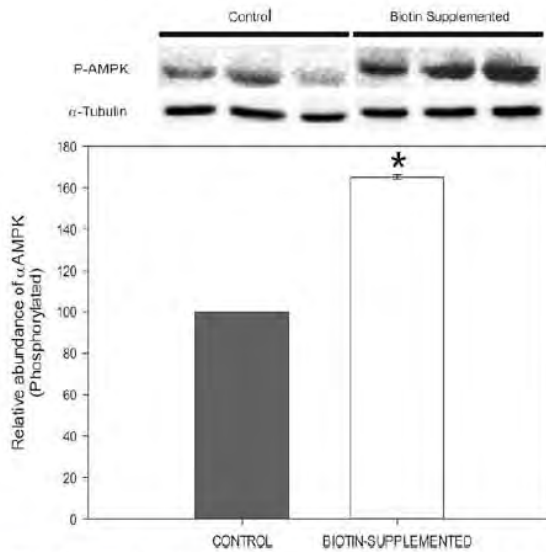


FIG. 2. Effect of biotin supplementation on the protein abundance of phosphorylated AMPK in the epididymal adipose tissue of mice fed a biotin-supplemented diet for 8 weeks. *Top:* Representative Western blot analysis of phosphorylated AMPK. *Bottom:* Quantification of phosphorylated AMPK. *Dark bars:* control group; *white bars:* biotin-supplemented group. Graph data are the mean \pm SE of values from 9 mice of each group. * $P < .05$. AMPK, adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase.

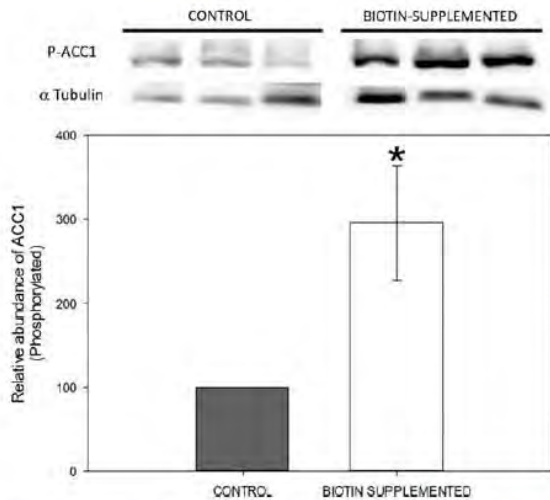


FIG. 3. Effect of biotin supplementation on the protein abundance of phosphorylated acetyl-CoA carboxylase-1 in the epididymal adipose tissue of mice fed a biotin-supplemented diet for 8 weeks. *Top:* representative Western blot analysis of phosphorylated acetyl-CoA carboxylase-1; *bottom:* quantification of phosphorylated acetyl-CoA carboxylase-1. *Dark bars:* control group; *white bars:* biotin-supplemented group. Graph data are the mean \pm SE of values from 9 mice of each group. * $P < .05$. CoA, coenzyme A.

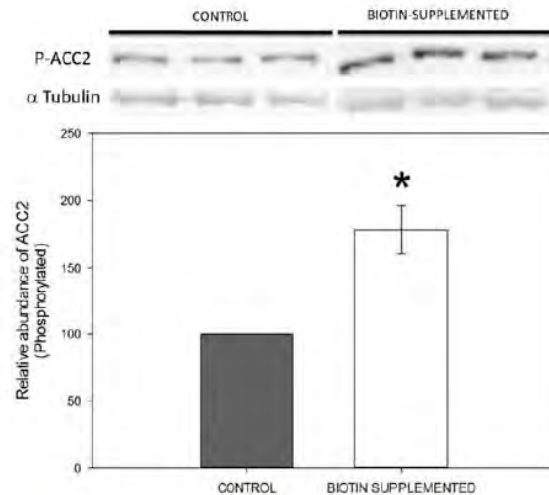


FIG. 4. Effect of biotin supplementation on the protein abundance of phosphorylated acetyl-CoA carboxylase-2 in the epididymal adipose tissue of mice fed a biotin-supplemented diet for 8 weeks. *Top:* representative Western blot analysis of phosphorylated acetyl-CoA carboxylase-2; *bottom:* quantification of phosphorylated acetyl-CoA carboxylase-2. *Dark bars:* control group; *white bars:* biotin-supplemented group. Graph data are the mean \pm SE of values from 9 mice of each group. * $P < .05$.

Serum-free fatty acid concentrations

Numerous compounds that activate AMPK, including salicylate,³⁰ mangiferin,³¹ 5-amino-1- β -D-ribofuranosyl-imidazole-4-carboxamide (AICAR),³² and biguanides such as metformin,³³ have been shown to diminish serum-free fatty acid concentrations. We found that after 8 weeks of biotin supplementation, the serum fatty acid concentrations were significantly reduced in biotin-supplemented mice relative to the control group (Control: 1.12 ± 0.04 mM; Supplemented: 0.91 ± 0.03 mM; $P < .05$).

Lipolysis

Adipose tissue lipolysis is critical in the regulation of serum-free fatty acids.³⁴ The effect of pharmacological concentration of biotin on lipolysis has not been reported. To determine whether lipolysis participates in the decrease of free fatty acids, we measured free glycerol levels in the supernatant collected from isolated epididymal fat cells. No differences were observed between biotin-supplemented and control mice (0.29 ± 0.05 μ mol/mL for control vs 0.33 ± 0.08 μ mol/mL for biotin-supplemented) (Fig. 5).

DISCUSSION

Several studies have shown that pharmacological concentrations of biotin decrease hyperlipidemia. However, the pharmacological mechanisms by which biotin modify lipid metabolism are largely unknown. In a recent work,¹⁸ we

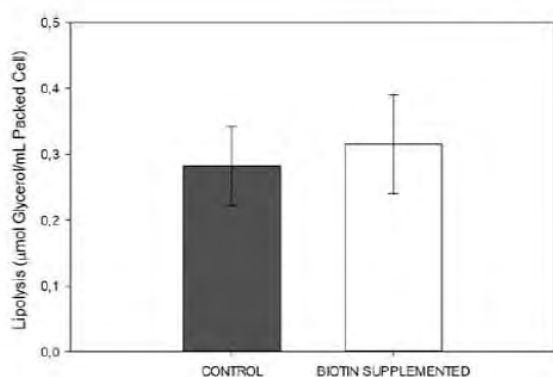


FIG. 5. Effect of biotin supplementation on basal lipolysis concentrations in mice fed a biotin-supplemented diet for 8 weeks. *Dark bars*: control group; *white bars*: biotin-supplemented group. Graph data are the mean \pm SE of values from 16–18 mice epididymal adipose tissue of each group performed in triplicate. * $P < .05$.

found that biotin supplementation in the liver increased the cGMP content and levels of active AMPK. Given that adipose tissue has a central role in lipid homeostasis and that both biotin^{15,17} and AMPK actions are tissue-specific regulated,^{19,21} we evaluated the effects of biotin supplementation in adipose tissue by measuring the protein abundance of active AMPK and several of its downstream targets, in addition to the cGMP content. The present results found that as in the liver, 8 weeks of dietary biotin supplementation increased the protein expression of the active AMPK and intracellular cGMP content in adipose tissue, which indicates that these signaling actions of biotin are similar between these tissues.

The signals that regulate AMPK activation are currently subject to active investigation.³⁵ The best-known AMPK regulators include the increased AMP/ATP ratio, the tumor suppressor gene liver kinase B1 (LKB1),³⁶ and calmodulin-kinase kinase-II.^{37,38} Recent studies^{39–41} have found that the cGMP/PKG (cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase)-signaling pathway acts as an upstream activator of AMPK. Deshmukh *et al.*³⁹ found that increased cGMP levels promote glucose transport concomitantly with AMPK activation in both skeletal muscle and the L6 muscle cell line; these effects were prevented by a guanylate cyclase inhibitor. In the desert snail *Otala lactea*, experiments inhibiting soluble guanylate cyclase demonstrated that the cGMP-dependent protein kinase signaling pathway regulates AMPK activity.⁴⁰ In cultured human adipose tissue cells, PKG-1 activation by atrial natriuretic peptide increased the levels of active AMPK.⁴¹ Both our present study and a previous report¹⁸ suggest a link between the cGMP signaling pathway and AMPK activation. Given the complexity of demonstrating signaling pathways *in vivo*, our present and previous study¹⁸ represent a first attempt at elucidating the effect of biotin-induced cGMP as an upstream activator of AMPK. Studies specifically designed to

address this question are currently being performed in our laboratory.

In adipose tissue, AMPK plays a central role in the regulation of lipid metabolism.²¹ Activated AMPK phosphorylates and inhibits acetyl-CoA carboxylase-1 and -2 activity.^{42,43} We found that, consistent with the reported action of AMPK in adipose tissue,^{42,43} biotin supplementation increased the abundance of phosphorylated acetyl-CoA carboxylase-1 and -2.

Acetyl-CoA carboxylase-2 regulates fatty acid oxidation.^{44,45} AMPK phosphorylates and inactivates acetyl-CoA carboxylase-2. Inactivation of acetyl-CoA carboxylase-2 leads to a fall in the malonyl-CoA content and a subsequent increase in fatty acid oxidation.⁴⁶ The effect of biotin supplementation on the inactive phosphorylated form of acetyl-CoA carboxylase-2 has not been previously documented. In the present work, we found that biotin supplementation increased the abundance of the phosphorylated form of the enzyme, which suggests that biotin might increase fatty acid oxidation in adipose tissue.

Our present results show that the free fatty acid concentrations decrease in mice fed a biotin-supplemented diet. Serum-free fatty acid homeostasis is the result of the concerted actions of metabolic pathways in the liver, muscle, and adipose tissue, including the regulation of lipogenesis, esterification, uptake, oxidation, and lipolysis. The present study demonstrates that biotin supplementation in adipose tissue does not affect lipolysis, but increases levels of the inactive forms of acetyl-CoA carboxylase-1 and acetyl-CoA carboxylase-2, forms of these enzymes that decrease fatty acid synthesis and increase fatty acid oxidation, respectively. These effects, together with the reduced mRNA expression of lipogenic enzymes observed in previous studies,¹⁵ indicate that decreased fatty acid synthesis and increased fatty acid oxidation may be involved in the biotin-induced decrease in serum-free fatty acid levels. Current studies in our laboratory are investigating the involvement of biotin supplementation on other metabolic pathways and tissues regulating fatty acid metabolism.

Studies *in vitro* have found that in human adipocyte atrial natriuretic peptide, a hormone that increases cGMP levels, increased lipolysis was attenuated by inhibition of AMPK activity, indicating that atrial natriuretic peptide regulates lipid metabolism through AMPK activation in human adipocytes.⁴¹ We found that epididymal adipocytes from mice fed a biotin-supplemented diet for 8 weeks increased cGMP levels and AMPK activation, but did not modify lipolysis. As has been found for AMPK activators,²¹ we speculate that differences between short and prolonged treatment, as well between *ex vivo* and *in vitro* conditions, may account for the contrasting results.

The biotin-induced reduction in serum fatty acid levels observed in this study is consistent with the effects of AMPK activators such as salicylate,³⁰ mangiferin,³¹ AICAR,³² and metformin³³; these compounds have also been shown to diminish serum-free fatty acid concentrations. Because elevated serum-free fatty acid is a risk factor for metabolic syndrome and its associated hyperlipidemia, fatty liver, and

insulin resistance,³⁴ the reduction in free fatty acids produced by biotin supplementation supports its pharmacological use in the treatment of these conditions. It is interesting to recall that niacin, another vitamin from the B-complex, has been used at pharmacological concentrations for more than fifty years as a lipid-lowering drug⁴⁷; its action is also related to decreased serum-free fatty acid levels.⁴⁷

The present work provides novel insight into the molecular mechanism of biotin effects on adipose tissue and contributes to the understanding of biotin-mediated hypolipidemic effects. This research may lead to new strategies in the development of therapeutic agents for dyslipidemia.

ACKNOWLEDGMENTS

Supported by research grant from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 99294-M, the Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México IN214811, and Fondos Federales 074/2013. This work is part of the PhD thesis of Daniel Boone Villa in the Doctorado en Ciencias Bioquímicas at Universidad Nacional Autónoma de México. Daniel Boone Villa was a recipient of the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología scholarship number 171109 and Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal code B112-079. Asdrubal Aguilera was a recipient of the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología and Programa de Mejoramiento del Profesorado scholarship number 91634 and UMSNH-208, respectively. We are grateful to Ing. Betzabé Linares Ferrer for computer assistance.

AUTHOR DISCLOSURE STATEMENT

No competing financial interests exist.

REFERENCES

- Haffner SM: Diabetes, hyperlipidemia, and coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1999;83:17F–21F.
- Zempleni J: Uptake, localization, and noncarboxylase roles of biotin. *Annu Rev Nutr* 2005;25:175–196.
- Fernandez-Mejia C, Lazo de la Vega-Monroy ML: Biological effects of pharmacological concentrations of biotin. *J Evid Based Complement Altern Med* 2011;16:40–48.
- Dakshinamurti K: Biotin—a regulator of gene expression. *J Nutr Biochem* 2005;16:419–423.
- Valenciano AI, Mayordomo R, de La Rosa EJ, Hallbook F: Biotin decreases retinal apoptosis and induces eye malformations in the early chick embryo. *Neuroreport* 2002;13:297–299.
- Simmins PH, Brooks PH: Supplementary biotin for sows: Effect on reproductive characteristics. *Vet Rec* 1983;112:425–429.
- Baez-Saldana A, et al.: Biotin deficiency and biotin excess: Effects on the female reproductive system. *Steroids* 2009;74:863–869.
- Fernandez-Mejia C: Pharmacological effects of biotin. *J Nutr Biochem* 2005;16:424–427.
- Marshall MW, Kliman PG, Washington VA, Mackin JF, Weinland BT: Effects of biotin on lipids and other constituents of plasma of healthy men and women. *Artery* 1980;7:330–351.
- Dokusova O, Krivoruchenko IV: [The effect of biotin on the level of cholesterol in the blood of patients with atherosclerosis and essential hyperlipidemia]. *Kardiologiya* 1972;12:113.
- Revilla-Monsalve C, et al.: Biotin supplementation reduces plasma triacylglycerol and VLDL in type 2 diabetic patients and in nondiabetic subjects with hypertriglyceridemia. *Biomed Pharmacother* 2006;60:182–185.
- Albarracin C, et al.: Combination of chromium and biotin improves coronary risk factors in hypercholesterolemic type 2 diabetes mellitus: A placebo-controlled, double-blind randomized clinical trial. *J Cardiometa Syndr* 2007;2:91–97.
- Hemmati M, Babaei H, Abdolsalehei M: Survey of the effect of biotin on glycemic control and plasma lipid concentrations in type 1 diabetic patients in kermanshah in iran 2008–2009. *Oman Med J* 2013;28:195–198.
- Suchy SF, Wolf B: Effect of biotin deficiency and supplementation on lipid metabolism in rats: Cholesterol and lipoproteins. *Am J Clin Nutr* 1986;43:831–838.
- Larrieta E, et al.: Pharmacological concentrations of biotin reduce serum triglycerides and the expression of lipogenic genes. *Eur J Pharmacol* 2010;644:263–268.
- Sahin K, et al.: Anti-diabetic activity of chromium picolinate and biotin in rats with type 2 diabetes induced by high-fat diet and streptozotocin. *Br J Nutr* 2014;110:197–205.
- Dakshinamurti K, Li W: Transcriptional regulation of liver phosphoenolpyruvate carboxykinase by biotin in diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 1994;132:127–132.
- Aguilera-Mendez A, Fernandez-Mejia C: The hypotriglyceridemic effect of biotin supplementation involves increased levels of cGMP and AMPK activation. *Biofactors* 2012;38:387–394.
- Lim CT, Kola B, Korbonits M: AMPK as a mediator of hormonal signalling. *J Mol Endocrinol* 2010;44:87–97.
- Hardie DG, Ross FA, Hawley SA: AMP-activated protein kinase: A target for drugs both ancient and modern. *Chem Biol* 2012;19:1222–1236.
- Bijland S, Mancini SJ, Salt IP: Role of AMP-activated protein kinase in adipose tissue metabolism and inflammation. *Clin Sci (Lond)* 2013;124:491–507.
- Sethi JK, Vidal-Puig AJ: Thematic review series: Adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J Lipid Res* 2007;48:1253–1262.
- Klop B, Elte JW, Cabezas MC: Dyslipidemia in obesity: Mechanisms and potential targets. *Nutrients* 2013;5:1218–1240.
- Baez-Saldana A, Ortega E: Biotin deficiency blocks thymocyte maturation, accelerates thymus involution, and decreases nose-rump length in mice. *J Nutr* 2004;134:1970–1977.
- Rodbell M: Metabolism of isolated fat cells: I. Effects Of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J Biol Chem* 1964;239:375–380.
- Spence JT, Koudelka AP: Effects of biotin upon the intracellular level of cGMP and the activity of glucokinase in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1984;259:6393–6396.
- Stockert RJ, Morell AG: Second messenger modulation of the asialoglycoprotein receptor. *J Biol Chem* 1990;265:1841–1846.
- Solorzano-Vargas RS, Pacheco-Alvarez D, Leon-Del-Rio A: Holocarboxylase synthetase is an obligate participant in biotin-mediated regulation of its own expression and of biotin-dependent carboxylases mRNA levels in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:5325–5330.

29. Ha J, Daniel S, Broyles SS, Kim KH: Critical phosphorylation sites for acetyl-CoA carboxylase activity. *J Biol Chem* 1994;269:22162–22168.
30. Hawley SA, *et al.*: The ancient drug salicylate directly activates AMP-activated protein kinase. *Science* 2012;336:918–922.
31. Niu Y, *et al.*: Mangiferin decreases plasma free fatty acids through promoting its catabolism in liver by activation of AMPK. *PLoS One* 2012;7:e30782.
32. Bergeron R, *et al.*: Effect of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside infusion on *in vivo* glucose and lipid metabolism in lean and obese Zucker rats. *Diabetes* 2001;50:1076–1082.
33. Lund SS, *et al.*: Impact of metformin versus the prandial insulin secretagogue, repaglinide, on fasting and postprandial glucose and lipid responses in non-obese patients with type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol* 2008;158:35–46.
34. Kolditz CI, Langin D: Adipose tissue lipolysis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010;13:377–381.
35. Hardie DG: AMP-activated protein kinase: An energy sensor that regulates all aspects of cell function. *GenesDev* 2011;25:1895–1908.
36. Hawley SA, *et al.*: Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol* 2003;2:28.
37. Hawley SA, *et al.*: Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab* 2005;2:9–19.
38. Gormand A, *et al.*: Regulation of AMP-activated protein kinase by LKB1 and CaMKK in adipocytes. *J Cell Biochem* 2011;112:1364–1375.
39. Deshmukh AS, *et al.*: Nitric oxide increases cyclic GMP levels, AMP-activated protein kinase (AMPK)alpha1-specific activity and glucose transport in human skeletal muscle. *Diabetologia* 2010;53:1142–1150.
40. Ramnanan CJ, McMullen DC, Groom AG, Storey KB: The regulation of AMPK signaling in a natural state of profound metabolic rate depression. *Mol Cell Biochem* 2010;335:91–105.
41. Souza SC, *et al.*: Atrial natriuretic peptide regulates lipid mobilization and oxygen consumption in human adipocytes by activating AMPK. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;410:398–403.
42. Daval M, *et al.*: Anti-lipolytic action of AMP-activated protein kinase in rodent adipocytes. *J Biol Chem* 2005;280:25250–25257.
43. Kim SJ, Jung JY, Kim HW, Park T: Anti-obesity effects of *Juniperus chinensis* extract are associated with increased AMP-activated protein kinase expression and phosphorylation in the visceral adipose tissue of rats. *Biol Pharm Bull* 2008;31:1415–1421.
44. Schreurs M, Kuipers F, van der Leij FR: Regulatory enzymes of mitochondrial beta-oxidation as targets for treatment of the metabolic syndrome. *Obes Rev* 2008;11:380–388.
45. Tong L: Acetyl-coenzyme A carboxylase: Crucial metabolic enzyme and attractive target for drug discovery. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:1784–1803.
46. Merrill GF, Kurth EJ, Hardie DG, Winder WW: AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. *Am J Physiol* 1997;273:E1107–E1112.
47. Vosper H: Niacin: a re-emerging pharmaceutical for the treatment of dyslipidaemia. *Br J Pharmacol* 2009;158:429–441.

14. Anexo II (Otras Publicaciones).

58 *Ciencia
Nicolaita*

Triglicéridos y su relación con el síndrome metabólico

Asdrúbal Aguilera-Méndez¹, Elda Beltrán-Peña¹, Hector Urquiza-Marín¹, Alfredo Saavedra-Molina¹, Daniel Boone-Villa² y Cristina Fernández-Mejía²

¹instituto de Investigaciones Químico Biológicas, UMSNH. ²Unidad de Genética de la Nutrición, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Instituto Nacional de Pediatría, México D.F.



Resumen

Los triglicéridos son biomoléculas de estructuras muy diferentes, pero que tienen en común el ser hidrofóbicas. Tienen diversas funciones en los seres vivos, entre ellas están las estructurales, de señalización y como fuentes de energía. También participan en la atenuación de la lipotoxicidad, transporte de ácidos grasos y transducción de señales. Existen varias enfermedades asociadas con alteraciones en el metabolismo de triglicéridos, siendo las patologías relacionadas con el síndrome metabólico las que tienen como denominador común alteraciones en el metabolismo de triglicéridos. En el mundo, el síndrome metabólico y sus padecimientos asociados son uno de los principales problemas de salud pública. La resistencia a la insulina es denominador común de la mayoría de las enfermedades asociadas al síndrome metabólico, como la obesidad, dislipidemias, enfermedades cardiovasculares y la diabetes tipo 2. En esta revisión se discutirán los mecanismos moleculares que se han propuesto para explicar las alteraciones del metabolismo de triglicéridos relacionados con enfermedades metabólicas asociadas al síndrome metabólico.

Palabras clave: Triglicéridos, metabolismo, síndrome metabólico, resistencia a la insulina.

Abstract


Triglycerides and its relationship with metabolic syndrome

 Purchase |  Email Article | [Show All Preview](#)

Full Paper

Karaya gum: general topics and applications


PAGES : 111-116

- 1  **Gabriel A.Lujan-Medina, Janeth Ventura*, Ana Claudia Lara Cenicerros, Juan Alberto Ascacio Valdés, Daniel Boone-Villa, Cristóbal Noé Aguilar**

Abstract

In recent years, there has been increasing interest for the use of hydrocolloids, particularly for the gums, these fact due to need to incorporate new natural sources from plants that for their physical, chemical and biological properties are excellent component to development of better drugs and food. Karaya gum is the most important hydrocolloid from India, this gum is an exudates from Sterculia urens tree, in despite of actually there are reports about their applications, structure and physical properties, these information is disperse. The main of this paper is provide an overview about the origin, the mechanic and rheological properties, chemical and structure and the several uses in food and pharmaceutical industries as drug delivery system and thickener, gelling, emulsifier, stabilizer and encapsulating agents.

[Close Preview](#)

 [PurchasePDF](#)

Effect of Varying Dose and Administration of Streptozotocin on Blood Sugar in Male CD1 Mice

Ventura-Sobrevilla, J.¹, Boone-Villa, V.D.³, Aguilar, C.N.³, Román-Ramos, R.², Vega-Ávila, E.², Campos-Sepúlveda, E.⁴ and Alarcón-Aguilar, F.*²

¹ Posgrado en Biología Experimental, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México; ² Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México; ³ Departamento de Investigación en Alimentos, Universidad Autónoma de Coahuila, Saltillo, Coahuila, México; ⁴ Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México.

*E-mail: aaasj2@prodigy.net.mx.

Received May 25, accepted July 28, 2011

Abstract

Streptozotocin (STZ) is used to induce experimental diabetes in rodents. There is however, controversy as to whether STZ induced diabetes models type 1 or 2 diabetes. We show that the grade of STZ-induced hyperglycemia in male CD1 mice is dependent on STZ dose. A single injection of high dose (130 or 150 mg/Kg body weight) or multiple injections (2, 3, 4 or 5) of low dose (40 mg/Kg body weight) STZ was administered intraperitoneally in non-fasted mice. Blood glucose and body weight were measured over 21 days for high dose and 21 and 28 days for low dose administration. On day three, high dose treatment produced hyperglycemia and body weight loss in comparison to mice without STZ, however unstable hyperglycemias and several deaths were observed during treatment. Hyperglycemia and body weight loss were seen with three or more injections of STZ at 21 days, whereas 4 and 5 injections produced severe hyperglycemia but not death. Mild hyperglycemia (250-450 mg/dL) was seen after 28 days following three injections of STZ. Therefore we concluded that a high dose STZ produces severe hyperglycemia in mice similar to a type 1 diabetic, and three successive administrations of STZ induces mild hyperglycemia in mice similar to type 2 diabetics.

Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a group of metabolic diseases characterized by hyperglycemia resulting from defects in insulin secretion or action or both, that affects carbohydrate, lipid, protein and nucleic acid metabolism [1]. The world prevalence of DM exceeds 220 million people and is rapidly increasing [2]. In Mexico, DM is considered a major health problem. Ninety percent of diabetic patients have DM type 2.

Hyperglycemia associated with DM is characterized by hypertension, oxidative stress, chronic inflammation and diseases associated with abnormal lipid profiles such as cardiovascular diseases. DM can be studied in animal models of the disease, although these animals do not present a complete picture of DM in humans. These experimental models are useful for biochemical or anatomical studies that target the effects of hyperglycemia on diabetic complications including neuropathy, nephropathy and cardiovascular diseases.

It is important to consider certain criteria in selecting an animal model of diabetes: (i) there must be a reliable method for establishing a consistent level of diabetes (e.g., hyperglycemia); (ii) to be able to maintain a steady level of diabetic change for the duration of the experiment; (iii) to understand the disease characteristic and progression of injury in the

rodent strain being employed; and (iv) achievement of a pathological state which has clinical relevance [3]. The common diabetic rodent models are genetically engineered, or created by changes in diet or use of chemical agents. The most used substances to induce diabetes in rodents are alloxan and streptozotocin (STZ). STZ (2-deoxy-2-(3-methyl-3-nitrosourea)-1-D-glucopyranose) is a broad-spectrum antibiotic which is produced by *Streptomyces achromogenes* (Fig. 1). The diabetogenic effect of STZ was first reported in 1963 by Rakieten *et al.* [4] after injection of a single intravenous dose in rats and dogs.

STZ has a structure similar to glucose (Glu) and N-acetyl glucosamine (GlcNAc) (Fig. 1). STZ is taken up by pancreatic β -cells via the GLUT 2 transporter where it causes β -cell death by DNA fragmentation due to the nitrosourea moiety. Three major pathways associated with cell death are: (i) methylation of DNA by the formation of carbonium ion (CH_3^+) resulting in the activation of the nuclear enzyme poly ADP-ribose synthetase as part of the cell repair mechanism and therefore NAD^+ depletion; (ii) free radical generation as hydrogen peroxide and (iii) nitric oxide production [3,5].



Quality and antioxidant properties of a reduced-sugar pomegranate juice jelly with an aqueous extract of pomegranate peels

Janeth Ventura^a, Francisco Alarcón-Aguilar^a, Rubén Roman-Ramos^a, Efraín Campos-Sepulveda^c, Maria L. Reyes-Vega^b, V. Daniel Boone-Villa^b, Edgar Iván Jasso-Villagómez^a, Cristóbal N. Aguilar^{b,*}

^a Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, C.P. 09340 México D.F., Mexico

^b Departamento de Investigación en Alimentos, Universidad Autónoma de Coahuila, C.P. 25280 Saltillo, Coahuila, Mexico

^c Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, C.P. 04510 México D.F., Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 June 2011
Received in revised form 6 May 2012
Accepted 3 July 2012
Available online 15 July 2012

Keywords:

Reduced-sugar pomegranate juice jelly
Peel pomegranate extract
Antioxidant activity

ABSTRACT

In the present study, the production of a reduced-sugar pomegranate juice jelly supplemented with an aqueous extract of pomegranate peel (PE) is described. Influence of different carbohydrate polymers (guar (G), xanthan (X) and tragacanth (T) gums) on rheological properties was studied. Combination GXT presented the most similar rheological behaviour to commercial jelly. Jelly (J) and jelly with PE (JE) were stored at 4 °C over an 8 week period for physical, chemical, antioxidant, microbiological and sensory analysis. J and JE showed similar values for °Brix, colour and Aw, though the pH of JE was lower than J. Thiol and phenolic compounds were higher in JE than in J. Antioxidant activity (radical scavenging activity and autooxidation of linoleic acid) was higher in JE than in J at 0 weeks, and were decreasing with time. Pomegranate juice with additives was generally less accepted than J and JE.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Pomegranate (*Punica granatum* Linn.) is a fruit that belonging to the Punicaceae family. Almost all parts of a pomegranate have biological activities and are used for the treatment of numerous diseases. In Unani and Ayurvedic folk medicines practiced in India, pomegranate flowers are used to manage type 2 diabetes mellitus (Saxena & Vikram, 2004). Clinical *in vivo* and *in vitro* assays have shown that juice, flower and fruit extracts have antioxidant and anti-inflammatory activities and create positive effects on glycaemia, insulin, dyslipidemia, blood pressure and foam cell formation; additionally, some mechanisms of these effects have been reported (Jurenka, 2008; Katz, Newman, & Lansky, 2007; Lansky & Newman, 2007). Gallic, ellagic, chlorogenic, *p*-coumaric acids, catechin, epigallocatechin 3-gallate, quercetin, rutin and luteolin are only some of the active phenolic compounds present in juice and flowers (De la Fuente & Manzanaro, 2003; Ippoushi, Takeuchi, & Azuma, 2009; Kang, Tanaka, Cho, & Yokozawa, 2009; Li, Qi, Huang, Yamahara, & Roufogalis, 2008; Moon, Yang, & Park, 2006; Nakagawa & Yokozawa, 2002; Pannala, Rice-Evans, Halliwell, & Singh, 1997; Xie et al.,

2008). However it is important to mention that some these active compounds can be also present in pomegranate peel (Lansky & Newman, 2007). In Mexico in 2008, the total annual pomegranate production was 3740 tons (SIAP, 2008); pomegranate peel comprises 30–40% of the total weight of the fruit (Al-Maiman & Ahmad, 2002; Fadavi, Barzegar, Azizi, & Bayat, 2005), thus generating 1122–1496 tons of agro-industrial residue. Pomegranate peel (skin, rind or husk) could have medicinal or industrial applications however, is considered an agro-industrial residue.

The development of products as functional food enriched with pomegranate peel active compounds, could be useful for the treatment of certain diseases such as the diabetes mellitus (DM). In addition, consumers worldwide are more conscious about the relationship between dietary habits and disease risk, such as that between obesity and DM and cardiovascular and gastrointestinal diseases (Espín, García-Conesa, & Tomás-Barberán, 2007). These facts have prompted the development of new foods to satisfy the new demands of the market and it is important to evaluate the food quality of these possible functional foods, before to studied their biological activities or theirs therapeutic properties.

Therefore, the objective of this work was to develop a reduced-sugar pomegranate juice jelly with the aqueous extract of pomegranate peel and to analyze its physical, chemical, antioxidant, microbiological and sensory properties.

* Corresponding author. Address: Departamento de Investigación en Alimentos, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Coahuila, Blvd. Venustiano Carranza y J. Cárdenas s/n, C.P. 25280 Col. República Oriente, Saltillo, Coahuila, México. Tel.: +52 844 416 9213; fax: +52 844 439 0511.

E-mail address: cristobal.aguilar@uaadec.edu.mx (C.N. Aguilar).

Original Article

MICROENCAPSULATION OF ELLAGIC ACID FROM POMEGRANATE HUSK AND KARAYA GUM BY SPRAY DRYING

GABRIEL A. LUJÁN-MEDINA^a, JANETH VENTURA^{b,c}, JUAN A. ASCACIO-VALDÉS^a, MIGUEL A. CERQUEIRA^a, DANIEL BOONE VILLA^{b,c}, JUAN C. CONTRERAS-ESQUIVEL^b, MIGUEL A. AGUILAR GONZÁLEZ^d, ANTÓNIO VICENTE^e, CRISTÓBAL N. AGUILAR^b

^aCEB-Centre of Biological Engineering, University of Minho, Campus de Gualtar, 4710057 Braga Portugal, ^bFood Research Department, School of Chemistry, Universidad Autónoma de Coahuila, Saltillo 25280, Coahuila, Mexico, ^cSchool of Health Sciences, University of the Valley of Mexico Campus Saltillo, Saltillo 25200, Coahuila, Mexico, ^dLaboratory of Characterization of Micro and Nanostructured Materials, Metallurgy and Ceramics, Centre for Research and Advanced Studies (CINVESTAV), National Polytechnic Institute, Ramos Arizpe 25903, Coahuila, Mexico, ^eAnimal Nutrition Department, Animal Sciences Division, Agrarian Autonomous University "Antonio Narro", Saltillo 25315, Coahuila, Mexico
Email: janeth_ventura@yahoo.com

Received: 25 May 2015 Revised and Accepted: 17 Nov 2015

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to obtain and characterize microcapsules with Ellagic Acid (EA) from pomegranate as core material and Karaya Gum (KG) as wall material.

Methods: EA was obtained from dry pomegranate peel powder via methanolysis and quantified by HPLC. Microcapsules were obtained preparing a dispersion containing KG and EA in phosphate buffer pH 8. The dispersion was processed in a spray dryer under specific conditions (Inlet temperature at 150 °C, feed flow at 30% and aspirator at 100 %) for obtaining of microcapsules. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, differential scanning calorimetry (DSC) and scanning electron microscopy (SEM) were used for characterization.

Results: Obtained material contains 98.03±2.82 mg EA/g of pomegranate peel. FTIR showed that there were changes in the molecular structure of microcapsules referred to raw materials. SEM confirmed that particles obtained had micron-size (1-5 µm). DSC analysis showed that raw materials had glass transition temperatures of 79.58 and 83.41 °C and for microcapsules the value was 67.25 °C.

Conclusion: Methanolysis is a viable technique for the obtaining of EA from the peel of pomegranate. KG shows good potential for be used as wall material for EA microencapsulation.

Keywords: Pomegranate husk, Ellagic acid, Karaya gum, Spray drier, Microcapsules.

INTRODUCTION

Ellagitannins belong to the class of hydrolyzable tannins, which are polyphenolic compounds that are chemically characterized by a group named hexahydroxydiphenic acid (HHDP) usually linked to

glucose as polyol unit [1-3]. When the ellagic tannins are exposed to acidic or alkaline conditions, the ester bonds are hydrolyzed realizing the HHDP group, then a spontaneous lactonization occurs to get a more stable form, giving origin to the molecule known as ellagic acid (EA) (fig. 1)[4-6].

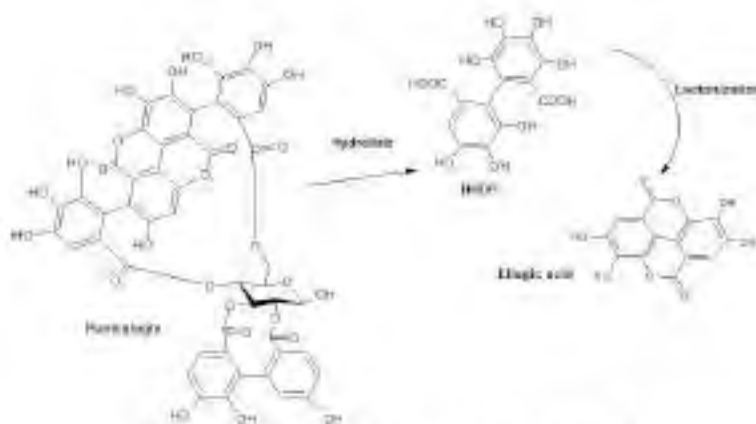


Fig. 1: Hydrolysis of an ellagitannin by Larrosa et al. [9]

The typical sources of these compounds are red fruits like strawberries, raspberries, blackberries and pomegranate, the content in these materials ranging from 1 to 1794 mg/100g [4, 10-

13]. Pomegranate peel is considered an agro industrial by product, however, several reports have demonstrated it contains great quantities of hydrolyzable tannins, mainly punicalagin [14-18].

Microbial biosynthesis of enzymes for food applications

4

J. Ventura-Sobrevilla, D. Boone-Villa, R. Rodriguez, J.L. Martinez-Hernandez, C.N. Aguilar
DIA-UAdC, School of Chemistry, Universidad Autónoma de Coahuila, Saltillo, México

4.1 Introduction

Protein biosynthesis occurs in the ribosome, which is assembled in the cytosol from two ribonucleoprotein subunits from the nucleolus. In the ribosome, messenger RNA (mRNA) is translated into a protein, for which the intervention of transfer RNA (tRNA) is also required. The process involves taking tRNA from the cytosol to the amino acid and leading the amino acid to the ribosome in the order marked on the mRNA nucleotides, which are the molds. Protein synthesis begins with the joining together of two amino acids and continues by adding new amino acids, one at a time, to one end of the chain.

The key to translation lies in the genetic code, which is comprised of combinations of three consecutive nucleotides or triplets of mRNA. Different triplets relate specifically to types of mRNA used in the synthesis of amino acids in proteins. Each codon is a triplet: There are a total of 64 codons, 61 of which are used to encrypt amino acids and 3 of which mark the termination of translation. These numbers are derived from a simple mathematical relationship: The four nucleotides (A, U, C, and G) are combined in groups of three, which generates 64 possible combinations. Because there are more codons (61) than amino acid types (20), almost all amino acids can be recognized by more than one codon, so some triplets are “synonyms.” Only tryptophan and methionine—two of the less common amino acids in proteins—are each encoded by a single codon.

Generally, codons that represent the same amino acid resemble each other and often differ only in the third nucleotide. Due to the low specificity of this nucleotide, it has been said that there is a “degeneration” at the third base of most codons. Finally, the number of codons in the mRNA determines the length of the protein. The three steps in protein synthesis are:

- (a) *Initiation.* The small ribosomal subunit binds to the 5' end of an mRNA molecule. The first tRNA molecule, the modified amino acid carrying fMet, plugs into the initiator AUG codon mRNA molecule. The large ribosomal unit is located, and tRNA occupies the P site (peptidic site). The A site (aminoacyl) is vacant. The initiation complex is now complete.
- (b) *Extension.* A second tRNA molecule with the amino acid bound to the A site moves to the anticodon and plugs into the mRNA. A peptide bond forms between the two amino acids assembled in the ribosome. At the same time, the link between the first amino acid and the tRNA is broken. The ribosome moves along the mRNA chain from the 5' to the 3' end, and the second tRNA-bound dipeptide in the P site is moved from the A site, as it follows the