



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“EFECTOS DE LA BIOTINA SOBRE LA LIPIDEMIA EN
MODELOS EXPERIMENTALES DE
HIPERTRIGLICERIDEMIA EN LA RATA”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

PRESENTA:

Laura Minerva Zaldívar Flores



TUTORA:

DRA. MARÍA CRISTINA REGINA FERNANDEZ MEJIA

MEXICO D. F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

<p>1. Datos del alumno. Zaldívar Flores Laura Minerva 55396898 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 094030994</p>
<p>2. Datos del tutor. Doctora María Cristina Regina Fernández Mejía</p>
<p>3. Datos del sinodal 1. Doctora María Eugenia Gonsebatt Bonaparte</p>
<p>4. Datos del sinodal 2. Doctor Mohamed El Hafidi Bentlakder</p>
<p>5. Datos del sinodal 3. Doctora María de la Paz Vital Becerra</p>
<p>6. Datos del sinodal 4. M. en C. Sara Teresa Méndez Cruz</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito. Efectos de la biotina sobre la lipidemia en modelos experimentales de Hipertrigliceridemia en rata. 63 p 2008</p>

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es producto del esfuerzo y del apoyo incondicional de toda la gente que se encuentra a mí alrededor principalmente:

A mi mamá que nunca dudo en brindarme todo su apoyo para poder llegar hasta este momento

A mi cachorro que sin saberlo sacrificó mucho del tiempo que le correspondía y porque ha sido el motor de mi vida.

A Aldo que fue el que me indico el camino por el cual debía seguir.

A la Unidad de Genética de la Nutrición por la infinita paciencia que nos tuvieron como estudiantes y posteriormente a mí como Tésista, y en especial a la Doctora Cristina por todas sus enseñanzas y a mis compañeros del laboratorio porque con ellos aprendí a valorar el trabajo en equipo.

A todos los sinodales por el tiempo invertido en la revisión de esta tesis.

Y por supuesto a la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO por TODO lo que me dio desde que ingrese a ella por primera vez

A la gente y a la Escuela Normal Superior de México que me apoyo en todo momento, siendo de gran importancia para lograr mi objetivo.

ÍNDICE

RESUMEN.....	6
I. ANTECEDENTES	
1.1 BIOTINA.....	8
1.1.1 Metabolismo de la biotina en mamíferos.....	9
1.1.2 Efecto de la biotina sobre la expresión genética.....	10
1.1.3 Efecto de la biotina sobre la transcripción.....	12
1.1.4 Efectos de la biotina sobre la traducción.....	13
1.1.5 Mecanismos moleculares de la biotina.....	13
1.1.6 Acción de la biotina sobre diversas funciones biológicas	14
1.1.7 Efectos de la biotina sobre el metabolismo de los carbohidratos.....	14
1.1.8 La biotina en el metabolismo de los lípidos.....	17
1.2 METABOLISMO DE LÍPIDOS	20
1.2.1. Lipogénesis.....	21
1.2.2. Lipólisis.....	24
1.2.3. Tipos de hipertrigliceridemia.....	25
1.2.3.1. Hipertrigliceridémias primarias.....	26
1.2.3.2. Hipertrigliceridémias secundarias.....	27
1.2.4. Hipertrigliceridemia inducida por azúcar.....	28

1.3. MODELOS ANIMALES DE HIPERTRIGLICERIDEMIA.....	30
1.3.1. Modelos espontáneos.....	31
1.3.1.1. Ratones ob/ob.....	31
1.3.1.2. Rata obesa Zucker fa/fa.....	31
1.3.1.3. Ratones <i>Spiny</i> y las ratas <i>Sand</i>	31
1.3.1.4. Ratas BHE.....	32
1.3.2. Modelos inducidos.....	32
1.3.2.1. Modelos inducidos por administración de sustancias químicas.....	32
1.3.2.2. Modelos inducidos por lesiones en el hipotálamo ventro medial.....	33
1.3.2.3. Modelos inducidos por hormonas.....	33
1.3.2.4. Modelos inducidos por manipulación genética....	33
1.3.2.5. Modelos inducidos por modificaciones dietéticas	34
II. JUSTIFICACIÓN.....	36
III. HIPÓTESIS.....	37
IV. OBJETIVOS.....	37
V. MÉTODOS.....	38
5.1. Modelos animales de hipertrigliceridemia.....	38
5.2. Determinación del efecto de la biotina sobre la hipertrigliceridemia.	39
5.3. Análisis de las concentraciones séricas de triglicéridos y colesterol	39
VI. RESULTADOS.....	42
VII. DISCUSIÓN.....	50
VIII. CONCLUSIÓN.....	54
IX. BIBLIOGRAFIA.....	55

I. RESUMEN

La hipertrigliceridemia y la intolerancia a la glucosa son factores de riesgo de la diabetes tipo 2, por lo que resulta importante desarrollar fármacos para el tratamiento de estas enfermedades. La biotina podría ser usada con este fin. Estudios clínicos en humanos encontraron que el tratamiento con dosis farmacológicas de biotina reduce la hipertrigliceridemia y mejora el estado diabético. El objetivo de esta Tesis es implementar un modelo experimental de hipertrigliceridemia inducida por la ingesta de sacarosa, en el que se estudiará el efecto de la biotina sobre la concentración sérica de triglicéridos. Se desarrollaron 3 diferentes protocolos. En dos de ellos se inició la ingesta de una solución de sacarosa al 30% a partir del destete, la diferencia radicó en el tipo de cepa: Sprague-Dawley, en el primer protocolo, y cepa Wistar en el segundo. En el tercer protocolo la ingesta de sacarosa al 30% se inició en ratas Wistar adultas de 250 g de peso. En los tres protocolos la administración de la sacarosa tuvo una duración de 20 semanas. El grupo control en los tres protocolos recibió agua durante el mismo período. Las ratas que desarrollaron hipertrigliceridemia se dividieron en dos grupos, uno de ellos fue tratado con una inyección intra peritoneal (ip) diaria de biotina de 2 mg/Kg, el otro con una inyección diaria ip del vehículo (PBS 0.1 M). Después del tratamiento durante 4 semanas se evaluaron: las concentraciones sanguíneas en ayuno de colesterol y triglicéridos. El análisis de los resultados mostró que las ratas de la cepa Wistar fueron susceptibles a desarrollar hipertrigliceridemia mediante la ingesta de sacarosa al 30%, en tanto que la dieta no modificó las concentraciones séricas de triglicéridos en las ratas Sprague-Dawley.

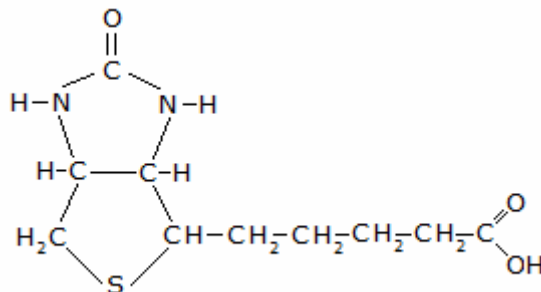
En el grupo de ratas Wistar que iniciaron la ingesta de sacarosa al 30% en el destete, no observamos un efecto significativo de la biotina sobre la concentración de triglicéridos. En tanto que en las ratas que iniciaron la dieta con sacarosa en la edad adulta (250 g de peso), la reducción en las concentraciones de triglicéridos séricos fue estadísticamente significativa. En resumen podemos concluir que se logró implementar el modelo experimental de hipertrigliceridemia a través de la ingesta de sacarosa. Este modelo permitirá en el futuro el estudio de los mecanismos mediante los cuales la biotina reduce la hipertrigliceridemia.

I. ANTECEDENTES

1.1 BIOTINA

La biotina (Esquema 1) es una vitamina hidrosoluble del complejo B cuya función más conocida en los organismos eucariontes es la de participar como grupo prostético de las enzimas acetil-CoA carboxilasa (ACC), tanto de la isoforma citosólica (ACC1) como de la mitocondrial (ACC2); y de las enzimas mitocondriales piruvato carboxilasa (PC); propionil-CoA carboxilasa (PCC) y metilcrotonil-CoA carboxilasa (MCC) (Chapman y Cronan, 1999). Estas enzimas participan en diversos procesos metabólicos tales como la gluconeogénesis, la lipogénesis y el catabolismo de aminoácidos.

Además de la participación de la biotina en procesos metabólicos como grupo prostético, la biotina modifica funciones biológicas como la proliferación celular, el desarrollo embrionario, funciones inmunológicas y el metabolismo a través de un efecto sobre la expresión genética (Rodríguez-Meléndez y cols, 2003; Pacheco-Álvarez y cols 2002).



Esquema 1. Estructura de la Biotina

1.1.1. Metabolismo de la biotina en mamíferos

Los mamíferos no pueden sintetizar la biotina, por lo que es necesario su consumo en la dieta diaria. La biotina se encuentra en los alimentos, en la mayoría de ellos unida al grupo ϵ -amino de una lisina formando el dímero conocido como biocitina, péptidos biotinilados, o bien en forma libre (Dakshinamurti y Chauhan, 1994). Para su absorción se requiere romper este enlace semi-peptídico por acción de la biotinidasa pancreática (Hymes y Wolf, 1996). La biotina libre se absorbe en el intestino y posteriormente pasa al torrente sanguíneo. La entrada a las células se lleva a cabo a través de un transportador múltiple de vitaminas dependiente del sodio (SMVT) (Cohen y Thomas 1982, Chatterjee y cols 1999). El SMVT es una proteína transmembranal que funciona como simportador electroneutro, introduciendo a la biotina y al ácido pantoténico junto con el sodio, a favor de un gradiente de concentración.

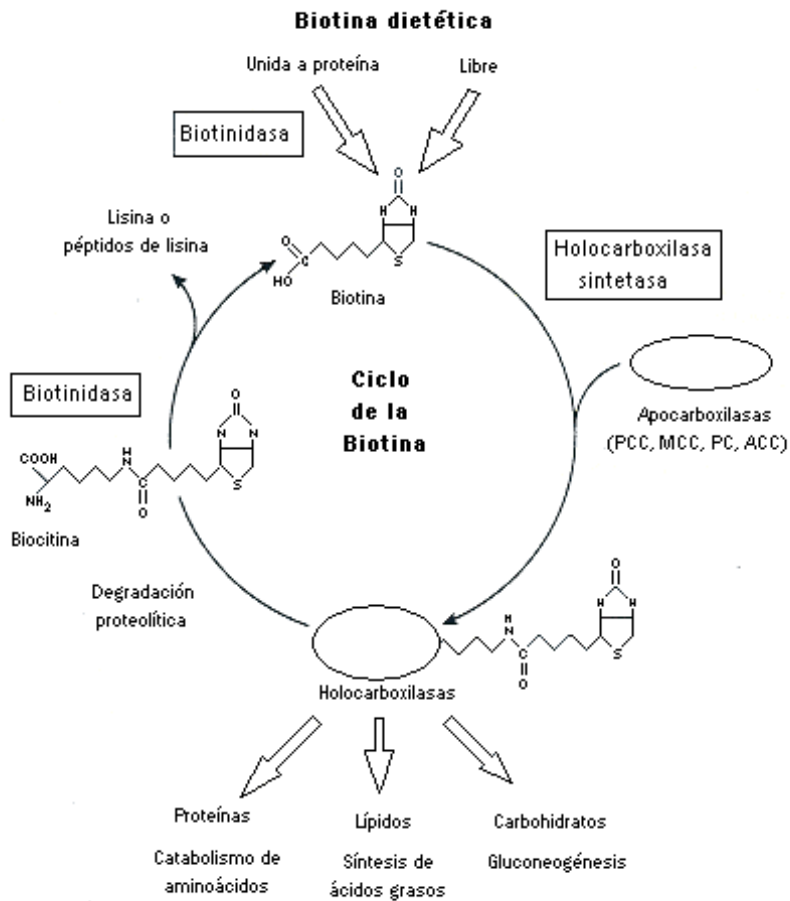
Las carboxilasas son sintetizadas como apocarboxilasas, sin actividad enzimática, en el citoplasma. Al unírseles la biotina covalentemente por acción de la holocarboxilasa sintetasa, se forma la proteína activa u holoenzima (Chapman-Smith y Cronan 1999).

Como todas las proteínas las holocarboxilasas son recambiadas continuamente. La proteólisis de las holocarboxilasas libera residuos de lisina unidos covalentemente a la biotina (biocitina). Este enlace se rompe por acción de

la biotinidasa, y de este modo la biotina puede ser reciclada e integrarse como grupo prostético a nuevas carboxilasas sintetizadas, o bien puede catabolizarse formando otros productos derivados y excretarse. La síntesis de las holocarboxilasas y su catabolismo se denomina ciclo de la biotina (Esquema 2).

1.1.2. Efecto de la biotina sobre la expresión genética

Observaciones que se realizaron en la década de 1960 sugerían que la biotina intervenía en diversas funciones biológicas independientemente de su acción como grupo prostético de las carboxilasas (Dakshinamurti y Cheah- Tan 1968a, 1968b; Deodhar y Mistry 1969). En la actualidad se ha establecido que, además de su función clásica como grupo prostético, la biotina modifica la expresión génica, tanto al nivel de la transcripción como de la traducción. Este efecto es análogo al de otras vitaminas que, aparte de sus funciones como sustratos y cofactores, regulan la expresión genética. Los ejemplos mejor estudiados son los de las vitaminas A y la D, que actúan como ligandos de receptores nucleares de la superfamilia de receptores hormonales y de esta manera, afectan diversas funciones como la morfogénesis, inmunidad, diferenciación y metabolismo (Balmer y Blomhoff, 2002).



Esquema 2. Ciclo de la biotina. Una vez que la biotina es introducida a las células, por acción de la holocarboxilasa sintetasa es transformada a biotinil-AMP, y de esta manera se une covalentemente a la apocarboxilasa. La forma activa u holocarboxilasa emplea a la biotina como acarreador del ión bicarbonato. Una vez que las carboxilasas son degradadas por proteólisis, se libera la biotina unida a la lisina (biocitina), y este producto por acción de la biotinidasa puede ser nuevamente utilizada en la formación de nuevas holocarboxilasas.

1.1.3. Efectos de la biotina sobre la transcripción

La biotina participa en la regulación de la transcripción de diversos genes. Esto se ha demostrado tanto para las enzimas que requieren de la vitamina como grupo prostético y sustrato, como son la holocarboxilasa sintetasa (HCS) (Rodríguez-Melendez y cols 2001, Solórzano-Vargas y cols 2002); la acetil Coenzima A carboxilasa -1 (ACC-1) y la propionil Coenzima A carboxilasa -A (PCCA) (Solórzano-Vargas y cols 2002); como para proteínas que no la requieren como cofactor; entre estas últimas se han identificado a la glucocinasa hepática (Chauhan y Dakshinamurti 1991), la fosfoenolpiruvato carboxilasa hepática (Dakshinamurti y Li 1994), la glucocinasa pancreática (Borboni y cols 1996, Romero Navarro y cols 1999); la insulina (Romero Navarro y cols 1999, Yoshikawa y cols 2002); el factor transcripcional PDX-1 (Yoshikawa y cols 2002), la interleucina 2 y el receptor de interleucina 2 (Rodríguez-Melendez y cols 2003, Manthey y cols 2002), los factores transcripcionales NF-kB (Chapman-Smith y Cronan 1999), N-myc, c-myc, N-ras y raf (Scheerger y Zemleni 2003). La acción de la biotina sobre la expresión genética parece ser muy amplia: en un estudio de microarreglos en células mononucleadas de sangre periférica humana, se encontró que la biotina afecta positivamente la expresión de 139 genes, mientras que disminuye la de otros 131 (Wiedmann y cols 2004).

1.1.4. Efectos de la biotina sobre la traducción

La biotina afecta la expresión de genes a nivel post-transcripcional. Investigaciones efectuadas por el grupo de Stocker (Collins y cols 1988, Stockert y Morell 1990, Stockert y cols 1992, Stockert y Ren 1997, De la Vega y Stockert 1999) encontraron que la vitamina modifica la expresión del receptor de asialoglicoproteínas y del receptor de insulina a través de una vía que requiere de GMPc y de la proteína cinasa G (PKG) (Collins y cols 1988, Stockert y Morell 1990, De la Vega y Stockert 2000).

1.1.5. Mecanismos moleculares de la biotina

En los últimos años han comenzado a delinearse los mecanismos moleculares a través de los cuales la biotina modifica la expresión de genes. Se han identificado diferentes vías que podrían participar en la acción genética de la vitamina como activación de la guanilato ciclasa soluble

Activación de la guanilato ciclasa soluble: Estudios pioneros de Vesely en 1982 descubrieron que la adición de biotina a extractos celulares aumentaba la actividad de la guanilato ciclasa soluble. Posteriormente Spence y Koudelka en 1984, encontraron que el aumento producido por la biotina en la actividad de la glucocinasa hepática estaba precedido por un incremento en las concentraciones intracelulares de GMPc, lo que sugería que la biotina ejercía su efecto génico a través de este segundo mensajero. A partir de entonces, diversos estudios han

identificado que un denominador común en el efecto de la biotina sobre la expresión genética involucra el incremento en la actividad de la guanilato ciclasa soluble (GCs), la elevación de las concentraciones de guanosil monofosfato cíclico (GMPc) intracelular, y la participación de la proteína cinasa G (PKG) (Solórzano-Vargas y cols 2002, Stockert y Morell 1990, De la Vega y Stockert 2000).

1.1.6. Acción de la biotina sobre diversas funciones biológicas

La proliferación celular (Zempleni y cols 2001, Bhullar y Dakshinamurti 1985), la función inmunológica (Rabin 1983, Báez-Saldaña y cols 1998), el desarrollo embrionario (Paul y Duttagupta 1976, Watanabe y Endo 1989, Watanabe y Endo 1990, Watanabe 1996) y el metabolismo de carbohidratos y de lípidos se ven afectados por la biotina. Estos efectos parecen estar mediados por la acción de la vitamina sobre la expresión de genes.

1.1.7. Efectos de la biotina sobre el metabolismo de los carbohidratos

Los efectos de la biotina sobre el metabolismo han sido puestos de manifiesto tanto *in vivo* como *in vitro* en diferentes condiciones fisiológicas: a) de deficiencia de biotina; b) en estado diabético.

a) Efecto de la deficiencia de biotina: Las primeras evidencias que sugirieron que la biotina intervenía en el metabolismo de los carbohidratos y permitieron el descubrimiento del efecto de la biotina sobre la expresión genética fueron

reportadas por el grupo de Dakshinamurti y cols 1962. (Mistry y cols 1962). Este grupo encontró que las ratas deficientes en biotina presentaban curvas de tolerancia significativamente más elevadas que los animales control (Dakshinamurti y Cheah-Tan 1968b). Estudios posteriores mostraron que las anomalías en el metabolismo de carbohidratos en ratas deficientes de la vitamina se debían a una disminución en la actividad de la glucocinasa hepática (Dakshinamurti y Ho Chong Hong 1970), enzima clave en la captación postprandial de glucosa por el hígado. El desarrollo de nuevas tecnologías de biología molecular permitió que Chauhan y Dakshinamurti (1991), demostraran que el efecto de la biotina sobre la glucocinasa hepática se produce a través de un aumento en la transcripción del gen. La deficiencia de biotina igualmente sirvió como herramienta para revelar que la biotina participa en la traducción del receptor de la insulina (De la Vega y Stockert 2000)

La deficiencia de biotina afecta el metabolismo del islote pancreático en rata. Estudios realizados en nuestro laboratorio con ratas deficientes de biotina mostraron que la carencia de esta vitamina produce una disminución tanto de la actividad como de la abundancia de ARN mensajero de la glucocinasa pancreática, enzima clave en el proceso que permite a la célula beta de los islotes secretar insulina en respuesta a la glucosa (Romero-Navarro 1999). Nuestros estudios igualmente revelaron que los islotes pancreáticos aislados de ratas deficientes de biotina, presentan una secreción disminuida de la insulina en respuesta a la glucosa. Esta disminución en la secreción de la hormona en

respuesta a la glucosa se observó igualmente en la perfusión *in vivo* de islotes pancreáticos aislados de ratas deficientes de biotina (Sone y cols 2000)

b) Efectos de la biotina en modelos diabéticos. En diversos estudios se han encontrado que la administración de dosis farmacológicas de biotina disminuye la hiperglucemia: Pacientes con diabetes tipo 1 tratados durante una semana con biotina (sin recibir insulina exógena), disminuyeron sus concentraciones de glucosa en ayuno (Coggeshal y cols 1985). En un estudio en pacientes japoneses diabéticos tipo 2, se encontró que la administración oral de 9 mg de biotina diariamente durante un mes disminuyó las concentraciones sanguíneas en ayuno de glucosa, piruvato y lactato; al suspender la administración de la vitamina se produjo un retorno a las concentraciones hiperglucémicas observadas antes del inicio del tratamiento. Nuestro grupo ha encontrado que en pacientes diabéticos tipo 2, el tratamiento con 15 mg/día de biotina durante 28 días disminuye el área de las curvas de tolerancia a la glucosa (Baez-Saldaña y cols. 2004).

En modelos animales con diabetes tipo 2 también se ha reportado que la biotina disminuye la hiperglucemia. En ratones de la cepa KK no obesos y en las ratas OLETF que presentan obesidad espontánea, se observó una disminución de la hiperglucemia y en la curva de tolerancia a la glucosa en respuesta al tratamiento con dosis farmacológicas de la vitamina (Stockert y Morell 1990, Stockert y cols 1992).

En resumen, el estado nutricional de biotina afecta el metabolismo de los carbohidratos; la deficiencia de biotina produce un efecto hiperglucemiante en tanto que dosis farmacológicas de biotina revierten la hiperglucemia. Este efecto concuerda con la acción de la biotina sobre la expresión de genes que favorecen la captación y el catabolismo de la glucosa, ejemplo de ellos son la glucocinasa hepática y pancreática, la insulina y el receptor de insulina; en tanto que disminuye la expresión de la enzima fosfoenolpiruvato carboxicinasas, enzima de acción hiperglucemiante que regula la gluconeogénesis.

1.1.8. La biotina en el metabolismo de los lípidos

Existen menos conocimientos del efecto de la biotina sobre la dislipidemia que los existentes sobre su efecto sobre la intolerancia a la glucosa. Dado que la biotina interviene directamente como cofactor de la acetil CoA-carboxilasa (1 y 2), enzima crucial en la síntesis y oxidación de ácidos grasos, existe por lo tanto una relación directa entre la deficiencia de biotina y el metabolismo de lípidos (Dakshinamurti y Desjardins 1968, Suchy y Wolf 1986).

Sin embargo en condiciones no deficientes de biotina también se ha encontrado que el tratamiento con dosis farmacológicas de la vitamina puede modificar las concentraciones de triglicéridos y colesterol. Steigerwal y Bohele (1960) encontraron que 30 minutos después de la inyección de 10 mg de biotina se produjo una disminución en la concentración de lípidos séricos totales. En

pacientes con aterosclerosis e hipercolesterolemia la administración de 5 mg de biotina durante 4 semanas produjo un decremento significativo sobre las concentraciones de colesterol total Dokusova y Krivoruchenko en 1972 y Scott en 1958 encontraron que 5 mg al día de biotina redujo la hipercolesterolemia, este tratamiento no produjeron modificaciones en sujetos con concentraciones normales de colesterol. Estudios en voluntarios sanos encontraron que la administración de 0.9 mg/día de biotina produjeron modificaciones en los niveles de lípidos plasmáticos (Marshall y cols 1980); estas modificaciones variaron dependiendo del tiempo de administración, encontrándose que durante las primeras dos semanas se incrementaron las concentraciones de lípidos totales, fosfolípidos y lipoproteínas alfa + beta. Posterior a este período se produjo una disminución en las concentraciones lipídicas, estas variaciones fueron mayores en los individuos que presentaron hiperlipidemia. En estudios en nuestro laboratorio (Baéz-Saldaña y cols. 2003, Revilla-Monsalve y cols 2006), se encontró que el tratamiento con 5mg de biotina tres veces al día disminuyó las concentraciones de triglicéridos plasmáticos en pacientes diabéticos y no diabéticos. La disminución fue más pronunciada en los pacientes cuyas concentraciones de triglicéridos se encontraban por arriba de 200 mg/dl, es decir 25% por arriba de los límites normales de triglicéridos sanguíneos (160 mg/dl).

En estudios con animales de experimentación también se ha encontrado que la biotina modifica la hiperlipidemia. En la cepa de ratas BHE con predisposición genética para desarrollar elevadas concentraciones sanguíneas de glucosa y de lípidos (Marshall y cols. 1969), el tratamiento con biotina disminuyó

las concentraciones plasmáticas de lípidos (Marshall y cols. 1976). Otros estudios han encontrado que la biotina previene el desarrollo experimental de aterosclerosis en conejos (Dokusova y Klimov 1967, Sinitsyna 1970).

Las observaciones efectuadas en humanos donde la administración farmacológica de biotina no modifica las concentraciones normales de colesterol, fueron encontradas también en ratas normolipémicas: dosis farmacológica de biotina no modificaron las concentraciones de colesterol (total, libre o esterificado), ni las fracciones lipoprotéicas de VLDL, LDL o HDL en animales normocolesterolémicos (Suchy y Wolf 1986). En estudios previos en nuestro laboratorio evaluamos el efecto de la administración de biotina sobre las concentraciones plasmáticas de colesterol y triglicéridos en ratas diabéticas de la cepa Zucker y en los ratones ob/ob, en estos modelos experimentales no observamos reducciones sobre la hipertrigliceridemia con el tratamiento con 2 mg/kg de peso de biotina (datos no publicados).

Se conoce poco sobre la regulación genética de las enzimas que participan en el metabolismo de lípidos por la biotina. Sin embargo, recientemente Levert y colaboradores (Levert y cols. 2002) encontraron que en la línea celular de adipocitos 3T3-L1 un análogo cloroacetilado de biotina (CABI), además de inhibir la actividad de la acetil-CoA-carboxilasa, reduce la expresión de los factores de diferenciación STAT 1 y STAAT 5a y de PPAR γ , factores transcripcionales que juegan un papel muy importante en el metabolismo de lípidos (Levert y cols 2002).

Estas primeras evidencias sugieren que el mecanismo de acción a través del cual la biotina afecta al metabolismo de los lípidos podría realizarse sobre la transcripción de estos genes.

1.2 METABOLISMO DE LÍPIDOS.

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

Los triglicéridos que provienen de la dieta son hidrolizados por lipasas pancreáticas en el lumen intestinal y emulsificadas por los ácidos biliares formando micelas. El colesterol y el retinol de la dieta son esterificados con un ácido graso para formar colesteril-ésteres o retinol-ésteres. En esta forma los lípidos son entonces empacados en partículas proteicas llamadas quilomicrones. Los quilomicrones se encuentran constituidos por apolipoproteínas, la más abundante es la ApoB-48; otras de las apolipoproteínas presentes son la A-I, A-1V, C-I, C-II, y C-III. Los quilomicrones son secretados a la linfa intestinal y transportados a la circulación. En las superficies endoteliales del tejido adiposo, principalmente, los quilomicrones pierden su contenido de triglicéridos por la acción catalítica de la

enzima lipoproteín lipasa. Dependiendo de las necesidades del adipocito, los ácidos grasos liberados son, ó bien oxidados ó bien re-esterificados en triglicéridos. El proceso mediado por la lipoproteín lipasa, también se lleva a cabo en el corazón y el músculo esquelético (Kasper D y cols. 2005).

En una dieta balanceada el mayor aporte de triglicéridos proviene de la dieta (Large y cols. 2004), sin embargo, como se señaló anteriormente, los triglicéridos son también sintetizados a partir de carbohidratos por el proceso de lipogénesis. El proceso de lipogénesis puede incrementarse hasta 2-4 veces en dietas con alto contenido de carbohidratos (Aarsland y cols. 1996, Aarsland y cols. 1997, Diraison y cols. 2002, Hudgins y cols 1996). También en individuos obesos (Faix y cols. 1993, Aarsland y cols. 1996, Aarsland y cols. 1997, Diraison y cols. 2002), individuos con resistencia a la insulina o en diabéticos tipo 2, la lipogénesis está incrementada. La glándula mamaria, el músculo, El hígado y tejido adiposo, efectúan el proceso de lipogénesis, pero estos 2 últimos, en donde esta vía tiene como fin la regulación del balance energético del organismo. La lipogénesis varía entre los mamíferos (Bergen y Mersmann 2005). El hígado tiene un papel central en la síntesis de lípidos en los humanos y en los roedores, en otras especies como conejos, cerdos, perros, gatos, ovejas y ganado el tejido adiposo es el sitio primario de la lipogénesis (Bergen y Mersmann 2005).

1.2.1. Lipogénesis.

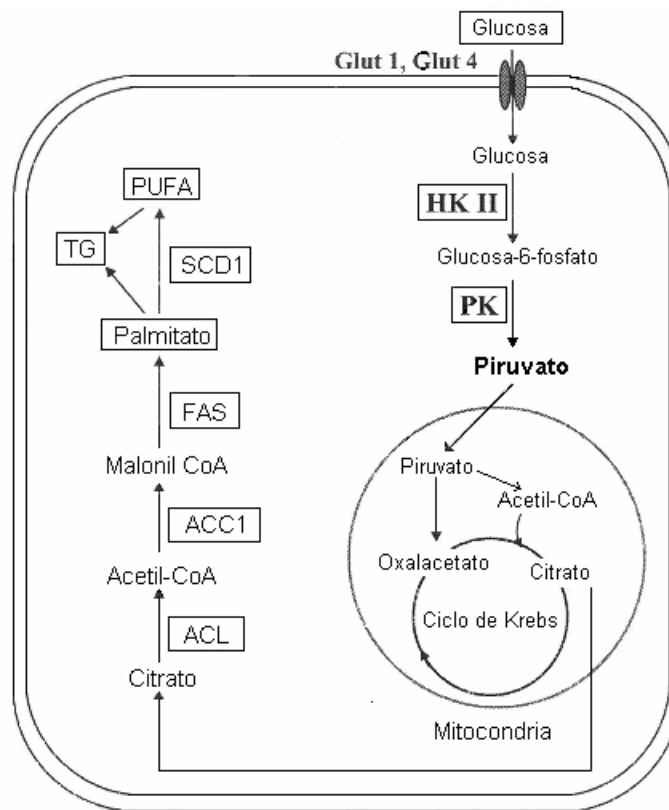
La lipogénesis a partir de carbohidratos utiliza la vía de la glucólisis para producir piruvato a través de la piruvato deshidrogenasa que es convertido a acetil-CoA y subsecuentemente en citrato en la mitocondria. A través de un acarreador en la membrana mitocondrial el citrato sale del organelo hacia el citoplasma donde es transformado por la enzima ATP-liasa, en acetil-CoA. La enzima acetil-CoA carboxilasa adiciona un carbono en forma de grupo carboxilo y transforma a este compuesto de 2 carbonos en un compuesto de tres carbonos llamado malonil-CoA, molécula que constituye el bloque básico en la síntesis de los ácidos grasos. El malonil CoA se une a la proteína acarreadora de acilos (ACP), en esta forma el malonil-CoA se conjuga con una molécula de acetil-CoA para formar acetoacetil-ACP, quién a través del proceso de beta reducción y de la posterior conjugación con el bloque básico, el malonil-CoA, forma un ácido graso con mayor número de carbonos, este paso se repite hasta formar ácidos grasos de cadena larga (palmitato). Tres ácidos grasos de cadena larga son entonces esterificados con una molécula de glicerol para formar triacilglicerol, más comúnmente llamado triglicérido (**Esquema 3.**). Algunos ácidos grasos sintetizados por el hígado son transportados unidos a albúmina. (Large y cols. 2004),

Los triglicéridos sintetizados en el hígado son transportados al tejido adiposo por las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), partículas similares a los quilomicrones en composición de proteínas pero que contienen apoB-100 en lugar de apoB-48. Al igual que los quilomicrones la captación de triglicéridos de las VLDL se produce por la acción catalítica de la lipoproteína lipasa en el tejido

adiposo y en el músculo; en el primero principalmente para su almacenamiento, en tanto que el músculo los utiliza para su oxidación.

La lipogénesis se encuentra activa después de la ingesta de alimentos, está favorecida por la insulina y por condiciones celulares de aumento de ATP y por ende reducciones de las concentraciones de AMP y ADP (carga energética).

Large y cols. 2004

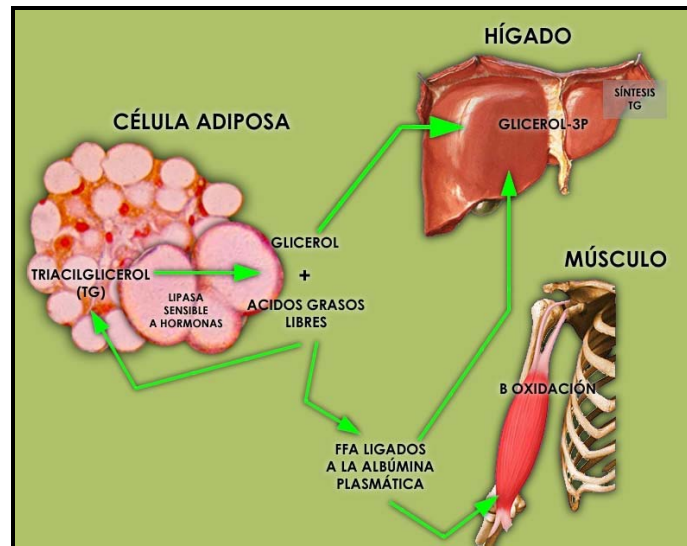


Esquema 3. Vía lipogénica en adipocitos. Partir del piruvato en la mitocondria tiene lugar la formación del precursor, acetyl-CoA, éste se combina con el oxalacetato para formar citrato. Hay una carboxilación del acetyl-CoA a malonil CoA mediante la acetil CoA-carboxilasa. Para la iniciación de la síntesis de una nueva molécula de ácido graso requiere acetil CoA y malonil CoA. Se unen a la enzima ácido graso sintasa (FAS) y se condensan para formar un ácido graso poliinsaturado **HKII**: hexocinasa II, **PK**: piruvato cinasa, **ACL**: ATP-citrato liasa, **ACC1**: acetil CoA carboxilasa 1, **FAS**:ácido graso sintasa, **SCD 1**: esteroil CoA desaturase 1, **PUFA**: ácidos grasos polisaturados, **TG**: triglicéridos

1.2.2. Lipólisis.

En condiciones de ayuno los triglicéridos almacenados en el tejido adiposo son hidrolizados en ácidos grasos y glicerol y liberados a la circulación para proporcionar energía a otros tejidos. La hidrólisis la lleva a cabo una enzima llamada lipasa sensible a hormonas, que como su nombre lo indica está regulada en respuesta a señales hormonales. Esta hormona está fuertemente activada por las catecolaminas, en tanto que su actividad es inhibida por la presencia de insulina. La lipólisis en los individuos normales es muy sensible a la presencia de insulina.

Los ácidos grasos son fuente de energía muy importante para el hígado, la corteza renal, el corazón y el músculo esquelético en reposo. Los ácidos grasos son oxidados en el proceso denominado beta oxidación (**Esquema 4**). Durante el ayuno la oxidación de lípidos representa casi un 70% de la energía. (Large y cols. 2004, Frayn 1998)



Esquema 4. Lipólisis El triacilglicerol se convierte en glicerol y tres ácidos grasos libres utilizando una lipasa sensible a hormonas que hidroliza el triacilglicerol.

1.2.3. Tipos de Hipertrigliceridémias.

La hipertrigliceridemia (HTG) es definida como una concentración anormal de triglicéridos (TG) en la sangre, puede ser de naturaleza primaria, secundaria o espontánea (Pejic y Lee 2006).

- **Primaria:** genética o familiar.- La Hipertrigliceridemia primaria es el resultado de varios defectos genéticos que conducen a un desorden en el metabolismo de triglicéridos y que condiciona la hiperlipidemia y ésta suele mostrarse en varios miembros de la familia ya que es considerada autosómica recesiva (Rubies J. 1992, Ascaso J. 1990)

- **Secundaria:** se presenta como una consecuencia de ciertas enfermedades que no afectan de forma primaria al metabolismo de los lípidos, también esta asociada con el consumo de determinados fármacos o tóxicos. La obesidad, la diabetes y el alcoholismo son buenos y frecuentes ejemplos de estas enfermedades. (Carmena R. 1990)
- **Esporádica:** es la hipertrigliceridemia que se presenta en pacientes aislados sin repercusión familiar de su desorden. Quizá tenga una base genética, pero no se puede demostrar, ocurre en el 6% de los supervivientes de infarto de miocardio y representa la cuarta parte de las hipertrigliceridemias.

1.2.3.1. Dentro de las **hipertrigliceridemias primarias** encontramos (Ascaso J. 1990):

- **Hiperquilomicronemia familiar.-** corresponde al **fenotipo I** y su frecuencia en la población es muy baja, se asocia a un aumento de quilomicrones. Existe un evidente aumento de triglicéridos debido a un déficit heredado en la actividad enzimática de la lipoproteína-lipasa. Esta es la enzima que hidroliza los triglicéridos y requiere la presencia de apoCII como cofactor para tener su máxima actividad:
- **Disbetalipoproteinemia familiar o fenotipo III.-** con herencia autosómica recesiva. En esta enfermedad existe bioquímicamente un aumento de colesterol y triglicéridos y una elevación de la β -VLDL.

- **Hipertrigliceridemia endógena o fenotipo IV.-** incluye la hipertrigliceridemia familiar, enfermedad autosómica dominante caracterizada por aumento de las VLDL. La hipertrigliceridemia sería el resultado de un desequilibrio entre la síntesis de las VLDL (superproducción) y su catabolismo (reducción). Los triglicéridos se hallan marcadamente elevados y el colesterol puede estar normal o discretamente aumentado.
- **Hipertrigliceridemia familiar (fenotipo V).-** Es de transmisión hereditaria dominante; diversos estudios metabólicos muestran que en los pacientes hipertrigliceridémicos con HFC hay una superproducción de VLDL y de los quilomicrones, es también poco frecuente.

1.2.3.2. Hipertrigliceridemia secundaria.

La hipertrigliceridemia secundaria se encuentra asociada a otras alteraciones metabólicas como la obesidad, la intolerancia a la glucosa o la diabetes (síndrome metabólico). (Carmena R. 1990, Rubies J. 1992)

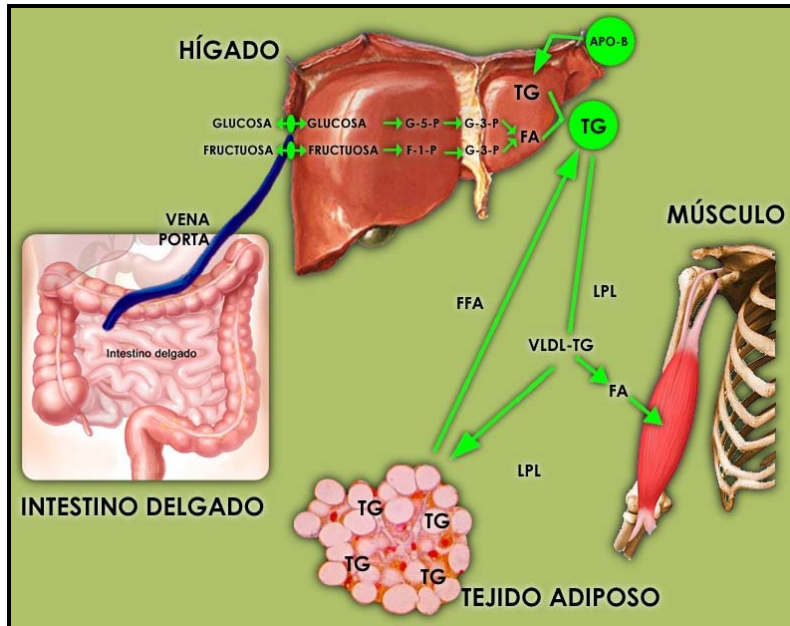
Información obtenida de la OMS, indica que en el año 2000 había en términos globales 330 millones de individuos adultos con obesidad (González y cols 2004) y con lo que respecta a México en la actualidad, más de 60% de la población padece sobrepeso y obesidad por lo que las enfermedades cardiovasculares y la diabetes tipo 2 ocupan hoy en día las primeras causas de mortalidad en nuestro país (Sánchez-Castillo y cols 2004). Esta condición es el resultado de una

interacción entre la susceptibilidad genética y ciertos factores ambientales, como la ingestión excesiva de carbohidratos, grasas y falta de ejercicio físico. La obesidad se expresa cuando la absorción de energía excede la utilización de esta por un periodo prolongado. La obesidad es consecuencia de un control metabólico anormal que se refleja en la acumulación de grandes cantidades de grasa en la cavidad abdominal y se asocia frecuentemente con alteraciones en el metabolismo de lípidos, de glucosa y con resistencia a la insulina. La obesidad es factor de riesgo dominante en el desarrollo de diabetes. La obesidad magnifica entre 2 y 10 veces el desarrollo de diabetes (United States National Commission of Diabetes to the Congress of United States; Bethesda MD: US Department of Health, Education and Welfare, 1975)

1.2.4. Hipertrigliceridemia inducida por azúcar:

El azúcar refinada (sacarosa) en la actualidad es uno de los mayores componentes de la dieta. Se ha encontrado consistentemente que un aumento en el contenido de carbohidratos en la dieta, particularmente sacarosa y fructosa, incrementan las concentraciones séricas de triglicéridos (Fried y Rao 2003), este incremento es mayor en sujetos con obesidad y resistencia a la insulina (Fried y Rao 2003). El mecanismo bioquímico de este aumento se esquematiza en la **Esquema 5**.

La sacarosa es un disacárido compuesto por los monosacáridos glucosa y fructosa. Después de su digestión, los monosacáridos que la constituyen pasan a la circulación sanguínea. La fructosa es principalmente tomada por el hígado, donde es fosforilada a fructosa-1-fosfato y convertida en glicerol-3-fosfato, que sirve como sustrato para la síntesis de triglicéridos. En el hígado la glucosa es metabolizada vía glucocinasa e isomerizada a fructosa-6-fosfato, su subsecuente metabolismo depende de la actividad de la fosfofructocinasa, enzima reguladora del proceso (Diaz-Zagoya J y Hicks J 1995). Como la fructosa se incorpora a la vía metabólica después de la acción de la fosfofructocinasa, la fructosa promueve la síntesis de triglicéridos y de VLDL. En sujetos con obesidad y resistencia a la insulina, la resistencia a la acción anti-lipolítica de la hormona favorece la hidrólisis de triglicéridos en el tejido adiposo un aumento del flujo de ácidos grasos al hígado, lo que exacerba la lipogénesis y como consecuencia hay una sobreproducción de triglicéridos y de VLDL. La resistencia a la acción de la insulina y/o el aumento de la síntesis de VLDL inducido por la sacarosa afecta también a la lipoproteína-lipasa, responsable de la hidrólisis de VLDL y captación de triglicéridos, esto repercute en un incremento de la hipertrigliceridemia. Scott M. Grundy 1999)



Esquema 5. Interrelaciones metabólicas entre glucosa y triacilglicerol. Cuando se encuentra disponible la fructosa de la dieta es rápidamente tomada por el hígado donde es convertido a glicerol-3-fosfato (G-3-P) favoreciendo la esterificación de ácidos grasos (FA) para formar triglicéridos TGs.

1.3. MODELOS ANIMALES DE HIPERTRIGLICERIDEMIA.

La importancia de los modelos animales experimentales radica en su utilidad para investigar mecanismos bioquímicos y moleculares que originan

enfermedades que atacan a los humanos, así como el estudio de mecanismos de fármacos y estrategias terapéuticas.

A pesar de la diferente dotación genética de cada especie, existen muchos genes idénticos entre el humano y diversas especies de mamíferos que hacen posible el uso de modelos animales, ya que éstos últimos presentan la ventaja de permitir la aplicación de técnicas de análisis que por razones éticas no sería posible efectuar en el hombre (Mathé 1995).

Existen diversos modelos animales para el estudio de la hipertrigliceridemia. De manera general estos modelos pueden clasificarse en 2 grandes grupos: a) espontáneos; b) inducidos

1.3.1. Modelos espontáneos

Estos modelos provienen de mutaciones espontáneas que desembocan en alteraciones en la regulación del metabolismo. A continuación se mencionan algunas de las características de los modelos experimentales más utilizados en el estudio de la diabetes. (Huges y cols 2002; Mendez y Ramos 1994).

1.3.1.1. Ratones ob/ob. El defecto genético radica en el gen que codifica para leptina, hormona adipocítica que controla el peso corporal. Este defecto genera un gran aumento de peso y desemboca en el desarrollo de diabetes, debido a defectos en la secreción y la acción de la insulina. La expresión

fenotípica depende del genoma y de factores nutricionales, siempre incluye la hiperinsulinemia, obesidad y resistencia a la insulina. (McNeill J 1999).

1.3.1.2. **Rata obesa Zucker fa/fa.** Es un modelo muy usado en estudios de obesidad. La obesidad es genéticamente producida por mutaciones en un gen autosómico recesivo (fa) del receptor de leptina identificado en el cromosoma 5 (Mathe 1995). Este modelo presenta hiperglicemia, hiperinsulinemia, hiperfagia, intolerancia a la glucosa, hipersecreción de insulina después de la ingesta de glucosa, baja secreción de glucagón. Las alteraciones en el metabolismo de lípidos se manifiestan por hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia. Este puede ser considerado como modelo para hipertrigliceridemia dislipidemia tipo IV. (Mendez J y Ramos H. 1994; McNeill J 1999)

1.3.1.3. **Ratones *spiny* y las ratas *sand*.** Estos animales en estado salvaje no desarrollan enfermedades relacionadas con el metabolismo de lípidos y carbohidratos debido a que ingieren dietas magras, sin embargo, en condiciones de laboratorio, tienen libre acceso a alimentos ricos en energía y manifiestan hiperinsulinemia, obesidad, insulinoresistencia e hiperglucemia. (Mendez J y Ramos H. 1994)

1.3.1.4. **Ratas BHE.** A diferencia de otros animales que desarrollan diabetes e hipertrigliceridemia conjuntamente con obesidad, esta cepa desarrolla intolerancia a la glucosa e hígado graso a los 300 días de edad sin aumento del peso corporal ni del tejido adiposo. (Mendez J y Ramos H. 1994)

Otros modelos experimentales son: los ratones KK, las ratas espontáneamente hipertensas (SHROB, Koletsky), el ratón obeso de Nueva Zelanda, el ratón NSY, las ratas OLETF y la rata Goto-Kakizaki.

1.3.2. Modelos inducidos

Los modelos inducidos se logran con la administración de sustancias químicas, lesiones en el hipotálamo ventro medial, inducción hormonal, manipulación genética (ratones transgénicos) y modificaciones dietéticas (Hugués B y cols 2002)

1.3.2.1. Modelos inducidos por administración de sustancias químicas

Uno de los modelos más utilizados para el estudio de diabetes y dislipidemias se produce a través de la destrucción de las células β del islote por citotóxicas químicas, como la *Streptozotocina* (STZ) y *Alloxán* (McNeill 1999). La acción de estas sustancias se produce sobre las células β de los islotes del páncreas, debido a su analogía estructural con la glucosa permite eficazmente ser transportado hacia dichas células (Grundy 1999).

1.3.2.2. Modelos inducidos por lesiones en el hipotálamo ventro-medial.

La administración de electrolitos en la zona ventro medial hipotalámica causa lesiones que provocan hiperfagia, hiperinsulinemia, (Hugués y cols. 2002)

hipertrigliceridemia, reducción de la oxidación de ácidos grasos, incremento de la utilización de glucosa y aumento de la lipogénesis, desarrollándose así el depósito de grasa llegando a la obesidad (Karakash y cols. 1977). Tras un período inicial de sensibilidad al aumento de insulina, se desarrolla el estado de resistencia, especialmente al nivel muscular. Cuando se administran en el núcleo paraventral inducen hiperfagia, obesidad y, algunas veces, intolerancia a la glucosa (Hugués y cols. 2002).

1.3.2.3. Modelos inducidos por hormonas.

Hormonas como los glucocorticoides han sido utilizadas como agente para el desarrollo de modelos animales con diabetes y resistencia a la insulina (Ogawa y cols. 1992).

1.3.2.4. Modelos inducidos por manipulación genética.

El desarrollo de estos modelos ha sido de gran ayuda en el entendimiento del papel que juega específicamente un gen en las funciones biológicas. Existen a la fecha múltiples ejemplos de ratones transgénicos de diversas proteínas que participan en el metabolismo de los lípidos (Chen y Farese 2002).

1.3.2.5. Modelos inducidos por modificaciones dietéticas.

Estos modelos son de gran utilidad en la comprensión de las alteraciones que producen dietas ricas en carbohidratos y lípidos, condición de la vida moderna que se considera tienen un papel primordial en el incremento del desarrollo de

diabetes tipo 2 y de enfermedades cardiovasculares (Fried y Rao 2003, Riccardi y cols. 2004).

- a. **Hipertrigliceridemia inducida por fructosa.** Kazumi y sus colaboradores han demostrado que dando fructosa produce una elevación triglicéridos plasmáticos en ratas diabéticas y no diabéticas y que esto está asociado no solamente al incremento en la secreción de VLDL-TG del hígado sino también a defectos en el catabolismo de VLDL-TG en la circulación (Kazumi y cols 1996).

- b. **Hipertrigliceridemia inducida por una dieta de sacarosa y grasa** Reaven y sus colaboradores desarrollaron hipertrigliceridemia en ratas jóvenes mediante la ingesta de sacarosa y grasa obteniendo una elevación en los niveles de triglicéridos plasmáticos resultado un incremento en la secreción de lipoproteínas VLDL (Reaven y cols 1979).

- c. **Hipertrigliceridemia inducida por dieta rica en grasas.** También se desarrollan modelos de hipertrigliceridemia con una dieta rica en grasas saturadas por periodos de seis meses donde se obtienen niveles de TG elevados (Tovar y cols 2002).

- d. **Hipertrigliceridemia inducida por dieta alta en sacarosa.** El modelo se produce a través de una dieta consistente azúcar refinada comercial. Esta dieta produce incremento de las concentraciones de ácidos grasos y triglicéridos, hiperinsulinemia e hipertensión arterial, así como aumento de la grasa intra-abdominal (El Hafidi y Baños 1997).

II. JUSTIFICACIÓN

Diversos estudios han encontrado que la administración de dosis farmacológicas de biotina reduce las concentraciones de triglicéridos en pacientes con hipertrigliceridemia. El efecto hipolipemiante de la vitamina también se ha observado en ratas de la cepa BHE con predisposición genética para desarrollar elevadas concentraciones sanguíneas de glucosa y de lípidos a los 300 días de edad, pero no en otros modelos experimentales como las ratas Zucker o los ratones ob/ob, posiblemente porque los defectos genéticos que producen la hipertrigliceridemia en estas cepas no se encuentran en el ámbito de acción de la vitamina. Debido a que en la actualidad la ingesta de grandes cantidades de azúcar refinada es una condición de la vida moderna que tiene un papel primordial en el desarrollo de hipertrigliceridemia, diabetes y enfermedades cardiovasculares, el objetivo de esta Tesis es el de implementar un modelo de hipertrigliceridemia inducido por azúcar refinada y analizar en éste el efecto de la biotina sobre las concentraciones sanguíneas de triglicéridos.

III. HIPÓTESIS.

Si la biotina reduce la hipertrigliceridemia en otros modelos de estudio como los humanos, entonces, es posible que la biotina reduzca la hipertrigliceridemia también en la rata.

IV. OBJETIVO GENERAL.

Analizar el efecto de la biotina sobre la hipertrigliceridemia inducida por altas concentraciones de azúcar refinada.

4.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Desarrollar el modelo experimental de hipertrigliceridemia en la rata.
- 2.- Evaluar el efecto de la biotina sobre las concentraciones plasmáticas de triglicéridos y colesterol en el modelo de hipertrigliceridemia.

V. MÉTODOS

5.1. Modelo Animal de Hipertrigliceridemia. Se implemento un modelo animal de hipertrigliceridemia inducido por la ingesta de azúcar refinada comercial a una concentración de 30% en el agua de bebida, ya que consideramos que este modelo tiene la ventaja de producir alteraciones metabólicas a partir del consumo de una gran concentración de carbohidratos refinados, condición de la vida moderna que tiene un papel primordial en el incremento del desarrollo de diabetes tipo 2 y de enfermedades cardiovasculares.

Se utilizaron lotes de ratas con aproximadamente 15 animales en cada uno de ellos. Los animales de cada lote se dividieron en dos grupos. A uno grupo se les administró agua potable (grupo control), al otro grupo una solución de sacarosa al 30%. Los dos grupos de animales fueron alimentados con dieta sólida normal para roedores (Laboratory Rodent Diet PMI 5001, St Louis MO, USA) por un periodo de 20 semanas. Ambos grupos se colocaron en condiciones ambientales de luz y temperatura controladas.

Se establecieron tres modelos experimentales de hipertrigliceridemia inducido por sacarosa: en la primera variante se utilizaron ratas de la cepa Sprague-Dawley a las cuales a partir del destete (3 semanas de edad) se les administró el tratamiento con sacarosa. El segundo modelo modificó la cepa de los animales empleando ratas de la cepa Wistar, a quienes de igual manera que en la primera variante se les mantuvo con la ingesta de las diferentes bebidas a partir del

destete. El tercer modelo utilizó ratas de la cepa Wistar, pero a diferencia del segundo modelo se inició el tratamiento cuando las ratas estaban en estado adulto con un peso de 250g.

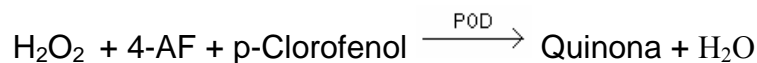
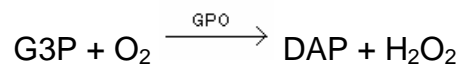
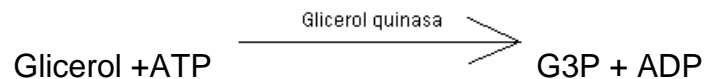
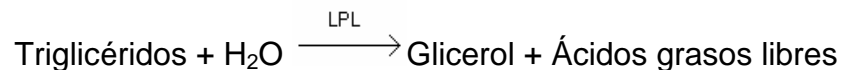
Semanalmente se midió el peso corporal de los animales, la cantidad de líquido consumido (solución de sacarosa o agua) y la cantidad de alimento ingerida por cada animal. Una vez cumplidas las 20 semanas con el tratamiento se realizó el análisis de las concentraciones de triglicéridos y colesterol de cada animal en los diferentes grupos.

5.2. Determinación del efecto de la biotina sobre la hipertrigliceridemia. Con el fin de determinar el efecto de la biotina sobre la hipertrigliceridemia al grupo de ratas consumiendo sacarosa se dividió en dos subgrupos. La mitad de las ratas hipertrigliceridémicas recibieron una inyección diaria de biotina (2mg/Kg de peso) durante 28 días, en tanto que la otra mitad recibió una inyección diaria de vehículo (PBS) por este mismo periodo; las ratas bajo el tratamiento con la vitamina o con el vehículo siguieron bebiendo sacarosa al 30%. Al terminar los 28 días del tratamiento se procedió al análisis de las concentraciones séricas de triglicéridos y colesterol.

5.3. Análisis de las concentraciones séricas de triglicéridos y colesterol: Después de un ayuno de 14 horas (toda la noche), se anestesiaron las ratas con éter y se tomaron muestras de sangre de la cola. Las células sanguíneas se separaron del suero por medio de centrifugación en una centrífuga Eppendorf

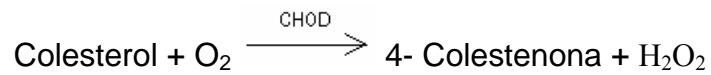
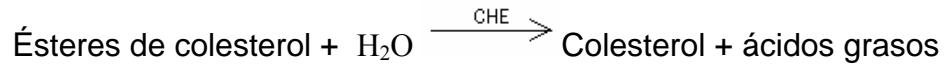
5804R durante 10 minutos a una velocidad de 1200 rpm. Las determinaciones de los triglicéridos y colesterol sérico se efectuaron por métodos fotolorimétricos mediante kits comerciales marca SPINREACT (Sant Esteve de Bas, [Girona] España).

El principio de la determinación de triglicéridos tiene como base: Los triglicéridos incubados con lipoproteinlipasa (LPL) liberan glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol es fosforilado por glicerolfosfato deshidrogenasa (GPO) y ATP en presencia de glicerol quinasa (GK) para producir glicerol-3-fosfato (G3P y adenosina-5-difosfato (ADP). El G3P es entonces convertido a dihidroxiacetona fosfato (DAP) y peróxido de hidrogeno (H₂O₂) por GPO. Al final, el peróxido de hidrogeno (H₂O₂) reacciona con 4-aminofenazona (4-AF) y p-clorofenol, reacción catalizada por la peroxidasa (POD) dando una coloración roja:



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de triglicéridos presentes en la muestra de ensayo.

El análisis de las concentraciones de colesterol tiene como fundamento químico que cuando se encuentra presente en la muestra origina un compuesto coloreado según la reacción siguiente:



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra ensayada.

VI. RESULTADOS

Estudios previos demostraron que la administración de biotina disminuye la concentración de triglicéridos séricos en individuos hipertrigliceridémicos (ver antecedentes). En este trabajo de tesis nos propusimos desarrollar el modelo animal de hipertrigliceridemia inducida por la ingesta de azúcar refinada, condición de la vida moderna que tiene un papel primordial en el desarrollo de hipertrigliceridemia, diabetes y enfermedades cardiovasculares.

Se implementó el modelo experimental de hipertrigliceridemia utilizando inicialmente ratas de la cepa Sprague-Dawley recién destetadas. El grupo control recibió únicamente agua potable. Durante el periodo de experimentación se midió el peso corporal de cada animal. Como se muestra en la FIGURA 1A, no se observaron diferencias en la ganancia de peso entre las ratas del grupo control y el grupo tratado con sacarosa. También consideramos el consumo de alimento: observamos en el grupo que recibió sacarosa el consumo fue menor que el ingerido por el grupo control (FIGURA 1B). Igualmente medimos la ingesta de líquido (FIGURA 1C) observamos que en las primeras cinco semanas del estudio las ratas del grupo que recibió sacarosa tomaron menos líquido que el grupo control, posteriormente no se observaron diferencias significativas en el consumo de líquido entre los dos grupos. El análisis del consumo de las kilocalorías totales aportadas por la dieta y la bebida no fue diferente en ninguno de los dos grupos (Figura 2D).

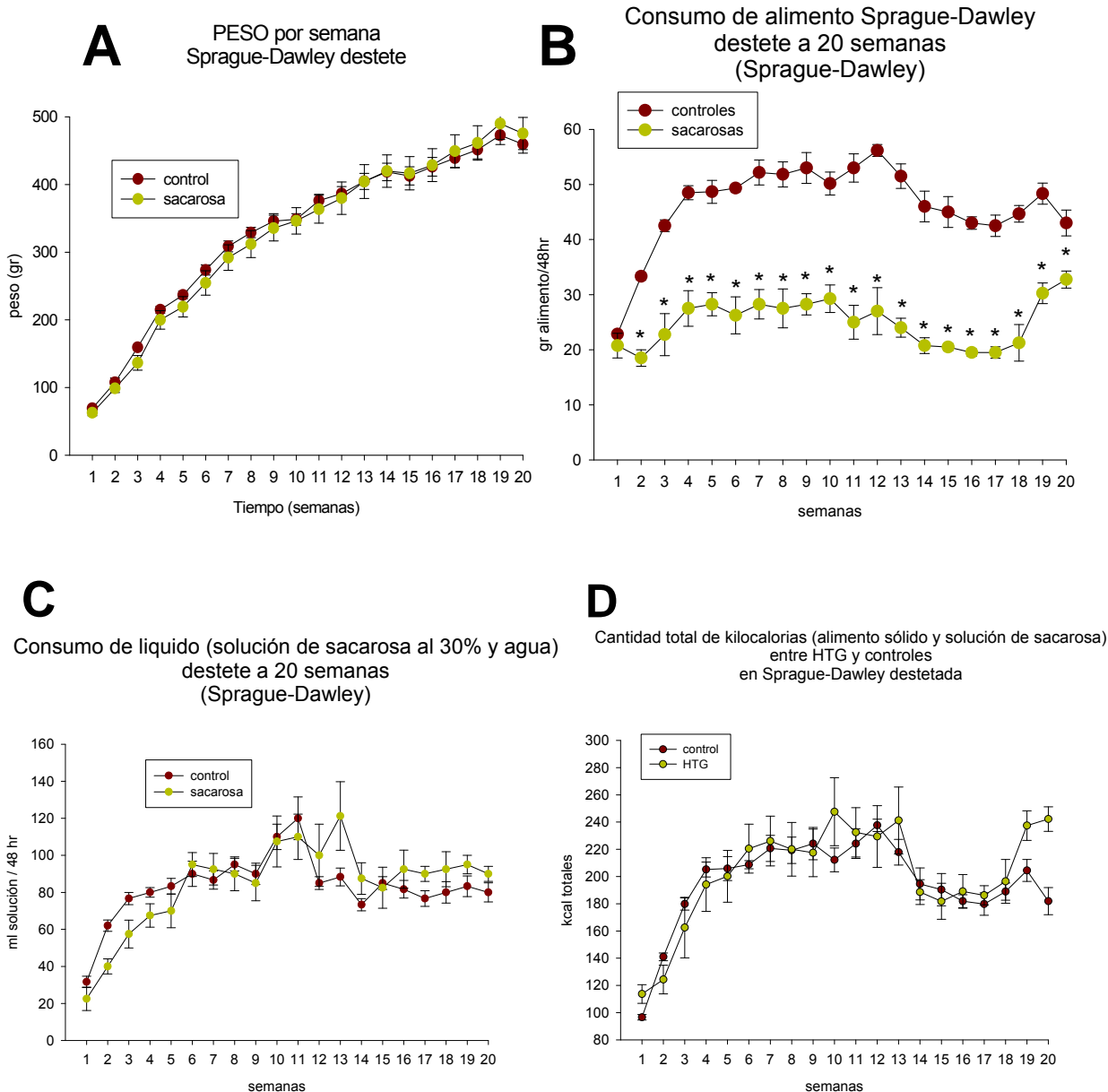


Figura 1. Efecto del consumo de solución de sacarosa al 30% o de agua sobre el **peso corporal** (panel A); el **consumo de alimento** (panel B); y **consumo de liquido** (panel C), el consumo de liquido y de alimento se midió en periodos de 48 horas por cada semana de vida de la rata. Círculos oscuros o cafes: grupo control, círculos claros o verdes: grupo experimental. (n = 4 ratas control, n = 6 ratas experimentales HTG) Los datos se reportan como la media \pm error estándar. * Diferencias significativas ($p \leq 0.05$). Anova de 2 vías.

A las 20 semanas de administración de las diferentes bebidas se determinaron las concentraciones de colesterol y triglicéridos séricos. Como se observa en la Tabla 1, no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de

triglicéridos entre las ratas tratadas con el azúcar y las ratas control. Tampoco hubo diferencias significativas en las concentraciones de colesterol entre los grupos ($p \leq 0.05$).

Tabla 1. Efecto del consumo de una solución de sacarosa al 30% sobre las concentraciones séricas de colesterol y triglicéridos, en ratas de la cepa **Sprague-Dawley**.

	Control n = 4	Sacarosa n = 6
Triglicéridos ml/dL	86.86 ± 6.01	88.77 ± 12.92
Colesterol ml/dL	45.27 ± 3.27	38.69 ± 2.89

Los valores se expresan como la media \pm error estándar. La significancia fue evaluada por el método de T student.

Dado que no se desarrolló el modelo de hipertrigliceridemia deseado en la cepa de ratas Sprague-Dawley, dilucidamos si esto podría deberse al tipo de cepa usada. Se estableció un segundo modelo experimental en la rata Wistar, cepa usada generalmente por otros investigadores (El Hafidi y Baños 1997). El protocolo de tratamiento fue similar al primer modelo experimental, a excepción de la cepa de roedor. Como se observa en la FIGURA 2A, la ganancia de peso en las ratas control fue significativamente más grande que en las ratas que recibieron sacarosa. El análisis del consumo de alimento reveló que las ratas que tomaron sacarosa consumieron menos alimento que las ratas que bebieron agua (FIGURA 2B). También evaluamos el consumo de líquido en donde observamos que durante las primeras seis semanas del ensayo el grupo que recibió sacarosa consumió menos líquido que el grupo control y a partir de las 11 semanas se observó un efecto ligeramente mayor en el grupo que consumió sacarosa respecto a los animales que tomaron agua posterior a este periodo se observó que la ingesta de líquido fue mayor en este último. (FIGURA 2C). El análisis del consumo

de las kilocalorías totales aportadas por la dieta y la bebida no fue diferente en ninguno de los dos grupos (Figura 2D).

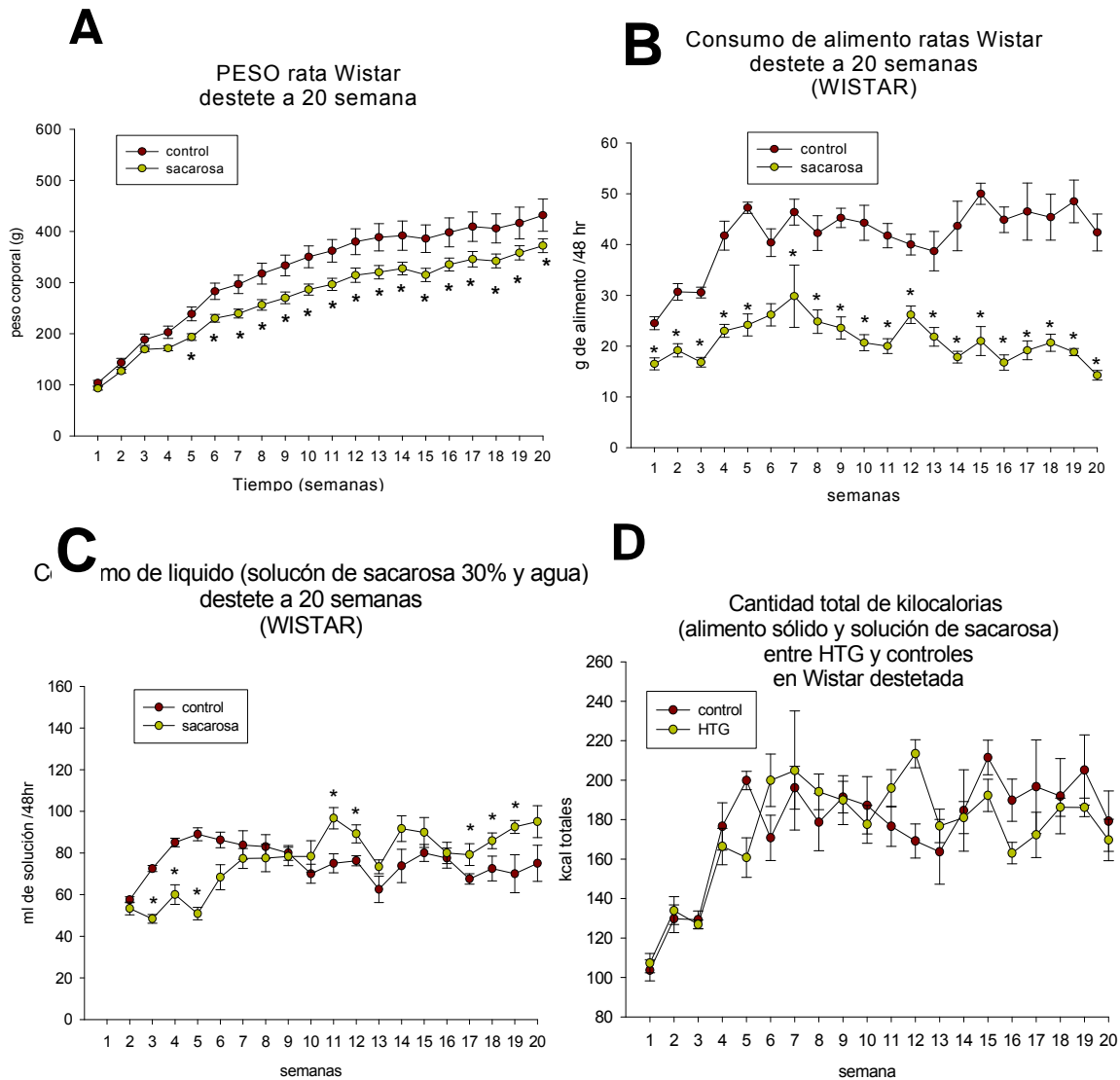


Figura 2. Efecto del consumo de solución de sacarosa al 30% o de agua sobre el **peso corporal** (panel A); el **consumo de alimento** (panel B); y **consumo de liquido** (panel C), el consumo de liquido y de alimento se midió en periodos de 48 horas por cada semana de vida de la rata. Círculos oscuros o cafés: grupo control, círculos claros o verdes: grupo experimental. (n = 4 ratas control, n = 6 ratas experimentales HTG) Los datos se reportan como la media \pm error estándar. * Diferencias significativas ($p \leq 0.05$). Anova de 2 vías.

Al final de 20 semanas determinamos las concentraciones de lípidos séricos (tabla 2). Observamos que las ratas que recibieron sacarosa presentaron concentraciones de triglicéridos aproximadamente del doble que las observadas

en las del grupo control. No se observaron diferencias significativas en las concentraciones del colesterol total.

Tabla 2. Efecto del consumo de solución de sacarosa al 30% sobre las concentraciones séricas de colesterol y triglicéridos en ratas de la cepa **Wistar**.

	Control n = 4	Sacarosa n = 6
Triglicéridos ml/dL	71.71 ± 12.89	132.29 ± 13.94 *
Colesterol ml/dL	45.35 ± 2.54	49.48 ± 4.66

Los valores se expresan como la media ± error estándar. La significancia fue evaluada por el método de T de Student. Se consideró como diferencia significativa una $P \leq 0.05$. (*).

Ya que logramos el objetivo de generar hipertrigliceridemia en ratas determinamos el efecto de la biotina sobre la concentración de triglicéridos y colesterol en este el modelo experimental. Con este fin, el grupo de ratas hipertrigliceridemicas recibieron una inyección diaria de biotina durante 28 días (2mg/Kg de peso). En la Figura 3 se muestra el efecto del tratamiento con biotina sobre el porcentaje de cambio en las concentraciones séricas de triglicéridos y de colesterol total. El análisis estadístico de los datos no mostró diferencias significativas entre los tratamientos ($P \geq 0.05$). De igual manera no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de cambio de las concentraciones de colesterol

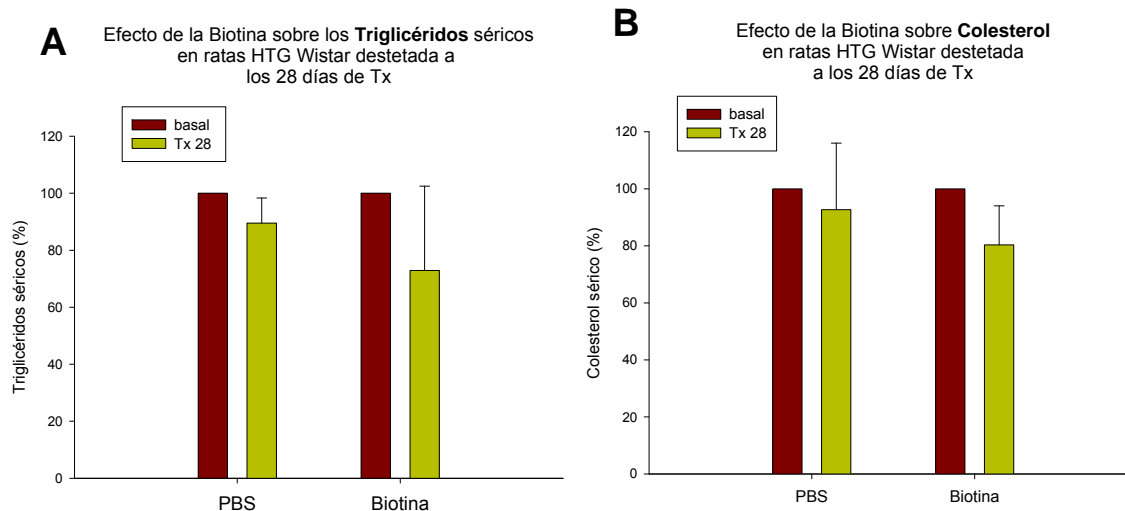


FIGURA 3. Porcentaje de cambio producidos por la biotina sobre las concentraciones de triglicéridos (PANEL A) o colesterol (PANEL B) en ratas hipertrigliceridémicas (n=4 ratas control, n=6 ratas experimentales HTG). Los valores se expresan como la media \pm error estándar.

Con el objetivo de disminuir la edad de experimentación establecimos un modelo de ratas adultas para producir hipertrigliceridemia. La estrategia consistió en administrar sacarosa al 30% en ratas adultas de 250 g de peso en lugar de a las 3 semanas de edad en el periodo del destete. En la Figura 4 se esquematizan los cambios en las concentraciones de triglicéridos séricos durante el periodo de experimentación. Observamos que la dieta con sacarosa aumentó significativamente ($P \leq 0.05$) las concentraciones de triglicéridos sanguíneos desde la décima semana de experimentación. Al final de las 20 semanas de dieta se determinaron las concentraciones séricas de lípidos (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto del consumo de una solución de sacarosa al 30% sobre las concentraciones séricas de colesterol y triglicéridos, en ratas de la cepa **Wistar 250 g**.

	Control n = 8	Sacarosa n = 12
Triglicéridos ml/dL	67.53 ± 6.80	110.48 ± 10.35 *
Colesterol ml/dL	59.14 ± 3.78	52.05 ± 2.79

Los valores se expresan como la media ± error estándar. La significancia fue evaluada por el método de Student. Se consideró como diferencia significativa una $P \leq 0.05$. (*).

En el grupo que recibió agua no se observaron modificaciones sustanciales sobre las concentraciones séricas de triglicéridos durante el periodo analizado.

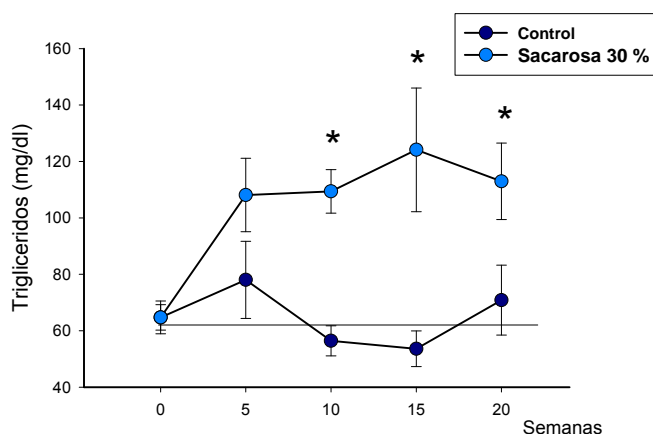


FIGURA 4. Curso temporal de la administración de sacarosa sobre las concentraciones de triglicéridos. En las ratas adultas (n=8 ratas control, n=12 ratas experimentales HTG). Los valores se expresan como la media ± error estándar. * Diferencia significativa $P \leq 0.05$.

En este tercer modelo analizamos el efecto del tratamiento con biotina sobre la concentración de triglicéridos y colesterol. Durante 28 días las ratas

hipertrigliceridémicas recibieron una inyección diaria de biotina (2mg/kg de peso Como se observa en la FIGURA 5 el tratamiento con biotina redujo aproximadamente 20% las concentraciones de triglicéridos y de colesterol $P \leq 0.05$.

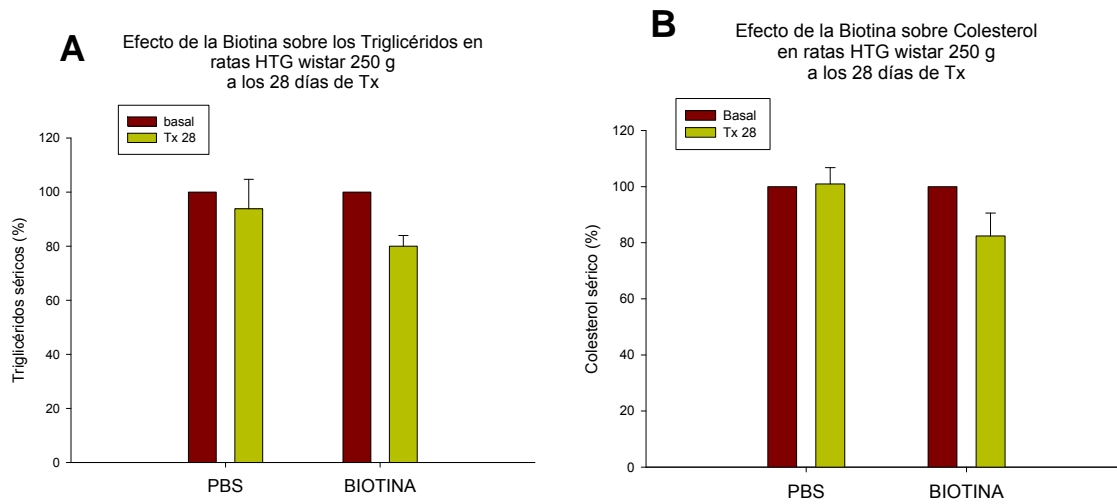


Figura 5. Porcentaje de cambio producidos por la biotina o vehículo sobre la concentración de triglicéridos (PANEL A) o colesterol (PANEL B) en ratas Hipertrigliceridemicas (n=4 Tx biotina y n=3 Tx vehículo PBS), Los datos se expresan como la media \pm error estándar $P \leq 0.05$

VII. DISCUSIÓN.

En este trabajo establecimos un modelo experimental de hipertrigliceridemia en ratas, mediante la ingesta de una solución de sacarosa al 30% y analizamos el efecto de la biotina sobre la hipertrigliceridemia. A continuación discutimos las observaciones obtenidas en nuestros estudios.

Efecto de la dieta con sacarosa en las ratas Sprague-Dawley. Los resultados mostraron que el consumo de la solución de sacarosa al 30% repercutió en una menor ingesta de alimento (Figura 1B), este efecto se observó durante todo el tiempo de la experimentación. La ingesta de la solución de sacarosa fue significativamente menor que la ingesta de agua en las primeras 4 semanas del estudio (Figura 1C). Observamos que la cantidad de calorías del alimento más calorías de la bebida fue similar en el grupo control y en el grupo que recibió sacarosa (Figura 1D), lo que resultó muy interesante ya que indica que los animales poseen mecanismos para regular su ingesta calórica. Esta capacidad ha sido descrita (Cummings y Overduin. 2007) y depende de señales metabólicas, neuroendócrinas y hormonales. Sorprendentemente, no se observaron diferencias en el peso corporal entre el grupo que recibió sacarosa y el grupo control (Figura 1A). Estos resultados coinciden con observaciones de Pagliassotti y cols (2000), quienes también encontraron que la ganancia de peso fue similar entre las ratas Sprawe-Dawley que consumieron una dieta isocalórica equicalórica sin sacarosa y aquellas que recibieron una dieta con alto contenido de sacarosa. Finalmente, las ratas de esta cepa no desarrollaron hipertrigliceridemia en respuesta a la ingesta

del azúcar (Tabla 1). La incapacidad de respuesta a la dieta de las ratas Sprague-Dawley podría deberse a la edad en que se inició la ingesta de sacarosa, ya que se ha encontrado que el efecto hipertriglicéridémico de las dietas conteniendo sacarosa no se observa en esta cepa cuando la dieta se inicia a las tres semanas de edad, en tanto que la dieta resulta efectiva cuando se administra a partir de las 5 semanas de edad (Pagliassotti y cols 2000).

Efecto de la dieta con sacarosa en las ratas Wistar. Los resultados mostraron que las ratas que consumieron la solución de sacarosa al 30% ingirieron menor cantidad de alimento sólido durante todo el tiempo de la experimentación (Figura 2B), lo que repercutió en una disminución en la ganancia de peso (Figura 2A). Comparadas con el grupo que recibió agua, las ratas que recibieron sacarosa consumieron menor cantidad de líquido durante las primeras semanas de experimentación, en tanto que el consumo fue mayor en las últimas 9 semanas del protocolo (Figura 2C). La ingesta calórica fue similar en el grupo control y en el grupo que recibió azúcar (Figura 2D). La dieta con sacarosa produjo un aumento de las concentraciones de triglicéridos (Tabla 2 y 3), tanto en los animales que iniciaron su dieta al destete como aquellas que la iniciaron en la edad adulta (250 g de peso).

Comparación entre cepas: Diversos reportes han documentado que existen diferencias fisiológicas (Preuss HG y cols 1992), hormonales (Kühn ER y cols 1983), metabólicas (Migler R. y Cascarazo J. 1983, Takasugi y cols 2003) y conductuales (Bekris S y cols 2005) entre las ratas Wistar y las Sprague-Dawley. En nuestros

estudios observamos diferencias al igual que similitudes en respuesta a la dieta con sacarosa. Entre las similitudes encontramos que en ambas cepas los animales consumieron menos alimento sólido (Figura 1B y 2B), lo que sugiere que la azúcar contenida en la bebida inhibió su apetito. En ambas cepas se observó un igual consumo de kilocalorías entre el grupo que consumió agua y el que recibió sacarosa (Figura 1D y 2D). Igualmente, fue semejante el menor consumo de sacarosa líquido durante las primeras semanas en las ratas que consumieron la solución de sacarosa que en las ratas que bebieron agua (Figura 1C y 2C). Por otro lado, una diferencia notable fue la diferencia en la ganancia de peso entre las cepas, en las ratas Wistar se observó menor ganancia de peso en las ratas que recibieron la solución de sacarosa (Figura 2A), en tanto que, como se señaló anteriormente en las ratas Sprague-Dawley no hubo diferencia de peso corporal entre el grupo que bebió agua y el grupo que recibió el azúcar (Figura 1A). Finalmente, las ratas de la cepa Sprague-Dawley no generaron hipertrigliceridemia con el tratamiento con sacarosa (Tabla 1) en tanto que la cepa Wistar si lo hizo (Tablas 2 y 3).

Es importante señalar que tanto el modelo de inducción de la hipertrigliceridemia desde el destete y el modelo experimental a partir de la edad adulta resultan costosos en tiempo y cuidados de experimentación. Además observamos que en el modelo inducido por sacarosa desde el destete observamos que la mortalidad en las ratas Sprague-Dawley fue de 0% en los animales control y de 30% en los de sacarosa; en la cepa Wistar la mortalidad fue de 0% en los animales control y de 0% en los de sacarosa. En el modelo de hipertrigliceridemia a partir de los 250

g de peso la mortalidad fue de 20% en los animales control y de 45% en los de sacarosa.

Efecto del tratamiento con biotina en las ratas hipertrigliceridémicas.

Logramos obtener dos modelos de hipertrigliceridemia a través de la ingesta de sacarosa al 30%; la diferencia primordial de estos modelos fue la fecha de inicio de la dieta: 3 semanas de edad en el primer modelo y edad adulta (250g de peso). En las ratas hipertrigliceridémicas que recibieron la dieta con sacarosa al 30 % desde las 3 semanas de edad el tratamiento con biotina no modificó las concentraciones de triglicéridos y de colesterol séricos sin embargo la dispersión de los datos y el número limitado de animales en el estudio constituyen una limitante para la interpretación de estos resultados. En el modelo experimental en el que el tratamiento con sacarosa se inició cuando los animales poseían 250 g de peso, se observó el efecto hipolipemiante de la biotina sobre las concentraciones séricas de colesterol y de triglicéridos.

Debido a que en la actualidad la ingesta de grandes cantidades de azúcar refinada es una condición de la vida moderna que tiene un papel primordial en el desarrollo de hiperlipidemia, el establecimiento de un modelo experimental que simule estas condiciones y que responda al efecto hipolipemiante de la vitamina es de gran importancia ya que permitirá, a diferencia de los modelos genéticos de hipertrigliceridemia, establecer el uso de la biotina como agente farmacológico en las condiciones causantes de la hipertrigliceridemia en la forma de vida actual.

VIII. CONCLUSIONES.

Se logró establecer un modelo de hipertrigliceridemia en ratas mediante la ingesta de azúcar refinada.

Las ratas de la cepa Wistar fueron susceptibles a desarrollar hipertrigliceridemia mediante la ingesta de sacarosa al 30%, en tanto que la dieta no modificó las concentraciones séricas de triglicéridos en las ratas Sprague-Dawley.

En el grupo de ratas Wistar que iniciaron la ingesta de sacarosa al 30% en el destete, no observamos (cambios significativos por) un efecto de la biotina sobre la concentración de triglicéridos, posiblemente por el reducido número de la muestra y la dispersión de los datos. En tanto que en las ratas que iniciaron la dieta con sacarosa en la edad adulta (250 g de peso), la reducción en las concentraciones de triglicéridos séricos fue estadísticamente significativa.

Este modelo de la cepa Wistar en estado adulto permitirá el estudio de los mecanismos mediante los cuáles la biotina reduce la hipertrigliceridemia.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Aarsland A, Chinkes D, Wolfe R. Hepatic and whole body fat synthesis in humans during carbohydrate overfeeding. *Am J Clin Nutr.* **1997**, 65, 1174-82.
- Aarsland A, Chinkes D, Wolfe RR. Contributions of de novo synthesis of fatty acids to total VLDL-triglyceride secretion during prolonged hyperglycemia/hyperinsulinemia in normal man. *J Clin Invest.* **1996**, 98, 2008-17.
- Ascaso J. 1990. Lo fundamental en hiperlipoproteinemias. Ediciones Doyma
- Baez-Saldana A, Diaz G, Espinoza B, Ortega E. Biotin deficiency induces changes in subpopulations of spleen lymphocytes in mice. *Am J Clin Nutr.* **1998**, 67(3):431-437.
- Baez-Saldaña A, Iván Zendejas-Ruiz, Cristina Revilla-Monsalve, Segio Islas-Andrade, Araceli Cárdenas, Alberto Rojas-Ochoa, Alonso Vilches and Cristina Fernandez-Mejia. Effects of biotin on pyruvate carboxylase, propionyl CoA carboxylase and markers for glucose and lipids homeostasis type 2 diabetic patients and in non-diabetic individual. *Am Journal Clin Nutr* **2003**.
- Baez-Saldaña A, Zendejas-Ruiz I, Revilla-Monsalve C, Islas-Andrade S, Cardenas A, Rojas-Ochoa A, Vilches A, Fernandez-Mejia C. Effects of biotin on pyruvate carboxylase, acetyl-CoA carboxylase, propionyl-CoA carboxylase, and markers for glucose and lipid homeostasis in type 2 diabetic patients and nondiabetic subjects. *Am J Clin Nutr.* **2004**, 79(2):238-243.
- Balmer JE, Blomhoff R. Gene expression regulation by retinoic acid. (review). *J Lipid Res.* **2002**, 43(11):1773-808.
- Bekris S, Antoniou K, Daskas S, Papadopoulou-Daifoti Z. Behavioural and neurochemical effects induced by chronic mild stress applied to two different rat strains. *Behav Brain Res.* **2005** Jun 3;161(1):45-59
- Bergen W, Mersmann H, Comparative Aspects of Lipid Metabolism: Impact on Contemporary Research and Use of Animal Models. *J Nutr.* **2005**;135,11,2499-2502

- Bhullar RP, Dakshinamurti K. The effect of biotin on cellular functions in HeLa cells. *J Cell Physiol.* **1985**, 123(3):425-430.
- Borboni P, Magnaterra R, Rabini RA, Staffolanni R, Porzio O, Sesti G, Fusco A, Mazzanti L, Lauro R, Marlier JN. Effect of biotin on glucokinase activity, mRNA expression and insulin release in cultured β -cell. *Acta Diabetol* **1996**; 33: 154-158.
- Carmena R. 1990. **Hiperlipoproteinemias. Clinica y tratamiento** ediciones Doyma
- Chapman A, Cronan J. Molecular biology of attachment to proteins. *J Nutr* **1999**; 129: 447S-484S.
- Chapman-Smith A, Cronan JE Jr. The enzymatic biotinylation of proteins: a post-translational modification of exceptional specificity. *Trends Biochem Sci* **1999**; 24: 359-363.
- Chatterjee N, Kumar C, Ortiz A, Rubin S, Said H. Molecular mechanism of the intestinal biotin transport process. *Am J Physiol* **1999**; 277 (46): C605-C613.
- Chauhan J., Dakshinamurti KC. Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats. *J Biol Chem* **1991**; 266: 10035-10038.
- Chen HC, Farese RV Jr . Fatty acids, triglycerides, and glucose metabolism: recent insights from knockout mice. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* **2002** Jul:359-63).
- Coggeshal JC, Heggors JP, Robson MC, Beker H. Biotin status and plasma glucose in diabetes. *Ann NY Acad Sci* **1985**; 447: 389-392.
- Cohen N, Thomas M. Biotin transport into fully differentiated 3T3-L1 cells. *Biochim Biophys Res Comm* **1982**; 108 (4): 1508-1516.
- Collins JC, Paietta E, Green R, Morell AG, Stockert RJ. Biotin-dependent expression of the asialoglycoprotein receptor in HepG2 cells. *J Biol Chem* **1988**; 263: 11280-11283.
- Cummings DE, Overduin J Gastrointestinal regulation of food intake. *J Clin Invest.* **2007** Jan; 117(1):13-23.

- Dakshinamurti K, Chauhan, J. Biotin-binding proteins. En Vitamin receptors: vitamins as ligands in cell communication. Cambridge University Press, EEUU. **1994**: 200-249.
- Dakshinamurti K, Cheah-Tan C. Biotin-mediated synthesis of hepatic glucokinase in the rat. *Arch Biochem Biophys* **1968a**; 127: 17-21.
- Dakshinamurti K, Cheah-Tan C. Liver glucokinase of the biotin deficient rat. *Can J Biochem* **1968b**; 46(1):75-80.
- Dakshinamurti K, Desjardins PR. Lipogenesis in biotin deficiency. *Can J Biochem* **1968**; 46(10):1261-1267.
- Dakshinamurti K, Ho Chong Hong. Regulation of key hepatic glycolytic enzymes. *Enzymol Biol Clin* **1970**; **11**(5):423-428.
- Dakshinamurti K, Li W. Transcriptional regulation of liver phosphoenolpyruvate carboxykinase by biotin in diabetic rats. *Mol Cell Biochem* **1994**; **132**: 127-132.
- De la Vega L, Stockert RJ. The cytoplasmic coatomer protein COPI-A potential Translational regulator. *J Biol Chem* **1999**; 274 (44): 31135-31138.
- De la Vega, L, Stockert R. Regulation of the insulin and asialoglycoprotein receptors via cGMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol- Cell Physiol* **2000**; 279 (6): C2037-C2042.
- Deodhar AD y Mistry SP. Gluconeogenesis in biotin deficiency: In vivo synthesis of pyruvate holocarboxylase in biotin deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Comm* **1969**; 34, 6: 755–759.
- Diaz-Zagoya y Hicks J 1995 Bioquímica. Interamericana-McGraw Hill. pp 135-137
- Diraison F, Dusserre E, Vidal H, Sothier M, Beylot M. Increased hepatic lipogenesis but decreased expression of lipogenic gene in adipose tissue in human obesity. *Am J Physiol* **2002**, 282, E46-51
- Dukosova OD, Klimov AN. Prevention of the development of experimental atherosclerosis by biotin. *Dokl, Akad, Nauk. SSSR*. **1967**:172:1454-6
- Dukosova OK, Krivoruchenko IV. The effect of biotin on the level of cholesterol in the blood of patients with atherosclerosis and essential hyperlipidemia. *Kardiologiya* **1972**; 12(12):113.

- El Hafidi M, Baños G. In vivo plasma lipid oxidation in sugar-induced rat hypertriglyceridemia and hipertensión. *Hypertension*. **1997** Sep;30(3 Pt 2): 624-8
- Faix D, Neese R, Kletke C, et al. Quantification of menstrual and diurnal periodicities in rates of cholesterol and fat synthesis in humans. *J Lipid Res*, **1993**, 34, 2063-75.
- Frayn K. 1998. Regulación del metabolism. Una perspectiva Humana. Ed. Omega, Barcelona pp 78-84
- Fried y Rao, Sugars, hypertriglyceridemia and cardiovascular disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **2003**; 78: 873S-880S
- González B., Moscoso R., López J.C., Chavarria S., Gómez M (eds) **2004**. Obesidad. Mc. Graw Hill. Mexico. Pag1-9
- Grundy S. Hypertriglyceridemia, Insulin Resistance, and the Metabolic Syndrome. *Am J Cardiol* **1999**; 83: 25F-29F
- Hudgins LC, Hellerstein MK, Seidman C, Neese R, Diakun J, Hirsh J. Human fatty synthesis is stimulated by a eucaloric low fat high carbohydrate diet. *J Clin Invest*, **1996**, 98, 2081-91
- Hugués B, Rodríguez J, Rodríguez J, Marrero M. Animales de Experimentación como Modelos de la Diabetes mellitus Tipo 2. *Rev Cub. Endocrinol* **2002**;13(2):160-168
- Hymes J, Wolf B. Biotinidase and its roles in biotin metabolism. *Clin Chim Acta* 1996; **225**: 1-11.
- Hymes J, Wolf B. Human biotinidase isn't just for recycling biotin. Review. *J Nutr.* 1999; 129(2S Suppl):485S-489S.
- Karakash, C., B . E. Hustvendt, A. Lovo, Y. Le March and B. Jeanrenaud. Consequences of ventromedial hypothalamic lesions on metabolism of perfused rat liver. *Am. J. Physiol.* 232(3): E286-E293, **1977**.
- Kasper D, Braunwald E, Fauci A., Hauser S, Longo D, Jameson J.L., (eds.) (2005). Harrison's principles of internal medicine. Mc Graw Hill. pag 2286-2298

- Kazumi T, Hirano T, Odaka H, Ebara T, Amano N, Hozumi T, Ishida Y and Yoshino G. VLDL Triglyceride Kinetics in Wistar Fatty Rats, an Animal Model of NIDDM. *Diabetes* 45: 806-811, **1996**
- Kazumi T, Yoshino G, Matsuba K, Iwai M, Iwatani I, Matsushita M, Kasama T, Hosokawa T, Numano F and Baba S. Effects of dietary Glucose or Fructose on the Secretion Rate and Particle Size of Triglyceride-Rich Lipoprotein in Zucker Fatty Rats. *Metabolism* 40:962-966, **1991**.
- Kühn ER, Bellon K, Huybrechts L, Heyns W. Endocrine differences between the Wistar and Sprague-Dawley laboratory rat: influence of cold adaptation. *Horm Metab Res.* **1983** Oct;15(10):491-8.
- Large V, Peroni O, Letexier D, Ray H, Beylot M. Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab* **2004**, 30, 294-309
- Levert KL, Waldrop GL, Stephens JM. A biotin analog inhibits acetyl-CoA carboxylase activity and adipogenesis. *J Biol Chem* **2002**; 277(19):16347-16350.
- McNeill John **1999** Experimental Models of Diabetes.
- Manthey KC, Griffin JB, Zampleni J. Biotin supply affects expression of biotin transporters, biotinylation of carboxylases and metabolism of interleukin-2 in Jurkat cells. *J Nutr* 2002; **132** (5): 887-892.
- Marshall MW, Smith BP, Lehman RP. Dietary response of two genetically different lines of inbred rats. Lipids in serum and liver. *Proc Soc Exp Biol Med* **1969**; 131:1271-7
- Marshall MW, Haubrich M, Washington VA, Chang MW, Young CW, Wheeler MA. Biotin status and lipid metabolism in adult obese hypercholesterolemic inbred rats. *Nutr Metab* **1976**; 20(1):41-61
- 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(4):330-351.
- Mendez J. Ramos H. Animal Models in Diabetes Research. **1994**; 25 (4) 367-375.
- Mathé D. Dyslipidemia and Diabetes: Animal Models. *Diabetes and Metabolisme*, **1995**, 21, 106-111.

- Migler R, Cascarano J. Effect of chronic hypoxia and high sucrose diet on body weights and glycolytic enzyme activities in liver, heart, and gastrocnemius of Sprague-Dawley and Wistar rats. *Comp Biochem Physiol B*. **1983**;75(2):277-85
- Mistry SP, Dakshinamurti K, Modi VV. Impairment of glucose utilization in biotin deficiency. *Arch Biochem Biophys* 1962; **96**: 674-675.
- Mittendorfer B, Sidossis L. Mechanism for the increase in plasma triacylglycerol concentrations after consumption of short-term high-carbohydrate diets. *Am J Clin Nutr*, 2002, 73, 892-9
- Ogawa A, Johnson JH, Ohneda M, Mc Allister CT, Inman L, Alam T, Unger RH. (Roles of insulin resistance and beta-cell dysfunction in dexamethasone-induced diabetes.)**1992**, *J. Clin. Invest.* 90(2):497-504
- Pacheco-Alvarez D, Solorzano S, Leon del Rio A. Biotin in metabolism and its relationship to human disease. *Ach Med Res* 2002; **33**: 439-447.
- Paul PK, Duttagupta PN. The effect of an acute dose of biotin at a post-implantation stage and its relation with female sex steroids in the rat. *J Nutr Sci Vitaminol* 1976; **22**(3):181-186.
- Pagliassotti MJ, Gayles EC, Podolin DA, Wei Y, Morin CL. Developmental stage modifies diet-induced peripheral insulin resistance in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. **2000** Jan;278(1):R66-73.
- Pan SY, Yang R, Han YF, Dong H, Feng XD, Li N, Geng W, Ko KM. High doses of bifendate elevate serum and hepatic triglyceride levels in rabbits and mice: animal models of acute hypertriglyceridemia. *Acta Pharmacol Sin*. 2006;27(6):673-8.
- Pejic RN, Lee DT. Hipertriglyceridemia. *J Am Board Fam Med*. 2006; 19(3):310-6
- Preuss HG, el Zein M, Knapka J, MacArthy P, Yousufi AK, Gleim GW, Glace B, Zukowska-Grojec Z. Blood pressure responses to sucrose ingestion in four rat strains. *Am J Hypertens*. **1992** Apr;5(4 Pt 1):244-50
- Rabin BS. Inhibition of experimentally induced autoimmunity in rats by biotin deficiency. *J Nutr* 1983; **113**(11):2316-22.

- Reaven, G. M., T.R. Risser, Y-D. I. Chen and E.P. Reaven. Characterization of a model of dietary-induced hipertrigliceridemia in young, nonobese rats. *J.Lipid Res.* **1979**. 20:371-378
- Revilla-Monsalve Cristina, Zendejas-Ruiz Iván, Báez Saldaña Armida, Palomino-Garibay Miguel Angel, Hernández-Quiroz Pedro Martín and Fernandez-Mejia Cristina. Biotin supplementation reduces plasma triacylglycerol and VLDL in type 2 diabetic patients and in nondiabetic subjects with hypertriglyceridemia. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2006**; 60:182-185.
- Riccardi G, Giacco R, Rivellese AA .Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clin Nutr.* **2004** Aug;23(4):447-56.).
- Rodríguez-Melendez R, Camporeale G, Griffin JB, Zempleni J. Interleukin-2 receptor γ -dependent endocytosis depends on biotin in Jurkat cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; **284**: C415-421.
- Rodriguez-Melendez R, Cano S, Mendez ST, Velazquez A. Biotin regulates the genetic expression of holocarboxylase synthetase and mitochondrial carboxylases in rats. *J Nutr* 2001; **131**: 1909-1913.
- Rodriguez-Melendez R, Zempleni J. Regulation of gene expression by biotin (review). *J Nutr Biochem* 2003; **14**: 680-690.
- Romero-Navarro G, Cabrera-Valladares G, German MS, Matschinsky FM, Wang J, Fernandez-Mejia C. Biotin Regulation of Pancreatic Glucokinase and Insulin in Primary Cultured Rat Islets and in Biotin Deficient Rats. *Endocrinology* **1999**; 140; 4595-4600.
- Rubies J. 1992 Temas actuales en hiperlipidemias y arteriosclerosis. Espaxs. Barcelona
- Sánchez-Castillo C, Pichardo-Ontiveros E., López-R Patricia. The epidemiology of obesity. *Gac Med Mex* **2004** Jul-Ago 140, supl 2: S3-S20
- Scheerger SB, Zempleni J. Expression of oncogenes depends on biotin in human small cell lung cancer cells NCI-H69. *Int J Vitam Nutr Res* 2003; **73**(6):461-467.
- Scott D. Clinical biotin deficiency report of case with some remarks on serum cholesterol. *Acta Med Scand* **1958**; 162:69-70 131-134.

- Scott M. Grundy MD. Hypertriglyceridemia, Insulin resistance and the Metabolic syndrome. *The American Journal of Cardiology* 1999; May 13, 83 (9B)
- Sinitsyna TA, Dokusova OK. Effect of Biotin on retrograde development of experimental atherosclerosis in rabbits. *Cardiologia*. 1970 Feb;10(2):131-4.
- Solorzano-Vargas S, Pacheco-Alvarez D, Leon-Del-Rio A. Holocarboxylase synthetase is an obligate participant in biotin-mediated regulation of its own expression and of biotin-depend carboxylases mRNA levels in human cells. *PNAS* 2002; **99**, 8: 5325-5330.
- Sone H, ItoM, Shimizu M, Sasaki Y, Komai M, Frukawa Y. Characteristics of he biotin enhancement of glucose-induced insulin secretion in pancreatic islets of rat. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000; 64(3): 550-554
- 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** (10): 6393-6396.
- Steigerwal and Bohele. On the influence of biotin upon the intermediated metabolism. In: Internat. Sympos on drusg affecting lipid metab. **1960** June 2-4; Milan, Italy pp 484-486
- Stockert RJ y Morell A. Second messenger modulation of the asialogycoprotein receptor. *J Biol Chem* **1990**; 265 (4): 1841-1846.
- Stockert RJ, Paietta E, Racevskis J, Morell AG. Posttranscriptional regulation of the asialoglycoprotein receptor by cGMP. *J Biol Chem* **1992**; 267 (1): 56-59.
- Stockert RJ, Ren Q. Cytoplasmic protein mRNA interaction mediates cGMP-modulated translational control of the asialoglycoprotein receptor. *J Biol Chem* 1997; **272** (14): 9161-9165.
- Suchy SF, Wolf B. Effect of biotin deficiency and supplementation on lipid metabolism in rats: cholesterol and lipoproteins. *Am J Clin Nutr* **1986**; 43(5):831-838.
- Takasugi Y, Kawata K, Okuda T, Koga Y, Mizuguchi N, Yamanaka S, Watanabe S. Strain differences to effects of aging on concentrations of

amino acids in cerebrospinal fluid between Sprague Dawley rat and Wistar Kyoto rat. *Exp Anim.* **2003** Oct;52(5):429-32

- Tovar Armando, Murguía Fernanda, Cruz Cristino, Hernández-Pando Rogelio, Aguilar-Salinas Carlos, Pedraza-Chaverri José, Correa-Rotter Ricardo and Torres Nimbe. A soy Protein Diet Alters Hepatic Lipid Metabolism Gene Expression and Reduces Serum Lipids and Renal Fibrogenic Cytokines in Rats with Chronic Nephrotic Syndrome. *J.Nutri.* 132: 2562-2569, **2002**.
- Watanabe T, Endo A. Species and strain differences in teratogenic effects of biotin deficiency in rodents. *J Nutr* **1989**; 119(2):255-261.
- Watanabe T, Endo A. Teratogenic effects of maternal biotin deficiency on mouse embryos examined at midgestation. *Teratology* **1990**; 42(3):295-300.
- Watanabe T. Morphological and biochemical effects of excessive amounts of biotin on embryonic development in mice. *Experientia* **1996**; 15; 52(2):149-54.
- Wiedmann S, Rodriguez-Melendez R, Ortega-Cuellar D, Zempleni J. Clusters of biotin-responsive genes in human peripheral blood mononuclear cells. *J Nutr Biochem.* 2004; **15**(7):433-9.
- Yoshikawa H, Tajiri Y, Sako Y, Hashimoto T, Umeda F, Nawata H. Effects of biotin on glucotoxicity of lipotoxicity in rat pancreatic islets. *Metabolism* 2002; **51**(2): 163-168.
- Zempleni J, Helm RM, Mock DM. *In vivo* biotin supplementation at a pharmacologic dose decreases proliferation rates of human peripheral blood mononuclear cells and cytokine release. *J Nutr* 2001; **131**(5):1479-1484