



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA**

ANÁLISIS DE LA FORMA ACTIVA  
DE AMPK EN RESPUESTA A BIOTINA  
GMP<sub>c</sub> Y GLUCAGON EN CULTIVOS  
CELULARES

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**LICENCIADA EN INVESTIGACIÓN  
BIOMÉDICA BÁSICA**

P R E S E N T A

**MARIANA PLIEGO CABALLERO**

DIRECTORA DE TESIS:  
DRA. CRISTINA FERNÁNDEZ MEJÍA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

Facultad de Medicina



MEXICO D.F

NOVIEMBRE 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

*Dedicado a mi abuelo Israel quien hubiera estado muy  
orgulloso de verme concluir esta etapa.  
(1922-2014)*

## **Agradecimientos académicos**

A la Dra. Cristina Fernández, por recibirme en su laboratorio, por sus enseñanzas, su confianza en mí, así como su comprensión y apoyo en mis decisiones académicas.

A quienes también fueron mis tutores de laboratorio, Dra. Carolina Escobar, Dr. Julio César Carrero y Dr. Jan Jacob Schuringa, porque todo lo que aprendí en cada una de mis rotaciones de laboratorio ha influido en mi formación académica.

A la Dra. Carolina Álvarez Delgado, por instruirme para la realización de este proyecto.

Al M. en C. Alain de J. Hernández Vázquez por el apoyo técnico prestado.

A la M. en C. Teresita López Aceves por el apoyo técnico en el aislamiento de hepatocitos.

A la Q.F.B. Clotilde Barrera por su constante ayuda en el laboratorio.

A la Lic. Cynthia Lima Cruz por su paciencia y cordial soporte en los asuntos administrativos.

Al personal de la biblioteca del Instituto de Investigaciones Biomédicas; Lic. Lucía Brito Ocampo, Martha Cariño Aguilar y Ma. Petra Muñoz por su asistencia en la obtención de material bibliográfico.

A los integrantes de mi jurado por las revisiones y comentarios que enriquecieron esta tesis.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas y el Instituto Nacional de Pediatría.

A la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica por proveerme de los mejores profesores, tutores e instalaciones que permitieron mi crecimiento académico.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas y permitirme estudiar en una institución tan prestigiosa.

La realización de este proyecto fue posible gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y la Tecnología (CONACYT), proyecto 219787.

## **Agradecimientos personales**

A mis papás y hermano, porque gracias a ustedes he llegado a esta etapa, porque han sido decisivos en la formación de la persona en la que me he convertido, por apoyarme en todo momento y motivarme a cumplir mis objetivos.

A mis primos, tíos y abuelos, por estar siempre al pendiente de mi vida académica y acompañarme para celebrar mis logros.

A Josué, porque en este último año te has convertido en uno de mis pilares más importantes y tu compañía me ha regalado vivencias inolvidables.

A los amigos que he ganado a lo largo de la carrera así como en cada uno de los laboratorios por los que pasé, especialmente a los del laboratorio 3 de la UGN; Adriana, Caro, Edgar, Ericka, Esme, Herminia, Ile, Lety, Saray y Wilma por sus comentarios y aportaciones para la realización de este proyecto, pero sobre todo por hacer que cada uno de mis días en el laboratorio estuviera lleno de consejos, complicidad y risas.

A Blanca y Pedro, por su amistad incondicional a lo largo de estos años.

A todos mis amigos.

## ÍNDICE

<b>I RESUMEN.....</b>	<b>3</b>
<b>II ABREVIATURAS .....</b>	<b>6</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>8</b>
<b>1.1 Biotina .....</b>	<b>8</b>
1.1.1 <i>Características químicas.....</i>	8
1.1.2 <i>Fuentes de biotina e ingesta recomendada.....</i>	9
1.1.3 <i>Absorción intestinal.....</i>	9
1.1.4 <i>Transporte y almacenamiento en el interior del hígado.....</i>	10
1.1.5 <i>Función biológica.....</i>	10
1.1.6 <i>Efectos de la biotina a concentraciones farmacológicas sobre la expresión génica.....</i>	13
1.1.7 <i>Efectos de la suplementación con biotina sobre el metabolismo.....</i>	14
1.1.7.1 <i>Efectos de la biotina sobre el metabolismo de carbohidratos .....</i>	14
1.1.7.2 <i>Efectos de la biotina sobre el metabolismo de lípidos.....</i>	16
1.1.8 <i>Mecanismos participantes en los efectos de la suplementación con biotina.....</i>	17
1.1.8.1 <i>Biotinilación de histonas .....</i>	17
1.1.8.2 <i>Cascada de señalización por Guanilato Ciclasa / GMPc .....</i>	18
<b>1.2 Proteína dependiente de AMP (AMPK) .....</b>	<b>21</b>
1.2.1 <i>Generalidades de AMPK.....</i>	21
1.2.2 <i>Mecanismos de activación de AMPK.....</i>	23
1.2.3 <i>Efectos de la activación de AMPK .....</i>	24
1.2.3.1 <i>Acciones en el metabolismo de glucosa .....</i>	25
1.2.3.2 <i>Acciones en metabolismo de lípidos.....</i>	25
1.2.3.3 <i>Acciones en otros procesos celulares .....</i>	26
1.2.4 <i>AMPK y el segundo mensajero GMPc .....</i>	27
1.2.5 <i>AMPK y Glucagon.....</i>	28
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>31</b>
<b>3. HIPÓTESIS.....</b>	<b>32</b>
<b>4. OBJETIVO.....</b>	<b>32</b>
<b>5. OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>32</b>
<b>6. METODOLOGÍA.....</b>	<b>33</b>
<b>6.1 Reactivos: .....</b>	<b>33</b>
6.1.1 <i>Aislamiento de hepatocitos de rata .....</i>	33
6.1.2 <i>Cultivo primario de hepatocitos de rata: .....</i>	33

6.1.3 Cultivo celular HepG2: .....	33
6.1.4 Cultivo celular 3T3-L1: .....	33
6.1.5 Extracción y Cuantificación de Proteína: .....	33
6.1.6 Electroforesis .....	33
6.1.7 Western Blot: .....	33
<b>6.2 Aislamiento de hepatocitos de rata .....</b>	<b>34</b>
<b>6.3 Tratamiento del cultivo primario de hepatocitos de rata.....</b>	<b>35</b>
<b>6.4 Cultivo de la línea celular HepG2 .....</b>	<b>35</b>
<b>6.5 Cultivo de la línea celular 3T3-L1 .....</b>	<b>36</b>
<b>6.6 Cosecha de las células tratadas.....</b>	<b>37</b>
<b>6.7 Extracción de proteína.....</b>	<b>37</b>
<b>6.8 SDS-PAGE y Western Blot.....</b>	<b>37</b>
<b>6.9 Análisis densitométrico .....</b>	<b>38</b>
<b>6.10 Análisis estadístico .....</b>	<b>39</b>
<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>40</b>
<b>7.1 Hepatocitos.....</b>	<b>40</b>
7.1.1 Efecto del tratamiento de biotina sobre la abundancia de la forma activa de AMPK en cultivo primario de Hepatocitos .....	40
7.2.1 Establecimiento de la línea celular HepG2.....	40
7.2.1.1 Características de las células HepG2.....	41
7.2.2 Efecto del tratamiento de biotina sobre la abundancia de la forma activa de AMPK en células HepG2 .....	43
7.2.3 Efecto del tratamiento con 8-Bromo GMPc sobre la abundancia de la forma activa de la AMPK en células HepG2 .....	45
7.2.4 Efecto del tratamiento con Glucagon sobre la abundancia de la forma activa de AMPK en células HepG2 .....	46
<b>7.3 Células 3T3-L1 .....</b>	<b>47</b>
7.3.1 Diferenciación de células 3T3-L1 a adipocitos .....	47
7.3.2 Efecto del tratamiento con Glucagon sobre la expresión de la forma activa de la AMPK en células 3T3-L1 .....	51
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>52</b>
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>54</b>
<b>10. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>54</b>
<b>11. REFERENCIAS .....</b>	<b>55</b>

## I RESUMEN

La biotina es una vitamina hidrosoluble que actúa como grupo prostético de carboxilasas, en adición a este papel, su administración a concentraciones farmacológicas modifica la abundancia de diversos RNAm y proteínas, algunos de los cuales participan en el metabolismo de lípidos y carbohidratos.

Se ha propuesto que los efectos de la suplementación con biotina están mediados por la vía de señalización de GMP cíclico/ Proteína Cinasa G (GMPc/PKG), sin embargo se conoce poco acerca del efecto de la biotina sobre las proteínas que se activan en respuesta a esta vía. Un estudio previo de nuestro laboratorio propuso la participación de AMPK en la señalización río abajo de GMPc/PKG en respuesta a la administración de biotina durante ocho semanas en ratones.

Dado que el uso de un modelo *in vivo* presenta dificultades para demostrar si la fosforilación de AMPK en respuesta a la suplementación con biotina es resultado de la acción directa de la vitamina en el hígado y si éste efecto se produce mediante la vía de señalización de GMPc o bien depende de la intervención de otros tejidos para generarla, este proyecto se plantea usar células en cultivo para discernir entre ambas posibilidades.

En el presente proyecto analizamos mediante el uso de cultivos celulares si la activación de AMPK está mediada por la acción directa de la vitamina en hígado.

Hepatocitos aislados de rata, así como células HepG2 fueron incubadas en presencia de biotina o del análogo sintético del GMPc, el 8-Bromo-GMPc, para posteriormente analizar la abundancia de la forma fosforilada de AMPK (p-AMPK<sup>T172</sup>) mediante la metodología de Western Blot. En ambos casos la exposición a los compuestos no resultó en cambio alguno sobre la fosforilación de la proteína. Ante este resultado se procedió a probar si el efecto de la biotina previamente observado en ratones estaba mediado por un mecanismo indirecto en el que pudiera participar el glucagon, ya que en datos recientes de nuestro laboratorio se observó un aumento en las concentraciones séricas de esta hormona. Células HepG2 tratadas con glucagon no mostraron modificaciones en la abundancia de la forma activa de AMPK; sorpresivamente tampoco se observó respuesta en las células

3T3-L1, aún cuando se ha reportado una mayor fosforilación de la proteína ante la estimulación con glucagon en esta línea celular.

Los resultados indican que la activación de AMPK en respuesta a la suplementación con biotina no está mediada por la acción directa de la vitamina en hígado y tampoco a través del segundo mensajero GMPc, por otro lado la participación del glucagon en la señalización por biotina requiere estudios complementarios.

## I ABSTRACT

Biotin is a water-soluble vitamin that acts as a prosthetic group for carboxylases, in addition to this role when administered under pharmacological concentrations modifies the abundance of diverse mRNA's and proteins, some of them involved in glucose and lipid metabolism.

It has been proposed that the mechanism behind the effects of biotin supplementation involves the cyclic GMP / Protein Kinase G (GMPc/PKG) signaling pathway; however, little is known about the effect of biotin upon the proteins that are activated in response to this pathway, a previous study from our laboratory proposed the participation of AMPK in the signaling downstream GMPc/PKG in response to biotin administration in mice.

Given the fact that the use of an *in vivo* model presents some inconveniences to demonstrate if AMPK phosphorylation in response to biotin supplementation is a result of the direct action of the vitamin in the liver and produced through the GMPc signaling pathway or instead it depends on the interaction with other tissues, this project intends to use cells in culture in order to discern between both possibilities.

In the present project we used cell cultures to analyze if the AMPK activation previously observed was mediated through the direct action of this vitamin in the liver.

Rat isolated hepatocytes and HepG2 cells, were incubated with biotin or the synthetic GMPc analogous, 8-Bromo-cGMP in order to analyze the abundance of the phosphorylated form of AMPK (p-AMPK<sup>T172</sup>) through Western Blot technique. In both cases the exposure to the compounds did not show any change on the phosphorylation state of the protein. Based on this result, we proceeded to prove if the effect of biotin previously observed in mice was mediated through an indirect mechanism in which glucagon might be participating since recent data from our laboratory found an increase on the serum concentrations of this hormone. Glucagon exposure to HepG2 cells did not modify the abundance of the active form of AMPK; surprisingly no change was observed in 3T3-L1 cells either, even when a higher level of phosphorylation has been reported in response to the stimulation of this cell line with glucagon.

Our results indicate that AMPK activation in response to biotin supplementation is not mediated through the direct action of the vitamin nor cGMP in the liver, on the other hand glucagon participation in biotin signaling requires further studies.

## II ABREVIATURAS

ACC	Acetil Coenzima A carboxilasa
AICAR	5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido
AKT/ PKB	Proteína cinasa B
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AMPK	Poteína cinasa dependiente de AMP
Cacna1d	Subunidad alfa 1d del canal de calcio tipo L dependiente de voltaje
CAMKK $\beta$	Cinasa $\beta$ de la cinasa dependiente de calcio/calmodulina
ChREBP	Proteína de unión a elementos de respuesta a carbohidratos
COP1	Complejo 1 de proteínas coatoméricas
CPT1	Carnitina-palmitoiltransferasa 1
CRTC	Coactivador de la proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc
eEF2	Factor eucarionte de elongación 2
Foxa2	Forkhead box A 2
GLUT	Transportador de glucosa
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
HCS	Holocarboxilasa sintetasa
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HNF4 $\alpha$	Factor nuclear del hepatocito 4 $\alpha$
IBMX	Isobultimetilxantina
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LKB1	Cinasa Hepática B1
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MCC	$\beta$ -Metilcrotonil Coenzima A carboxilasa
MO25/CB39	Proteína de union a calcio 39
mTORC1	Complejo blanco de la rapamicina en mamífero
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PC	Piruvato carboxilasa
PCC	Propionil Coenzima A carboxilasa
PDX-1	Pancreatic duodenum homeobox 1
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxicinasa
PFK	Fosfofructocinasa
PGC1 $\alpha$	Coactivador del receptor $\gamma$ activado por proliferadores de peroxisomas
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinasa
PKA	Proteína cinasa A
PKG	Proteína cinasa G
PMNC	Células polimorfonucleares
PPAR	Receptor activado por proliferadores de peroxisomas
Raptor	Proteína reguladora asociada a Mtor
SMVT	Transportador multivitamínico dependiente de sodio
SREBP1c	Proteína de unión a elementos reguladores de estero
STAT	Transductor de señales y activador de la transcripción
STRAD	Proteína cinasa adaptadora relacionada a STE20

TAK1	Cinasa activada por TGF $\beta$
TIFIA	Factor de iniciación de la transcripción IA
UTR	Región no traducida
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Biotina

La biotina es una vitamina hidrosoluble del complejo B, también conocida como vitamina H o vitamina B8. Su descubrimiento data de 1927, cuando Margaret Boas <sup>1</sup> encontró un “factor” capaz de revertir la dermatitis y la alopecia presente en animales experimentales alimentados con clara de huevo cruda. Posteriormente se aisló el agente causante del daño, la avidina, que debido a su resistencia a la acción de las proteasas pancreáticas y su fuerte unión con la biotina evita que ésta sea absorbida <sup>2,3</sup>.

Fue ésta la primera demostración de la importancia de la biotina, que sirvió como punto de partida para continuar con su estudio; desde entonces se ha progresado en la comprensión de los aspectos bioquímicos de esta vitamina así como de los procesos fisiológicos en los que participa.

### 1.1.1 Características químicas

La estructura descrita por du Vigneaud en 1942 <sup>4</sup> consiste en un compuesto bicíclico: un anillo Imidazol y un anillo tetrahidrotiofeno con una cadena lateral de ácido valérico (Fig. 1). Existen ocho estereoisómeros de la biotina, sin embargo, el único isómero encontrado en la naturaleza y que es biológicamente activo es la D-biotina <sup>2</sup>.

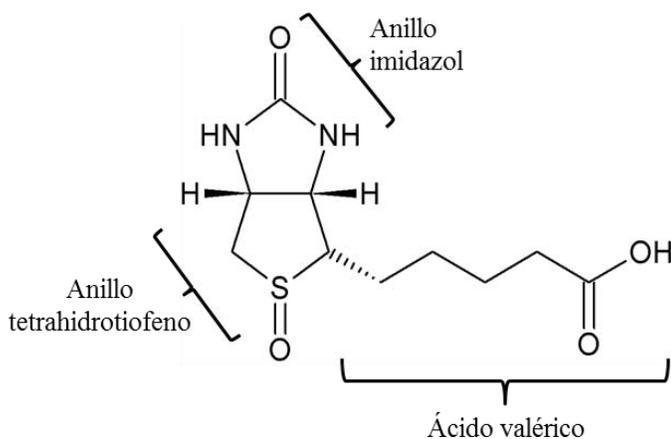


Figura 1. Estructura química de la biotina

### *1.1.2 Fuentes de biotina e ingesta recomendada*

La biotina es un compuesto esencial para los seres vivos, sin embargo los mamíferos no tienen la capacidad de sintetizarla por lo de que dependen de la acción de plantas y microorganismos para su consumo a través de la dieta.

Esta vitamina se encuentra ampliamente distribuida en los alimentos y aunque en la mayoría de ellos se encuentra en pequeñas cantidades, algunos otros como el hígado, riñón, yema de huevo, la leche y algunos vegetales la contienen en cantidades considerables <sup>5</sup>.

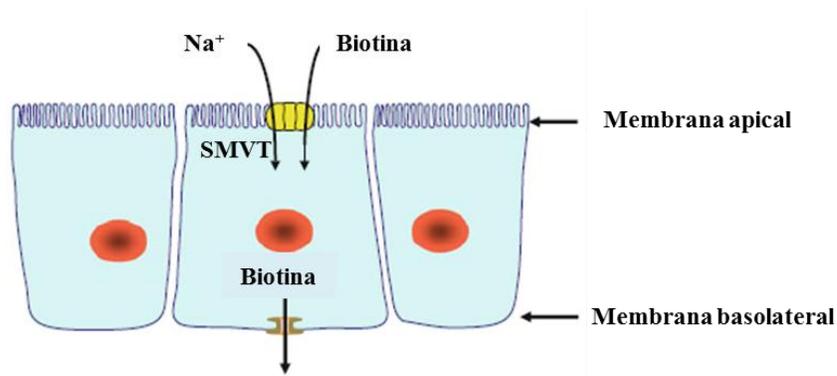
La Comisión de Alimentos y Nutrición del Instituto de Medicina de Estados Unidos<sup>6</sup> estima que la ingesta adecuada de biotina es de 30 µg/día para adultos mayores de 19 años de edad.

Otra potencial fuente de biotina en organismos avanzados es la síntesis que lleva a cabo la flora bacteriana del intestino, sin embargo, su relevancia en los niveles de biotina presentes en el hospedero es imprecisa<sup>7</sup>.

### *1.1.3 Absorción intestinal*

La biotina puede ingerirse en los alimentos ya sea de forma libre o unida a proteínas. Para el caso de la forma unida a proteínas, la acción de proteasas intestinales libera biocitina (biotinil-L-lisina) y péptidos que contienen biotina, éstos son procesados posteriormente por la enzima biotinidasa (EC 3.5.1.12) para generar biotina libre que podrá entonces ser absorbida en el intestino<sup>5</sup>.

La absorción de biotina tiene lugar principalmente en la parte proximal del intestino delgado y se lleva a cabo por dos diferentes mecanismos: transporte facilitado cuando las concentraciones de la vitamina son bajas y difusión pasiva en presencia de altas concentraciones. En el caso del transporte facilitado, está mediado por el transportador multivitamínico dependiente de sodio (SMVT1) que se encuentra en la cara apical de los enterocitos; se trata de un simportador que como su nombre lo indica es dependiente de los gradientes de Na<sup>+</sup> y que además de biotina también acarrea ácido pantoténico y lipoato probablemente debido a que los tres comparten la presencia del ácido valérico. El transporte a través de la membrana basolateral de los enterocitos se lleva a cabo por un mecanismo electrogénico independiente de sodio <sup>3,5</sup> (Fig.2).



**Figura 2. Absorción de biotina a través del intestino.** Modificada de Water Soluble Vitamins, 2012.

#### 1.1.4 Transporte y almacenamiento en el interior del hígado

El hígado, además de ser el tejido mayormente involucrado en el metabolismo y utilización de la biotina, actúa como el órgano de almacenamiento de este factor, sin embargo, las cantidades que almacena son menores comparadas con otras vitaminas<sup>5</sup>. Se sugiere que dicho almacenamiento está mediado por la acetil-coA carboxilasa 2 mitocondrial, sin embargo, esta reserva no parece ser movilizada ante la privación de la vitamina<sup>3</sup>.

*Tanto en hígado humano como en la línea celular HepG2, está reportada la expresión del mensajero y proteína del hSMVT, por lo que se sugiere que este es el principal sistema de transporte que actúa en hepatocitos humanos<sup>5</sup>.*

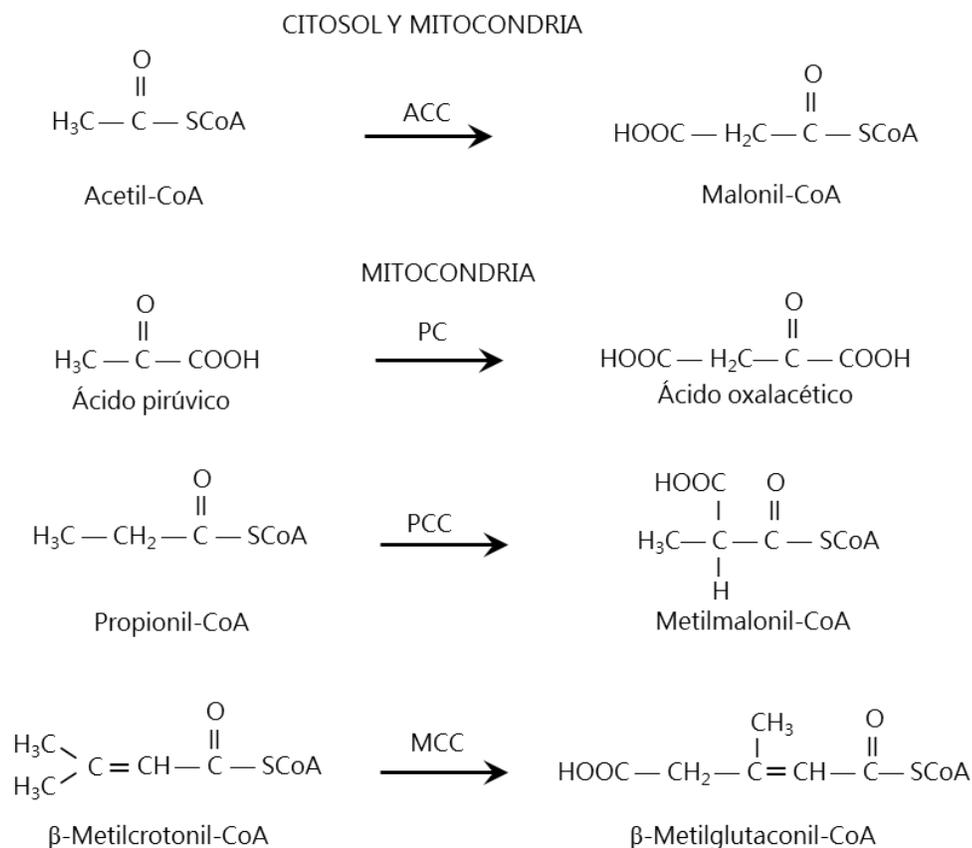
#### 1.1.5 Función biológica

La biotina actúa como coenzima de cinco carboxilasas que participan en procesos del metabolismo de la glucosa, ácidos grasos y aminoácidos: piruvato carboxilasa (PC; EC 6.4.1.1), acetil-coenzima A carboxilasa 1 (ACC1; EC 6.4.1.2), acetil-coenzima A carboxilasa 2 (ACC2; EC 6.4.1.2), propionil-coenzima A carboxilasa (PCC; EC 6.4.1.3) y  $\beta$ -metilcrotonil-coenzima A carboxilasa (MCC; EC 6.4.1.4).

Cada una de las carboxilasas dependientes de biotina catalizan reacciones involucradas en distintos procesos: la PC, una enzima clave involucrada en el proceso de gluconeogénesis, cataliza la conversión de piruvato en oxalacetato mediante el uso de bicarbonato; la ACC1, limitante para llevar a cabo la síntesis de ácidos grasos, incorpora CO<sub>2</sub> a Acetil-CoA generando Malonil-CoA; la ACC2, que cataliza la misma reacción que

su isoforma previamente mencionada, regula el proceso de  $\beta$ -oxidación debido a que su producto inhibe la carnitina palmitoiltransferasa, enzima limitante en el transporte y oxidación de los ácidos grasos en la mitocondria; la PCC, incorpora  $\text{CO}_2$  en la molécula propionil-CoA generando metilmalonil-CoA que posteriormente puede entrar al Ciclo de Krebs mediante su conversión en succinil-CoA; finalmente la MCC cataliza la conversión de 3-metilcrotonil-CoA a 3-metilglutaconil-CoA, un paso esencial en la degradación del aminoácido leucina que resultará en la formación de acetoacetato<sup>3,7,8</sup> (Fig. 3).

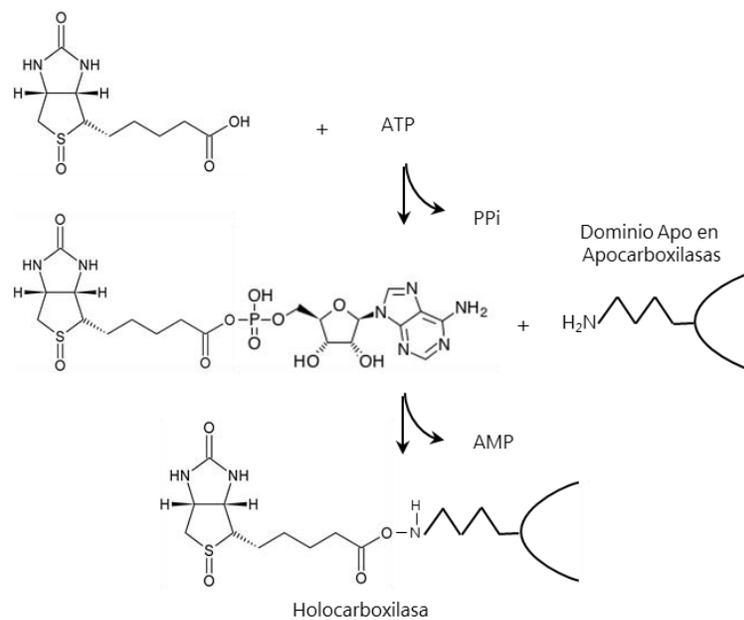
Todas las carboxilasas dependientes de biotina a excepción de la ACC1 que se encuentra en el citoplasma, actúan dentro de la mitocondria<sup>3</sup>.



**Figura 2. Reacciones catalizadas por las carboxilasas dependientes de biotina.** ACC, acetil-CoA carboxilasa; MCC, 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa; PC, piruvato carboxilasa; PCC, propionil-CoA carboxilasa. Modificado de Zemleni *et al.* (2009) Biofactors.

El papel de la biotina como coenzima de carboxilasas consiste en actuar como un brazo flexible que acarrea grupos carboxilo de un sitio activo a otro de los complejos enzimáticos para que sean unidos a los diferentes sustratos <sup>8</sup>.

La unión del grupo prostético a las apocarboxilasas es catalizada por la holocarboxilasa sintetasa (HCS) y la reacción se lleva a cabo en dos pasos: 1) Activación de la vitamina a biotinil-AMP mediante el gasto de ATP y 2) Su unión covalente a la apocarboxilasa por medio de un puente amida a un residuo de lisina con la liberación de AMP <sup>3,5</sup> (Fig.4).



**Figura 3. Unión de la biotina a las carboxilasas.** Reacción catalizada por la Holocarboxilasa Sintetasa (HCS) Modificada de Chapman-Smith (1999) TrendsBiochem Sc.

Una vez que las holocarboxilasas cumplen su vida funcional son degradadas en los lisosomas, entonces se libera la biocitina o péptidos biotinilados que son sustrato de la biotinidasa para obtener biotina libre, ésta posteriormente puede ser reutilizada mediante su reincorporación a otras apocarboxilasas <sup>5</sup>.

### 1.1.6 Efectos de la biotina a concentraciones farmacológicas sobre la expresión génica

Además del papel que tiene la biotina como coenzima, se ha descrito que su administración a dosis farmacológicas en un rango entre 1-19 mg, es capaz de modificar la expresión de genes a nivel transcripcional y postranscripcional.

Las primeras evidencias de los cambios que la suplementación con biotina puede generar sobre la expresión genética fueron reportadas por el grupo de Dakshinamurti, quienes demostraron que la administración de altas concentraciones biotina (1 mg/Kg de peso) en ratas tanto deficientes como suficientes de biotina causaban un incremento del doble en la síntesis y actividad de la enzima glucocinasa<sup>9</sup>, dicho efecto fue confirmado por Spence y Kudelka<sup>10</sup> que observaron un incremento en los niveles protéicos (2.2 veces) y actividad de la enzima (4 veces) en un cultivo primario de hepatocitos tratados con 1  $\mu$ M de biotina. Subsecuentemente Dakshinamurti reportó que la causa de los efectos observados estaban dados por un incremento en la transcripción del RNAm de la glucocinasa (3.9 veces)<sup>11</sup>.

Estudios posteriores demostraron cambios en la expresión de un gran número de genes en respuesta a la presencia de altas concentraciones de biotina, Wiedmann *et al.* realizaron un estudio de microarreglos con muestras de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) provenientes de pacientes que ingirieron altas concentraciones de biotina (8.8  $\mu$ M/día) por un periodo de 21 días; en respuesta al tratamiento observaron un cambio en la expresión de 270 genes, de los cuales 139 se encontraban incrementados y 131 disminuidos<sup>12</sup>. En concordancia, un estudio que empleó la línea celular HepG2 demostró que la adición de concentraciones farmacológicas de biotina (10 nM) causaba un incremento en la expresión de 243 genes así como un decremento de 861, algunos de los cuales se identificaron como productos con capacidad de unir DNA, RNA o que participaban en el proceso de traducción. De manera interesante, este estudio demostró que los cambios en la expresión de genes difiere en respuesta a la deficiencia y la suplementación con biotina<sup>13</sup>.

Los cambios sobre la expresión genética en respuesta a las concentraciones farmacológicas de biotina se han observado no solamente a nivel transcripcional sino también post-transcripcional; desde 1970 el grupo de Dakshinamurti atribuyó los cambios en la abundancia protéica de la enzima glucocinasa a un incremento general tanto de la síntesis de RNAm como de proteínas en respuesta a la administración de la vitamina (1

mg/Kg de peso). Estudios posteriores realizados con la línea celular HepG2 demostraron una expresión del receptor de asialoglicoproteínas<sup>14</sup> así como de otras 44 proteínas con diversas funciones<sup>15</sup>, dependiente de la presencia de biotina (10 nM) y mediada por un mecanismo post-transcripcional puesto que los niveles de los RNAm se mantenían constantes sin importar la presencia o ausencia de la vitamina.

Debido a que metabolitos sintéticos de la biotina como la diaminobiotina y destiobiotina, son capaces de modificar la expresión de algunos genes sin cambiar la actividad de las carboxilasas, se propone que los efectos de la vitamina sobre la expresión genética son independientes de su papel como coenzima de carboxilasas<sup>16</sup>.

### *1.1.7 Efectos de la suplementación con biotina sobre el metabolismo*

#### *1.1.7.1 Efectos de la biotina sobre el metabolismo de carbohidratos*

Existe un gran número de estudios que describen efectos sobre el metabolismo de carbohidratos ante la administración de biotina a concentraciones farmacológicas ( $\geq 1$ mg/Kg de peso en modelos murinos y 0.01-1  $\mu$ M en modelos *in vitro*). Como fue mencionado previamente varios autores reportan un incremento en la abundancia del mensajero, la proteína y actividad de las glucocinasas hepática y pancreática tanto en modelos murinos como en células en cultivo<sup>9-11,17-21</sup>. Otras proteínas cuya actividad se ve incrementada en respuesta a la biotina son la piruvato cinasa (33%) y la fosfofructocinasa (44%)<sup>20</sup>, ambas enzimas glicolíticas; mientras que para proteínas gluconeogénicas como la fosfoenolpiruvato carboxicinasas (60%)<sup>17,22</sup> y la Glucosa 6-fosfatasa (50%)<sup>17</sup>, así como para el factor transcripcional, proteína de unión al elemento regulador de esteroides (SREBP1c) (60%) y su coactivador PGC1 $\alpha$  (60%)<sup>17</sup> se reporta el efecto contrario pues se observa una disminución en la actividad y/o abundancia de su mensajero en modelos de ratas diabéticas.

La suplementación con biotina no solo actúa modificando la abundancia de RNAm y proteínas, ya que sus efectos también han sido observados a nivel fisiológico en procesos relacionados con la homeostasis de la glucosa. En un estudio realizado por Coggeshall se observó una reducción en los niveles de glucosa (60%) en suero de pacientes diabéticos que recibieron 16 mg de biotina por día durante una semana<sup>23</sup>. Posteriormente, Maebashi reportó niveles plasmáticos de biotina 40% menores en pacientes diabéticos, además de

una mejora en la respuesta al tratamiento con glibenclamida si se administraba en combinación con biotina (9 mg/día por un mes)<sup>24</sup>.

Efectos similares se observan en modelos murinos; en ratas con diabetes inducida por estreptozotocina, la administración intraperitoneal de biotina (100 µg/día) por 15 días resultó en una mejor tolerancia a la glucosa<sup>18</sup>. En la cepa de ratas Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty Rats (OLETF), una cepa de ratas espontáneamente hiperglicémicas, la suplementación de biotina en la dieta (7.44 mg/kg de alimento) resultó en un mejor comportamiento en la prueba de tolerancia a la glucosa, así como en una disminución en la hiperinsulinemia (50%)<sup>25</sup>. De manera similar, en ratones KK genéticamente diabéticos, la administración de biotina (2-4 mg/kg de peso) por 10 semanas resultó en una mejor tolerancia a la glucosa así como una mayor sensibilidad a la insulina.<sup>26</sup>

Algunos grupos de investigación<sup>19,27,28</sup> atribuyen la mejora en la tolerancia a la glucosa como consecuencia de la suplementación con biotina a un incremento en la secreción de insulina en modelos *in vitro*; la incubación de cultivos primarios de islotes pancreáticos en medio con biotina 1 µM por 24h resultó en un incremento en la secreción de insulina (53%) así como en la abundancia de su mensajero (42%)<sup>19</sup>. De la misma manera, páncreas<sup>27</sup> e islotes<sup>28</sup> aislados de ratas expuestos a una concentración 0.1 y 1 mM de biotina mostraron un incremento en la secreción de insulina (80% y 50% respectivamente) en respuesta a la perfusión con glucosa.

Resultados de nuestro laboratorio demuestran que islotes pancreáticos aislados de rata aumentan su secreción de insulina (2.5 veces) en respuesta a la exposición de biotina (1 µM por 1h) y que este efecto a su vez es responsable del incremento en la transcripción del RNAm de la glucocinasa mediante una señalización autócrina<sup>21</sup>. También en nuestro laboratorio, se mostró que la administración de una dieta suplementada con biotina por 8 semanas a ratones Balb/c resultaba en un incremento en la secreción de insulina (36%) en respuesta a glucosa, efecto que hasta entonces había sido observado únicamente en modelos *in vitro*. Otros efectos observados en estos ratones fueron el incremento en la abundancia de los mensajeros del canal de calcio *Cacna1d* (2.4 veces), así como los factores transcripcionales *Foxa2* (1.6 veces), *PDX-1* (1.8 veces) y *HNF4α* (1.4 veces), todas estas proteínas que participan en la cascada de síntesis y/o secreción de insulina. De manera inesperada, los ratones alimentados con la dieta suplementada con biotina mostraron un incremento (74%) en la masa de los islotes pancreáticos así como cambios en su estructura, efecto que sugiere ser el resultado de un decremento en la abundancia

del mensajero de Ncam (27%), una proteína de adhesión importante en la arquitectura de los islotes<sup>29</sup>.

#### 1.1.7.2 Efectos de la biotina sobre el metabolismo de lípidos

Diversos estudios reportan que la suplementación con biotina reduce los niveles elevados de lípidos en sangre, hiperlipemia, tanto en modelos murinos como en humanos<sup>30-36</sup>.

Un estudio de nuestro grupo de laboratorio realizado en pacientes con Diabetes tipo 2, así como sujetos no diabéticos con hipertrigliceridemia que recibieron 61.4  $\mu$ M de biotina por 28 días, mostró una disminución en la concentración de triglicéridos (50 % y 90% para ambos grupos) así como de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (11% y 18%) en plasma<sup>30</sup>. La administración de un fármaco comercial que contiene una combinación de picolinato de cromo (600  $\mu$ g) y biotina (2 mg) por 4 semanas a pacientes obesos o con sobrepeso redujo sus niveles de colesterol total (20%) en plasma así como su proporción de lipoproteínas de baja densidad comparadas con las de alta densidad (LDL/HDL)<sup>31</sup>. Pacientes con diabetes tipo 2 e hipercolesterolemia que recibieron el mismo tratamiento previamente mencionado, presentaron una disminución en los niveles de colesterol total (70%), así como de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (62%)<sup>32</sup>. En pacientes con diabetes tipo 1 que se encontraban bajo tratamiento con insulina, la administración conjunta de biotina (40 $\mu$ g/kg de peso por día) durante 3 meses disminuyó las concentraciones plasmáticas de triglicéridos, colesterol total y VLDL comparado con un grupo que recibió insulina con placebo<sup>33</sup>.

Efectos similares se observan en estudios realizados con modelos murinos; ratas Sprague-Dawley que recibieron 2 mg de biotina durante 14 semanas, mostraron una disminución en los niveles de VLDL en suero (20%)<sup>34</sup>.

En nuestro laboratorio, la administración diaria de 13.5 mg de biotina/Kg de peso corporal en la dieta de ratones Balb/c resultó en la disminución en las concentraciones sanguíneas de triglicéridos de alrededor del 35%<sup>35</sup>. Además, con el propósito de comprender los mecanismos relacionados con el efecto observado, se analizó la expresión de genes involucrados en el metabolismo de lípidos. En hígado se encontró una reducción en la abundancia del RNAm de la enzima glucolítica fosfofructocinasa (70%), así como del factor transcripcional lipogénico SREBP1c (40%) y las proteínas reguladas por éste: el

transportador de glucosa GLUT2 (64%), la acetil-CoA carboxilasa (35%), la sintasa de ácidos grasos (30%) y la piruvato cinasa (40%). De igual manera en el tejido adiposo se redujo la transcripción de los mensajeros de SREBP1C(45%), acetil-CoA carboxilasa 1 (70%), sintasa de ácidos grasos (50%) y fosfofructocinasa (40%), así como el de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (30%) y la esteroil coenzima A desaturasa (50%), ambas involucradas en la síntesis de lípidos; la abundancia del RNAm del factor transcripcional PPAR- $\gamma$ , que participa en el proceso de diferenciación del tejido adiposo también sufrió un decremento (35%). Por otro lado estos efectos fueron reflejados en una disminución en el peso del tejido adiposo (15%).

En concordancia, otro estudio más reciente de nuestro grupo realizado en ratones que recibieron la misma dieta, mostró una reducción de alrededor del 40% en las concentraciones de triglicéridos no sólo en plasma sino también en hígado. Además se observó un decremento en la abundancia protéica de SREBP1c (40%) y la ácido graso sintasa (70%) así como un aumento en la forma inactiva de la enzima acetil-CoA carboxilasa-1 (2.24 veces)<sup>36</sup>. Estos resultados indican que la administración de biotina a dosis farmacológicas resulta en una disminución de los lípidos sanguíneos asociado con una disminución en la abundancia de proteínas lipogénicas a nivel transcripcional, traduccional así como post-traduccional.

#### *1.1.8 Mecanismos participantes en los efectos de la suplementación con biotina*

Aun cuando existen numerosos reportes que demuestran los efectos de la biotina a concentraciones farmacológicas, su mecanismo de acción continúa sin ser elucidado, sin embargo, entre las propuestas que lo explican se encuentran dos principales vertientes; la biotinilación de histonas y la cascada de señalización por guanilato ciclasa / GMPc.

##### *1.1.8.1 Biotinilación de histonas*

Hacia 1980 surgieron reportes que demostraban la presencia de proteínas biotiniladas diferentes a las carboxilasas, así como la detección de material biotinilado en el núcleo, sin embargo, estos hallazgos fueron considerados productos de degradación así como uniones no específicas<sup>37</sup>, fue hasta 1995 cuando Hymes *et al.* propusieron que la biotina podía unirse a las histonas probablemente en residuos de lisina por acción de la biotinidasa<sup>38</sup>.

A pesar de que estudios posteriores reportaron observaciones de la biotilación de histonas en diferentes modelos, su repercusión en este proceso no es clara pues se han propuesto distintos efectos que esta modificación epigenética podría tener<sup>39,40</sup>. En células polimorfonucleares de humano (PMNC), se encontró un incremento en la biotilación de histonas en respuesta a la proliferación celular<sup>41</sup> y en eritrocitos de pollo se asoció la presencia de histonas altamente biotiladas con cromatina transcripcionalmente inactiva<sup>42</sup>, por otro lado en células Jurkat se describió un incremento en la biotilación de histonas en respuesta a la exposición a luz UV<sup>42</sup>.

Recientemente dos estudios independientes atribuyen las observaciones sobre la detección de histonas biotiladas a artefactos metodológicos<sup>43</sup>, así como sugieren que esta no es una modificación natural<sup>44</sup>, por lo que su papel en este proceso se ha puesto en duda.

#### 1.1.8.2 Cascada de señalización por Guanilato Ciclasa / GMPc

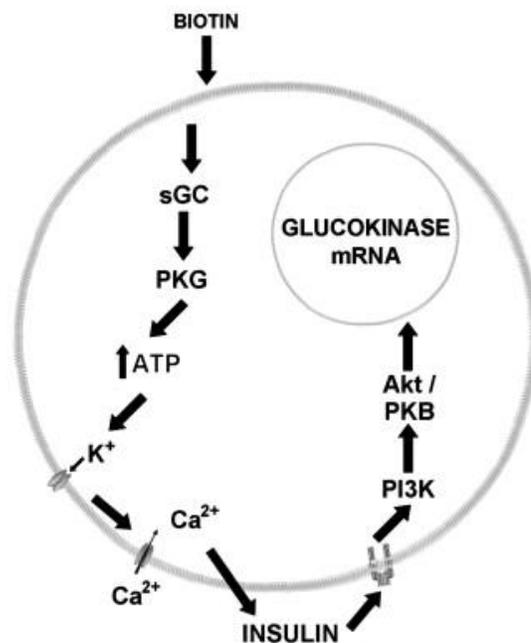
El primer reporte que sugiere la participación de la vía de GMP cíclico (GMPc) en los efectos generados por la suplementación de biotina fue escrito por Vesely en 1983, quien demostró un incremento en los niveles de GMPc en distintos tejidos de rata en respuesta a la administración de biotina 1  $\mu$ M; además, observó que dicho incremento estaba dado por la estimulación de la actividad de la guanilato ciclasa<sup>45</sup>.

Estudios posteriores demostraron que algunos de los efectos observados ante la suplementación con biotina, tales como el incremento en la actividad de la glucocinasa hepática<sup>10</sup>, la abundancia del RNAm de la glucocinasa pancreática<sup>21</sup>, la síntesis protéica del receptor de asialoglicoproteínas y el receptor de insulina<sup>46</sup>; el RNAm de la holocarboxilasa sintetasa, acetil-CoA carboxilasa-1 y PCC<sup>47</sup>, así como la disminución de la presión sanguínea observada en un modelo de hipertensión en ratas; estaban precedidos por un incremento en los niveles del mensajero GMPc y/o la activación de la proteína cinasa G (PKG). Además se observó que algunos de los efectos causados por la acción de la vitamina eran imitados ante la presencia del análogo 8-Bromo GMPc<sup>10,21</sup>.

De manera interesante un estudio de nuestro laboratorio realizado en islotes pancreáticos aislados de rata, probó que no solamente la inhibición de la guanilato ciclasa o la PKG suprimía la acción de la biotina sobre la transcripción de la glucocinasa, sino que este

efecto también se veía reprimido cuando se bloqueaba la señalización de la vía de la insulina. Además, la adición de biotina 1  $\mu\text{M}$  por 30 min al medio de cultivo de los islotes, resultaba en un incremento en los niveles de ATP dependiente de la activación de PKG.

Estos resultados dieron pie a que se propusiera el siguiente mecanismo: concentraciones farmacológicas de biotina resultan en la activación de la guanilato ciclasa y la subsecuente elevación de los niveles de GMPc que activan a la PKG, esto lleva a un incremento en los niveles de ATP que inducen la apertura de los canales de potasio promoviendo la secreción de insulina que de manera autócrina activa la señalización por PI3K/AKT, lo cual finalmente resulta en un incremento en la transcripción del mensajero de la glucocinasa<sup>21</sup> (Fig. 5).



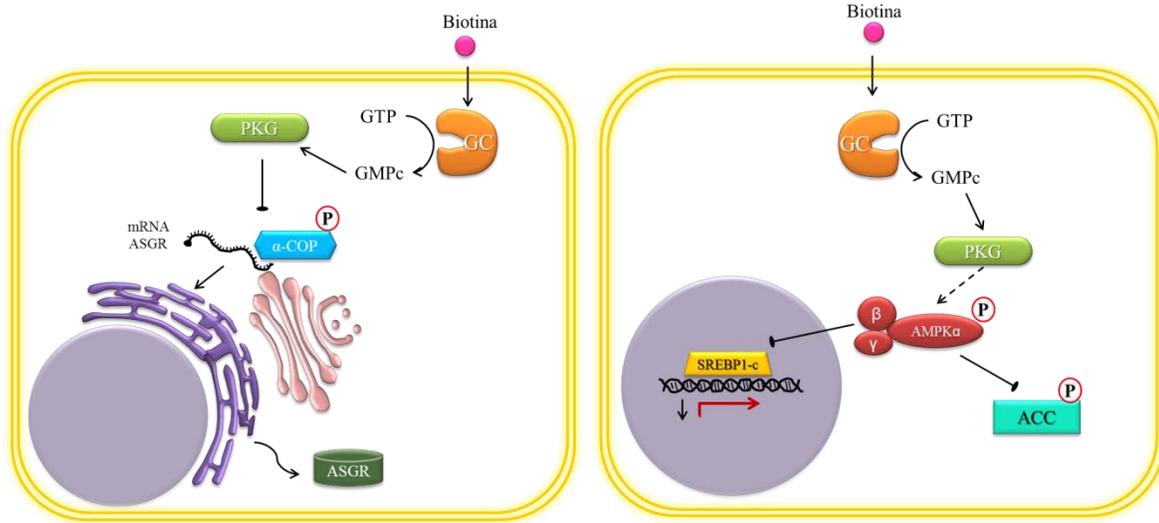
**Figura 4. Mecanismo propuesto para la vía involucrada en la expresión pancreática de la glucocinasa inducida por concentraciones farmacológicas de biotina.** Tomada de Vilches et.al. 2010

Los reportes citados sugieren que la administración de dosis farmacológicas de biotina promueven la activación de la guanilato ciclasa, aumentando la síntesis del segundo mensajero GMPc, que a su vez activa la proteína PKG, la cual podría estar generando de manera directa o indirecta los efectos mencionados. Sin embargo los mecanismos

involucrados río abajo de la activación de la guanilato ciclasa en tejidos distintos al páncreas continúan siendo desconocidos.

Pocos son los estudios que se han dedicado a elucidar los mecanismos que se encuentran río abajo de la activación cGMP/PKG: De la Vega y Stockert <sup>46</sup> reportaron que en respuesta a la deficiencia con biotina, la línea celular HuH-7 muestra una disminución en la abundancia protéica del receptor de insulina y de asialoglicoproteínas, este efecto se revierte en presencia de biotina ( $1 \times 10^{-6}$  M) u 8-Bromo GMPc (1 mM) y es dependiente de la activación de PKG. Ensayos de retardo de movilidad demostraron la interacción de una proteína con la region no traducida (UTR) del RNAm del receptor de asialoglicoproteínas, dicha proteína fue identificada como la proteína de cubierta  $\alpha$ -COP, que forma parte del complejo COP1. Se propone que la fosforilación de  $\alpha$ -COP en respuesta a la activación de PKG por inducción de la biotina previene la unión de la primera con el UTR del mensajero del receptor de asialoglicoproteínas, permitiendo con ello que pueda ser traducido (Fig. 6 Izq).

En nuestro laboratorio se identificó a la proteína dependiente de AMP (AMPK) como una proteína efectora en la señalización por la suplementación con biotina: ratones Balb/c que recibieron una dieta suplementada con biotina por 8 semanas, mostraron un decremento en la concentración de triglicéridos hepáticos y plasmáticos, posteriormente con el propósito de elucidar las vías de señalización involucradas en dicho efecto, se encontró un incremento en los niveles de GMPc (40%), así como en la forma activa de AMPK (80%), que a su vez promueve la fosforilación de la acetil-CoA carboxilasa-1 y la abundancia de la forma madura de SREBP1c por lo cual disminuye la transcripción de la ácido graso sintasa <sup>36</sup> (Fig.6 Der). Posteriormente en otro estudio de nuestro laboratorio realizado en tejido adiposo, también se observó un incremento en la inactivación de acetil-CoA carboxilasa-1 del doble del control, asociada a una mayor abundancia protéica de la forma activa de AMPK (70%), así como una elevación en las concentraciones de GMPc (40%), reiterando con ello la posible participación de estos mediadores en los efectos hipolipémicos de la biotina<sup>48</sup>.



**Figura 5. Mecanismos propuestos para la señalización de la biotina a través de la activación de la guanilato ciclasa.** Izquierda, modelo propuesto por De la Vega y Stockert (1999) que involucra la participación de  $\alpha$ -COP. Derecha, modelo propuesto por Aguilera-Méndez (2010) que sugiere la participación de AMPK. GC, guanilato ciclasa; PKG, proteína cinasa dependiente de GMPc;  $\alpha$ -COP, proteína de cubierta; ASGR, Receptor de asialoglicoproteínas; ACC, acetil-coenzimaA carboxilasa; SREBP1c, proteína de unión al elemento regulador de esteroides.

## 1.2 Proteína dependiente de AMP (AMPK)

La AMPK es una enzima altamente conservada entre organismos eucariontes y se expresa de manera ubicua en los mamíferos donde actúa como un sensor de energía en la mayoría de los órganos y tejidos incluidos el hígado, músculo, corazón, hipotálamo y tejido adiposo, inhibiendo vías anabólicas y activando vías catabólicas en respuesta a la baja disponibilidad de fuentes de energía. AMPK actúa en primer instancia modificando directamente la actividad de diversas enzimas involucradas en el metabolismo de lípidos y carbohidratos y posteriormente a largo plazo participa en el control transcripcional de proteínas clave en estas vías <sup>49</sup>.

### 1.2.1 Generalidades de AMPK

AMPK es un complejo heterotrimérico que consiste en una subunidad catalítica  $\alpha$  y dos subunidades reguladoras  $\beta$  y  $\gamma$ . En mamíferos las tres subunidades tienen isoformas ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ;  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ;  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$ ) codificadas por distintos genes y las diferentes combinaciones se expresan de manera tejido específica <sup>50</sup>. Los complejos que contienen las subunidades  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ , contribuyen cada una a la mitad de la actividad total de AMPK en hígado de

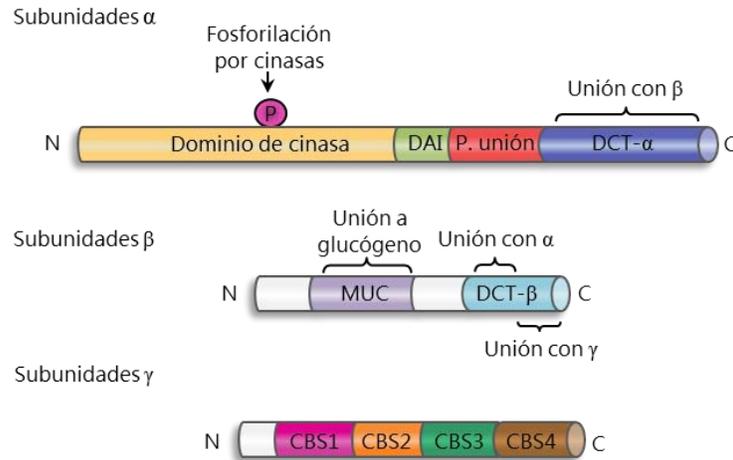
roedores, sin embargo, en el hígado humano la mayoría de los complejos contienen la subunidad  $\alpha 1$ , las subunidades  $\beta 1$  y  $\gamma 1$  predominan en el hígado de roedores <sup>49</sup>.

Se sugiere que la distribución intracelular de los complejos de AMPK puede ser regulada mediante las variaciones en las isoformas de la subunidad  $\alpha$ , los complejos AMPK $\alpha 1$  se pueden localizar en el citoplasma o la membrana plasmática, mientras que la presencia de la subunidad  $\alpha 2$  puede dar la localización tanto en citoplasma como en núcleo, promoviendo la posibilidad de una regulación transcripcional directa. Los cambios en la localización de la subunidad  $\alpha$  parece depender de una regulación dada por su interacción con la subunidad  $\beta$  <sup>49,51</sup>.

La estructura de las subunidades  $\alpha$  se caracterizan por la presencia de un residuo de Treonina o Serina en el grupo amino terminal, que se encuentra en el “bucle de activación” de la enzima. Usualmente este residuo se conoce como Thr-172 debido a su posición en la secuencia original de rata, sin embargo, la numeración exacta del residuo puede variar dependiendo la especie. Justo después del dominio de cinasa en la subunidad  $\alpha$ , se encuentra un dominio autoinhibitorio y posteriormente una región conocida como péptido de unión que como su nombre lo indica, conecta el dominio autoinhibitorio con la región de carboxilo terminal, la cuál interactúa con esta misma región de la subunidad  $\beta$ , por lo que su importancia radica en la completa formación del complejo enzimático <sup>52</sup>.

La subunidad  $\beta$  contiene un módulo de unión a carbohidratos que permite que la AMPK se asocie con partículas de glucógeno, lo cual probablemente sirva para colocalizar a la enzima con blancos que interactúen con la molécula de glucógeno. El dominio C- terminal de la subunidad  $\beta$  interactúa con ambas subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  formando el cuerpo del complejo <sup>51</sup>.

Finalmente, la subunidad  $\gamma$  contiene 4 regiones repetitivas conocidas como repeticiones de cistationina  $\beta$  sintasa (CBS), se propone que tres de los cuatro sitios repetitivos unen nucleótidos; el sitio 2 se encuentra vacío mientras que el sitio 4 contiene un AMP que parece no ser intercambiable. Los sitios 1 y 3 unen AMP, ADP y ATP de manera reversible y competitiva <sup>50,52</sup>.



**Figura 6. Mapa de los dominios de las subunidades de AMPK.** El DCT-β constituye el cuerpo del complejo que se une a la subunidad α en el DCT-α y a la subunidad β en la región del amino terminal previa al CBS1. N, amino terminal; C, carboxilo terminal; DAI, dominio de autoinhibición; P. unión, péptido de unión; DCT-α, dominio de carboxilo terminal de la subunidad α; MUC, módulo de unión a carbohidratos; DCT-β, dominio de carboxilo terminal de la subunidad β; CBS, Repeticiones CBS. Modificada de Hardie (2012) NatureReviews.

### 1.2.2 Mecanismos de activación de AMPK

AMPK puede ser activada en respuesta a diferentes estímulos los cuales generalmente afectan el balance energético de la célula, esto puede deberse tanto a eventos normales tales como el incremento en el consumo de energía (p.ej por activación de vías biosintéticas o por ejercicio) o en respuesta a estrés como la deprivación de fuentes energéticas, hipoxia, así como la exposición a agentes que inhiban la síntesis de ATP. Una vez que las concentraciones de ATP se reducen en la célula, esto se ve reflejado en un aumento en las concentraciones de ADP, que a su vez llevan a un incremento en los niveles de AMP debido a la acción de la cinasa de adenilato ( $2 \text{ ADP} \leftrightarrow \text{ATP} + \text{AMP}$ ), que resulta finalmente en un aumento en la proporción AMP:ATP promoviendo la activación de AMPK<sup>53</sup>.

La actividad catalítica de AMPK es regulada por un mecanismo alostérico que involucra la unión de AMP y ADP en los dominios CBS de la subunidad γ, así como por la fosforilación del residuo de Thr172 en el dominio catalítico de la subunidad α. Tres cinasas responsables de la fosforilación activadora han sido identificadas: la cinasa hepática B1 (LKB1), la cinasa β de la cinasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ / calmodulina (CaMKKβ)

y probablemente la cinasa activada por TGF $\beta$  (TAK1), miembro de la familia de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) <sup>49</sup>.

La cinasa LKB1 que forma un complejo con STRAD y MO25 parece ser constitutivamente activa, por lo que la regulación de su acción sobre la Thr172 de AMPK está mas bien dada por la unión de AMP a esta última. CAMKK $\beta$  por otro lado tiene niveles basales de actividad muy bajos y sólo fosforila a AMPK en respuesta a un incremento en el calcio intracelular <sup>50</sup>.

La activación alostérica de AMPK mediada por su interacción con AMP, resulta en un incremento de 2-10 veces en la actividad catalítica de esta enzima, mientras que la fosforilación de la Thr172 genera un aumento de 100 veces, sin embargo, es la combinación de ambos mecanismos lo que provoca un incremento 1000 veces mayor en la actividad enzimática <sup>49,53</sup>.

La unión de AMP a la AMPK aumenta su actividad catalítica por tres diferentes mecanismos: la activa directamente por un mecanismo alostérico, promueve la fosforilación de la Thr172 por LKB1 probablemente mediante la formación de un complejo entre ambas enzimas y la protege de la acción de fosfatasas mediante la generación de un cambio conformacional <sup>54</sup>.

Además de responder al estrés metabólico, AMPK puede ser activada por algunos fármacos y xenobióticos tales como el 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido (AICAR), los medicamentos para diabetes (metformina, fenformina y las tiazolidinedionas), así como sustancias naturales como el resveratrol, la capsaicina y la curcumina. En adición, AMPK también puede ser modulada por la acción de ciertas hormonas como la adiponectina y la grelina que incrementan el apetito, promueven la ingesta de alimento y activan a AMPK en el hipotálamo; mientras que la leptina que actúa como señal de saciedad inhibe a la enzima <sup>54</sup>.

### *1.2.3 Efectos de la activación de AMPK*

Como fue previamente mencionado, en general, las acciones de AMPK tienen como objetivo prender vías catabólicas que generen ATP y apagar vías anabólicas que consuman energía, a continuación se listan los efectos de AMPK en el metabolismo (Fig. 8).

#### 1.2.3.1 Acciones en el metabolismo de glucosa

- En el músculo, durante su contracción, AMPK promueve la translocación de los transportadores de glucosa GLUT4 mediante la activación de proteínas G que promueven la fusión de vesículas intracelulares que contienen el transportador con la membrana plasmática <sup>55</sup>. En tejidos que expresan GLUT1, AMPK también promueve la captura de glucosa a través de la activación de los transportadores que de manera basal se encuentran localizados en la membrana <sup>56</sup>.
- AMPK inhibe la síntesis de glucógeno en músculo <sup>57</sup> e hígado <sup>58</sup> al inactivar la glucógeno sintasa-1 y -2 respectivamente, mediante la fosforilación de la Serina 7, del dominio N- terminal.
- AMPK promueve la glucólisis en cardiomiocitos mediante la activación de la enzima 6-fosfofructocinasa-2 <sup>59</sup>.
- En el hígado, fosforila al coactivador de la proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc (CREB), CRTC reteniéndolo en el citoplasma y con ello impide que se transcriban genes de la gluconeogénesis como la fosfoenolpiruvato carboxilasa y la glucosa-6-fosfatasa <sup>60</sup>.
- La proteína de unión a elementos de respuesta a carbohidratos (ChREBP) que regula la expresión de genes lipogénicos es fosforilada por AMPK disminuyendo su actividad de unión al DNA y con ello su capacidad de incrementar la expresión de la piruvato cinasa en respuesta a glucosa <sup>61</sup>.

#### 1.2.3.2 Acciones en metabolismo de lípidos

- AMPK promueve el transporte de ácidos grasos al interior de los cardiomiocitos a través de la translocación de vesículas que contienen el transportador de ácidos grasos CD36 <sup>62</sup>.
- La proteína acetil CoA carboxilasa también es modificada por AMPK, tanto la isoforma ACC1 que participa en la síntesis de ácidos grasos, como ACC2 que regula la entrada de estos a la mitocondria a través del sistema carnitina-palmitoiltransferasa 1 (CPT1), son fosforiladas e inactivadas. En ambos casos el resultado es una disminución en el producto de reacción, malonil-coA y con ello una inhibición en la síntesis de ácidos grasos y un incremento en su oxidación <sup>63</sup>.
- La síntesis de ácidos grasos también se ve disminuida a causa de un decremento en la transcripción de la sintasa de ácidos grasos, debido a que el factor que regula su transcripción en respuesta a glucosa, SREBP1c es modificado por

AMPK al fosforilarlo e inhibir su procesamiento postraduccional así como su translocación al núcleo <sup>64</sup>

- En hepatocitos, la síntesis de triglicéridos y fosfolípidos se ve reducida ante la activación de AMPK debido a la inhibición por fosforilación de la glicerol fosfato acil transferasa <sup>65</sup>.
- En adipocitos humanos y murinos, AMPK inhibe la lipólisis al fosforilar e impedir la translocación de la lipasa sensible a hormona hacia las gotas lipídicas <sup>66</sup>. Este efecto resulta interesante ya que la lipólisis es una vía catabólica y como tal se esperaría que fuera activada por AMPK, sin embargo, se propone que tiene la acción opuesta con el objetivo de evitar la liberación excesiva de ácidos grasos que desencadenaría su re-esterificación en triglicéridos y con ello un gasto energético <sup>50</sup>.
- La síntesis de colesterol y otros isoprenoides es inhibida por AMPK al fosforilar la enzima limitante de la vía de mevalonato, la hidroximetilglutaril-CoA reductasa (HMGR) <sup>67</sup>.

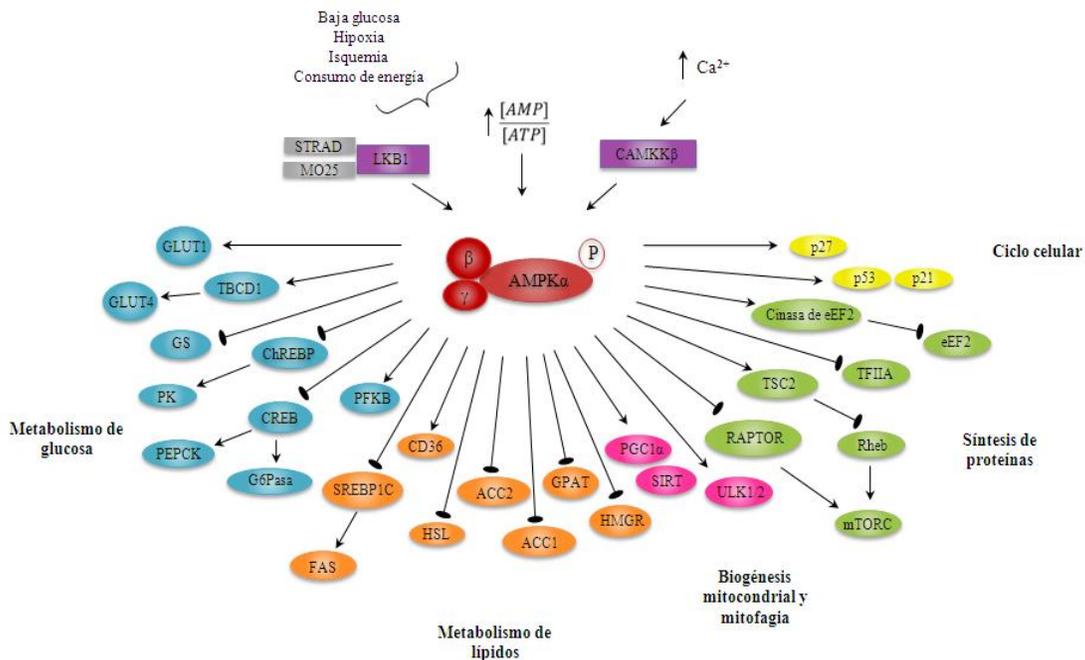
### 1.2.3.3 Acciones en otros procesos celulares

Además de los efectos sobre el metabolismo, AMPK actúa sobre diferentes procesos celulares, siendo los más conocidos los siguientes:

- Síntesis de proteínas: AMPK inhibe la síntesis de proteínas en diferentes maneras; promueve la inhibición del factor eucarionte de elongación 2 (eEF2) a través de la fosforilación y activación de la cinasa que actúa sobre este (eEF-2-cinasa) <sup>68</sup>; fosforila al factor de iniciación de la transcripción IA (TIFIA) que se asocia a la RNA polimerasa 1 responsable de la síntesis del RNA ribosomal, de modo que evita la formación de los complejos de iniciación de la transcripción <sup>69</sup>; finalmente, también inhibe el complejo blanco de la rapamicina en mamífero (mTORC1) a través de la fosforilación y activación de la tuberina que a su vez inactiva a Rheb (una proteína G que activa a mTORC1)<sup>70</sup>, así como mediante la fosforilación de Raptor, un factor que se asocia a mTORC<sup>71</sup>.
- Biogénesis mitocondrial: El factor coactivador de PPAR $\gamma$ 1 (PGC1), principal regulador de la biogénesis mitocondrial es fosforilado por AMPK, se propone que esto resulta en una retroalimentación positiva que incrementa su propia

transcripción<sup>72</sup>. En adición, AMPK fosforila y activa componentes de la cascada de autofagia, promoviendo con ello el reciclaje de elementos mitocondriales dañados así como para su utilización en condiciones de escasez energética<sup>73</sup>.

- Ciclo celular: AMPK ocasiona arrestos en el ciclo celular, se sugiere que este efecto está mediado por el supresor de tumores p53 y los inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas p21 y p27<sup>51</sup>.



**Figura 7. Efectos de la activación de AMPK.**

#### 1.2.4 AMPK y el segundo mensajero GMPc

En adición a los estímulos canónicos que activan AMPK, diversos grupos de investigación han encontrado una relación entre el incremento en la producción de GMPc y la activación de AMPK.

Las primeras investigaciones que relacionan la activación de AMPK por GMPc, lo reportan de manera indirecta, al encontrar una activación de la cinasa en respuesta a la presencia de compuestos donadores de óxido nítrico (NO)<sup>74-78</sup>. Debido a que una de las vías de señalización por óxido nítrico actúa mediante la estimulación de la guanilato ciclasa generando GMPc y activando la proteína cinasa dependiente de GMPc (PKG), se especuló que AMPK podría ser activada por la producción de este segundo mensajero.

Estudios realizados tanto en modelos *in vitro* como en tejidos humanos y de ratón, así como en un modelo *in vivo*, observaron que la exposición a donadores de NO incrementaba la abundancia del transportador de GLUT4<sup>74</sup>, la captación de glucosa<sup>75</sup>, la oxidación de palmitato<sup>76</sup> y en correspondencia, la actividad y fosforilación de AMPK; estos efectos mostraron una dependencia de la activación de la guanilato ciclasa<sup>74-78</sup>. En adición, la exposición al análogo sintético de GMPc, 8-bromo GMPc, también resultó en una mayor fosforilación de AMPK, así como de su blanco canónico, la acetil-CoA carboxilasa<sup>77</sup>.

La relación entre la activación de AMPK y la vía de GMPc también ha sido observada en estudios no relacionados con la señalización por óxido nítrico. En el caracol desértico *Otala lactea* se observa un estado de depresión energética, conocido como estivación, que se presenta ante condiciones de sequía y ausencia de alimento. Durante este estado, se observó un aumento en la fosforilación y activación de AMPK en músculo, efecto también observado ante la exposición con 8-bromo-GMPc, así como en un co-inmunoprecipitado con PKG, lo cual sugiere además una interacción entre ambas cinasas. En correlación, se encontró una mayor fosforilación y menor actividad del sustrato de AMPK, la acetil-CoA carboxilasa y de la glucógeno sintasa, así como una menor abundancia protéica de SREBP1c, glucosa-6-fosfatasa y fosfoenol piruvato carboxicinas en el hepatopáncreas<sup>79</sup>.

### 1.2.5 AMPK y Glucagon

El glucagon es una hormona peptídica secretada por las células  $\alpha$  de los islotes pancreáticos en respuesta al ayuno. Su secreción tiene como objetivo proveer sustratos para la producción de energía mediante la activación de las vías de glucogenólisis (activa glucógeno fosforilasa), gluconeogénesis (activa la glucosa-6-fosfatasa y fosfoenol piruvato carboxicinas), lipólisis (activa la lipasa sensible a hormona) y oxidación de ácidos grasos (Inhibe acetil-CoA carboxilasa y activa CPT-1), además, inhibe la utilización de energía por vías como la glucogénesis (inhibe glucógeno sintasa) y la síntesis de proteínas.

Dado su papel en el balance energético, es lógico pensar que la secreción de glucagon podría resultar también en la activación de AMPK, sin embargo, hay pocos estudios que se han dedicado a elucidar este vínculo.

En el hígado de rata perfundido *in situ*, la infusión de glucagon inhibe la acción de mTOR en respuesta a la señalización por aminoácidos y se sugiere que este efecto está mediado por un incremento en la fosforilación y activación de PKA, LKB1 y AMPK <sup>80</sup>.

Estudios en los que se empleó un clamp hiperglucagonémico-euglicémico en ratones, observan un incremento en la proporción AMP/ATP y en la fosforilación de AMPK, así como en su proteína blanco acetil-CoA carboxilasa, sin embargo, este efecto se observa de manera independiente a la activación de LKB1, por lo que se propone que está mediado por una regulación alostérica <sup>81,82</sup>.

La activación de AMPK en respuesta a glucagon también ha sido observada en modelos *in vitro*.<sup>83,84</sup>. Un estudio muy completo que empleó adipocitos 3T3-L1 de ratón y fibroblastos murinos embrionarios reportó que la incubación con glucagon resulta en un incremento en la fosforilación de la acetil-CoA carboxilasa-1 y -2 así como en un decremento en la lipogénesis, ambos efectos son dependientes de la activación de AMPK e independientes de PKA. Experimentos con células que carecen de la expresión de CAMKK $\beta$  o LKB1, o que fueron expuestas a inhibidores de ambas enzimas, demuestran que la activación de AMPK es dependiente de CAMKK $\beta$ . Estos resultados fueron confirmados también en hígado y tejido adiposo de ratón <sup>84</sup>.

La exposición de células 3T3-L1 a análogos o agentes generadores de AMPc también resulta en un incremento en la fosforilación y actividad de AMPK <sup>85</sup>. Debido a que la señalización por glucagon involucra la activación de la adenilato ciclasa y con ello un incremento en las concentraciones de AMPc, las observaciones de este estudio apoyan el vínculo entre glucagon y la activación de AMPK.

A pesar de que los estudios previamente mencionados demuestran que AMPK es activada en respuesta a glucagon, los mecanismos involucrados en esta acción aún no son claros ya que los autores proponen diferentes intermediarios como PKA, CAMKK $\beta$ , LKB1 e incluso la activación alostérica mediada por AMP. Además, algunos grupos de

investigación sugieren que glucagon tiene un efecto opuesto sobre AMPK, al inhibirla a través de la fosforilación del residuo de Serina 173<sup>86,87</sup>.

El grupo de Krek<sup>87</sup> reporta que en cultivos primarios de adipocitos de ratón y fibroblastos murinos embrionarios diferenciados a adipocitos, la incubación con agentes generadores de AMPc resulta en la fosforilación de la serina173 de AMPK por acción de PKA, lo cual impide que LKB1 active a AMPK por medio de su fosforilación en la Thr172. Se propone que este efecto tiene como propósito evitar la regulación negativa de AMPK sobre la lipólisis, ya que tanto esta enzima como PKA compiten por la fosforilación de la lipasa sensible a hormona en residuos inhibitorios y activadores respectivamente. Sin embargo, este mismo artículo sugiere que ante exposiciones crónicas a los generadores de AMPc, la inhibición sobre AMPK se pierde y entonces es activada en respuesta a la depleción energética con el objetivo de suprimir la lipólisis.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha demostrado que la administración de biotina a dosis farmacológicas en un rango de 30 a 650 veces los requerimientos diarios de 30µg, modifica la abundancia de algunos RNAm y proteínas que participan en el metabolismo de lípidos y carbohidratos. Los datos indican que el mecanismo involucrado en la generación de estos efectos depende de la activación de la guanilato ciclasa que a su vez incrementa las concentraciones de GMPc<sup>88</sup>, sin embargo, los mediadores que participan en la señalización tanto río arriba como río abajo de la generación del segundo mensajero son inciertos.

En un estudio reciente de nuestro laboratorio<sup>36</sup>, la administración de una dieta suplementada con biotina a ratones durante 8 semanas resultó en una reducción de 35% en las concentraciones de triglicéridos en suero e hígado, en correspondencia, la abundancia de proteínas que participan en el proceso de lipogénesis se vio alterada. Como parte de los esfuerzos para elucidar el mecanismo de acción involucrado, se analizó la abundancia de la enzima AMPK, así como del segundo mensajero GMPc y en ambos casos se encontró un incremento. Debido a que algunos grupos de investigación han reportado la activación de AMPK en respuesta a la elevación de las concentraciones de GMPc<sup>75,79</sup> y ya que esta proteína es una enzima clave en la regulación energética que actúa sobre algunos de los blancos que también se ven alterados en respuesta a la suplementación con concentraciones farmacológicas de biotina, es posible que los resultados observados en el hígado ante la administración de esta vitamina estén mediados por estos efectores.

Dado que el uso de un modelo *in vivo* presenta dificultades para demostrar si la fosforilación de AMPK en respuesta a la suplementación con biotina es resultado de la acción directa de la vitamina en el hígado y si este efecto se produce mediante la vía de señalización de GMPc o bien, depende de la intervención de otros tejidos para generarla, este proyecto se plantea usar células en cultivo para discernir entre ambas posibilidades.

Los resultados obtenidos a partir del presente proyecto brindarán una pauta para comprender los mecanismos involucrados en la acción de la biotina sobre la fosforilación de AMPK, así como permitirán profundizar en el conocimiento acerca de los efectos que tiene esta vitamina cuando es administrada a concentraciones farmacológicas.

### **3. HIPÓTESIS**

La exposición de células hepáticas en cultivo a concentraciones farmacológicas de biotina resulta en la activación de AMPK por medio un mecanismo en el que participa el GMPc.

### **4. OBJETIVO**

Analizar la abundancia protéica de la forma activa de AMPK en células hepáticas en cultivo expuestas a concentraciones farmacológicas de biotina.

### **5. OBJETIVOS PARTICULARES**

Analizar por medio de la metodología de Western Blot la abundancia de la proteína AMPK fosforilada en la treonina 172 en células hepáticas expuestas a:

- Concentraciones farmacológicas de biotina
- 8-bromo-GMPc

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Reactivos:

6.1.1 *Aislamiento de hepatocitos de rata*: Fosfato de potasio monobásico, Cloruro de sodio (JT Baker) , Cloruro de Potasio, Sulfato de Magnesio, Bicarbonato de Sodio, Cloruro de Calcio, Colagenasa tipo IV (Sigma-Aldrich), Percoll (GE Healthcare).

6.1.2 *Cultivo primario de hepatocitos de rata*: Colágena de cola de rata (Roche), Dubecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Suero Fetal Bovino (SFB), Antibiotico/Antimicótico 100x (GIBCO); Glucosa (Reasol) y Dexametasona (Sigma-Aldrich)

6.1.3 *Cultivo celular HepG2*: DMEM, SFB, 0.25% Tripsina-EDTA 1x y Antibiotico/Antimicótico 100x (Gibco); Biotina, Metformina, 8-Bromo GMPc y Glucagon (Sigma-Aldrich).

6.1.4 *Cultivo celular 3T3-L1*: Dubecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Suero Fetal Bovino (SFB), Penicilina-Estreptomicina 100x, y 0.25% Tripsina-EDTA 1x (Gibco), HEPES, Piruvato de Sodio, Metformina, Glucagon, Isobutilmetilxantina (IBMX), Dexametasona y Rojo Oleoso (Sigma-Aldrich), Insulina (Lilly).

6.1.5 *Extracción y Cuantificación de Proteína*: Coctel inhibidor de proteasas Mini Complete (Roche); EDTA (Invitrogen, Life Technologies), EGTA, HEPES, Cloruro de Potasio, Ortovanadato de Sodio, Fluoruro de Sodio, Pirofosfato de Sodio y Triton x-100 (Sigma-Aldrich); Protein Assay Dye (Bio-Rad).

6.1.6 *Electroforesis*:  $\beta$ -Mercaptoetanol y SDS (Sigma-Aldrich); Solución Acrilamida/Bis al 30%, TEMED, Glicina, Tris y Persulfato de Amonio (Bio-Rad).

6.1.7 *Western Blot*: Membranas de nitrocelulosa 0.45 $\mu$ M (Bio-Rad), Sustrato quimioluminiscente de HRP Immobilon Western (Millipore), anticuerpo primario de ratón contra  $\alpha$ -Tubulina (B-7), anticuerpos secundarios de cabra contra IgG de conejo y cabra contra IgG de ratón acoplados a HRP (Santa Cruz Biotechnology); anticuerpos primarios monoclonales de conejo contra pAMPK $\alpha$  Thr172 (20H9) y contra AMPK $\alpha$  (23A3) (CellSignallingTechnology).

## 6.2 Aislamiento de hepatocitos de rata

Se emplearon ratas de la cepa Wistar con un peso aproximado 200-250g, las cuales se mantuvieron en cajas de acrílico con una cama de aserrín y libre acceso al agua y alimento. La noche previa al procedimiento se les retiró el alimento para mantenerlas en ayuno de 14-16h.

Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico en una dosis de 75.6 mg/kg de peso por vía intraperitoneal, una vez que los animales se encontraran en plano de cirugía y no mostraron ningún reflejo, se procedió a inmovilizarlos en una charola de perfusión. Se expuso la cavidad peritoneal haciendo una incisión en el centro del abdomen extendiéndose hacia arriba y hacia los lados hasta observar el hígado, entonces se ubicó la vena porta y se le deslizaron dos hilos por debajo, el primero se colocó donde la vena se conecta con el intestino, el segundo en una posición anterior más cercana al hígado. Se realizó un nudo en el hilo posterior de manera que se cortó el flujo del vaso y se procedió a retirar la grasa que rodeaba la vena porta, entonces se realizó un corte transversal sobre la vena sin que fuera atravesada por completo y se introdujo la cánula en el sitio del corte, posteriormente se fijó anudándola alrededor de la vena porta.

Se abrió el flujo de la solución Ringer-Krebs (NaCl 120mM, KCl 5.7mM, NaHCO<sub>3</sub> 6mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2mM, la cual previamente fue saturada con una mezcla de gas CO<sub>2</sub> / O<sub>2</sub>, ajustada a un pH de 7.4 y atemperada a 37°C) a través de la cánula ya inserta en la vena. Inmediatamente se observó que el hígado comenzaba a palidecer, entonces, se extirpó teniendo cuidado de no perforarlo. Una vez que el hígado fue extraído, con el uso de la cánula se tendió dentro de uno de los contenedores del perfusor para mantener su temperatura constante y se cambió el flujo de Ringer-Krebs que estaba corriendo, por la misma solución adicionada con cloruro de calcio y colagenasa tipo IV, ésta se recirculó a través del hígado por alrededor de 9 min o hasta que se observó que se reblandecía. Entonces se abrió nuevamente el flujo de la solución libre de cloruro de calcio, se colocó el hígado sobre un embudo cubierto con una malla de tela y mediante la presión de un tubo de ensaye se procedió a molerlo suavemente hasta que todo el órgano se disgregó, la suspensión celular se recuperó en un tubo de 50mL.

Se centrifugó el tubo a 500rpm por 2 min a 4°C, se retiró el sobrenadante, se agregó nuevamente solución de Ringer-Krebs y se volvió a centrifugar, este procedimiento se repitió una vez más y entonces se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en

20 mL de Ringer-Krebs y sobre ésta se añadieron 30 mL de Percoll al 50% en PBS 1x (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.8 mM); se centrifugó a 1000 rpm por 5 min a 4°C. En la superficie del gradiente se encontraron las células no parenquimales así como hepatocitos muertos, mientras que en el pellet se encontraron mayormente hepatocitos vivos.

### **6.3 Tratamiento del cultivo primario de hepatocitos de rata**

El pellet obtenido mediante el gradiente se llevó a la campana de flujo laminar donde se resuspendió en 10mL de medio DMEM. Una vez lista la suspensión celular se realizó el conteo de viabilidad mediante el uso de una cámara de Neubauer por el método de azul Tripán, si el porcentaje de viabilidad era mayor al 70% se procedía a sembrar las células en una densidad de 2.5 millones por caja de 100 mm de diámetro cubierta con colágena. El medio empleado para el cultivo de los hepatocitos fue DMEM adicionado con 5.5 mM de glucosa, 10% SFB, 1% antibiótico/antimicótico 100x y dexametasona 1µM. Las células fueron incubadas a una temperatura de 37°C y una presión de CO<sub>2</sub> del 5%.

Después de la siembra, se permitió que las células se adhirieran a la matriz de la caja y crecieran por una noche; al día siguiente fueron tratadas por 1, 2 o 6h con agua, biotina 1µM o metformina 10mM.

### **6.4 Cultivo de la línea celular HepG2**

Como segundo modelo, se empleó la línea celular de hepatocarcinoma HepG2, la cual fue obtenida directamente del American Type Culture Collection, ATCC (HB-8065).

Para su cultivo, las células se incubaron a una temperatura de 37°C y una presión de CO<sub>2</sub> del 5% en cajas de 100mm de diámetro con DMEM adicionado con 5.5mM de glucosa, 10% SFB y 1% antibiótico/antimicótico 100x.

Los pasajes de cultivo se realizaron cada 7 días, cuando las células alcanzaran un porcentaje de confluencia de alrededor del 80%; para ello se retiró el medio, la superficie se lavó con PBS 1X, se añadieron 1.5mL de Tripsina-EDTA 0.25% por caja de 100mm y se incubaron a 37°C por 5 min. Una vez que las células estuvieran desprendidas de la superficie se añadió medio suplementado para inhibir la acción de la tripsina, posteriormente se resuspendieron con el propósito de romper las adhesiones intercelulares y obtener una suspensión de células individuales, entonces se tomaron 10µL de la suspensión y se tiñeron con Azul de Tripán para realizar el conteo en cámara

de Neubauer. Finalmente se sembraron a una densidad de  $12.5 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> en medio DMEM suplementado.

Para los experimentos se sembraron  $1 \times 10^6$  células en cada caja de 100mm y se incubaron hasta conseguir una confluencia del 75%, entonces se cambió el medio completo por medio sin SFB y se mantuvieron en estas condiciones por alrededor de 17 horas previas a la adición de los distintos tratamientos: Biotina 1  $\mu$ M, Metformina 2 mM, 8-Bromo GMPc 1 mM, Glucagon 100 nM o 1  $\mu$ M, o agua destilada.

### **6.5 Cultivo de la línea celular 3T3-L1**

Se emplearon adipocitos diferenciados a partir de línea celular 3T3-L1. Para su cultivo, se sembraron  $5 \times 10^4$  células por caja de 60mm, en medio DMEM adicionado con 10% SFB, 1% Penicilina-Estreptomicina y 6.25mM de glucosa (Medio de crecimiento).

Los pasajes de cultivo se realizaron 3-4 días después de la siembra de las células, cuando alcanzaron un porcentaje de confluencia de alrededor del 80%; para ello se retiró el medio, se añadieron 2mL de Tripsina-EDTA 0.25% por caja de 100mm y se incubaron a 37°C por 5 min. Una vez que las células se desprendieron de la superficie, se añadió medio suplementado para inhibir la acción de la tripsina, entonces, se resuspendieron suavemente con el propósito de romper las adhesiones intercelulares y obtener una solución de células individuales. La suspensión celular fue centrifugada a 500 rpm por 3 min y el medio fue descartado para retirar los restos de tripsina, se añadieron 5 mL de medio fresco y posteriormente se realizó el conteo en cámara de Neubauer, finalmente se sembraron a una densidad de  $1.3 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> en medio de crecimiento.

Para inducir el proceso de diferenciación dos días después de llegar a confluencia se añadieron al medio de crecimiento los inductores, Dexametasona 1  $\mu$ M, IBMX 0.5 mM e Insulina 1.7 mM, 48h después se cambió el medio de diferenciación por medio de crecimiento. La diferenciación se continuó hasta el día 8 post-inducción, cuando se realizaron los experimentos. Durante todo el tiempo de cultivo el medio fue renovado cada 48h.

Para los tratamientos, se agregó al medio de crecimiento Glucagon a una concentración 100nM y 1 $\mu$ M o agua destilada por 2 horas; como control positivo se añadió Metformina a una concentración 2mM por 24 horas.

## **6.6 Cosecha de las células tratadas**

Para cualquiera de los tres modelos empleados, después de haberse cumplido los tiempos de tratamiento se retiró el medio de cultivo de las cajas, se lavaron con PBS 1x para retirar por completo los residuos de compuestos, se añadieron 300µL de Buffer de lisis para proteínas fosforiladas (HEPES 50mM, KCl 50mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM, Tritón X-100 0.1%, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 2 mM, DTT 1 mM, NaF 25 mM, Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 10H<sub>2</sub>O 5 mM y coctel inhibidor de proteasas, Mini Complete) y se procedió a recuperar las células raspando con un gendarme la superficie de las cajas. Finalmente las suspensiones se recuperaron y se guardaron en congelación a -70°C hasta su uso.

## **6.7 Extracción de proteína**

Para romper completamente los componentes celulares, las suspensiones se sometieron a 3 ciclos de congelamiento (-70°C) y descongelamiento (15°C), posteriormente se disgregaron mediante el uso de un sonicador (UltrasonicProcessor) con una amplitud 60 Hz hasta que fueran homogéneas. Los disgregados se centrifugaron a 12,500 rpm x 30min a 4°C y se recuperaron los sobrenadantes. Posteriormente se realizó la cuantificación de proteína por el método de Bradford en el lector multimodal Synergy HT (Biotek) con una excitación de 595nm.

## **6.8 SDS-PAGE y Western Blot**

Se prepararon geles de SDS-poliacrilamida al 10% con un grosor de 1.5 mm, en los cuales se cargaron un total de 75µg de proteína por pozo, para la electroforesis, los geles se corrieron alrededor de 1h a 50v en una cámara de electroforesis (BioRad) hasta que los frentes de corrida cruzaran el gel concentrador, entonces se cambió el voltaje a 100 volts y se corrieron por 3 horas más. Posteriormente se llevó a cabo la electrotransferencia sobre membranas de nitrocelulosa en una cámara de transferencia húmeda (BioRad) con un voltaje de 100V, 1 hora a 4°C. Al finalizar, se tiñeron las membranas con Rojo Ponceau para comprobar la eficiencia de la transferencia y posteriormente se retiró lavando con TBS-Tween 0.1% (TBS-T; Tris-base 100 mM, NaCl 150 mM y 0.1% Tween 20).

Se bloquearon las membranas por 1 hora a temperatura ambiente con leche en polvo libre de grasas al 5% en TBS-T. Al terminar el bloqueo, se añadieron los respectivos

anticuerpos primarios (Tabla 1) en leche al 5% en TBS-T y se incubaron toda la noche a 4°C, el día siguiente se lavó el exceso de anticuerpo y se incubó en el anticuerpo secundario (Tabla 1) acoplado a la peroxidasa de rábano (HRP) por 1h a temperatura ambiente. Nuevamente se lavaron las membranas y se revelaron por quimioluminiscencia en el aparato Molecular Imager Chemidoc XRS System (BIORAD) o el aparato FusionFx (VilberLourmat) después de añadir el reactivo de luminol y la solución de peróxido del sustrato de HRP.

Anticuerpo 1°	Dilución	Anticuerpo 2°	Dilución
Anticuerpo monoclonal de conejo contra p-AMPK $\alpha$ (T172)	1:500	Anticuerpo de cabra contra la IgG de conejo acoplado a HRP	1:3000
Anticuerpo monoclonal de conejo contra AMPK $\alpha$	1:500	Anticuerpo de cabra contra la IgG de conejo acoplado a HRP	1:3000
Anticuerpo monoclonal de ratón contra $\alpha$ -Tubulina	1:300	Anticuerpo de cabra contra la IgG de ratón acoplado a HRP	1:5000

**Tabla 1. Anticuerpos y sus diluciones empleadas para la metodología de Western Blot**

Al terminar de revelar, las membranas se sometieron al proceso de remoción de los anticuerpos adheridos a la membrana (stripping) con una solución de Glicina 25mM y SDS1%, pH 2 por 30min a temperatura ambiente con agitación constante. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 10min con TBS-T; una vez realizado este procedimiento la membrana estuvo lista para ser incubada con otro anticuerpo primario.

## 6.9 Análisis densitométrico

Las imágenes de los Western Blots capturadas con el fotodocumentador fueron analizadas mediante el uso del programa ImageJ 1.46r (Wayne Rasband, NIH,USA). Para los western blots obtenidos como resultado de la incubación con biotina y 8-Bromo-GMPc, se obtuvieron los valores de densidad integrada de las bandas de pAMPK y estos fueron divididos entre los de las bandas de tubulina. Para los western blots obtenidos como resultado de la incubación con glucagon, las densidades integradas de las bandas de pAMPK fueron divididas entre las de AMPK $\alpha$ ; de esta manera se obtuvieron los valores de abundancia relativa de nuestra proteína de interés.

### **6.10 Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó empleando en programa Prism 6 para Windows, versión 6.01 (GraphPad Software, Inc). Los datos son presentados como la media  $\pm$  el error estándar (EE). La significancia estadística fue evaluada por medio de la prueba de ANOVA de una vía, seguida de una prueba post-hoc de Tuckey. Se consideraron estadísticamente significativos aquellos valores con una  $p < 0.05$ .

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Hepatocitos

#### 7.1.1 Efecto del tratamiento de biotina sobre la abundancia de la forma activa de AMPK en cultivo primario de Hepatocitos

Previamente en nuestro laboratorio se demostró que la administración de una dieta suplementada con biotina a ratones por 8 semanas, tenía como consecuencia un incremento en la abundancia de la forma activa de la proteína AMPK (fosforilada en la Treonina 172) <sup>36</sup>. Con el propósito de investigar si dicha activación se da por acción directa de la vitamina en hígado, se propuso usar como modelo *in vitro* el cultivo primario de hepatocitos de rata.

Bansándonos en la concentración de biotina empleada tanto en un reporte pionero de los efectos farmacológicos de la biotina efectuado en hepatocitos de rata<sup>10</sup>, como en ensayos preeliminares llevados a cabo por nuestro grupo, y tomando en cuenta que en los estudios realizados por nuestro laboratorio, las concentraciones de biotina encontradas en el suero de ratones suplementados con la vitamina fueron de alrededor de 0.5  $\mu\text{M}$ <sup>29</sup>, decidimos adicionar 1  $\mu\text{M}$  de biotina a nuestros cultivos.

Los hepatocitos fueron tratados con biotina 1 $\mu\text{M}$  por 1, 2 y 6 horas o con el fármaco Metformina 10mM por 2h, el cual fue empleado como control positivo de la activación de AMPK. La abundancia de la proteína en su forma fosforilada y activa (p-AMPK<sup>Thr172</sup>) fue analizada por Western Blot. No se observaron cambios en la fosforilación de la proteína en respuesta al tratamiento de biotina para ninguno de los tiempos empleados, en contraste, como era esperado, la adición de metformina ocasionó un incremento de alrededor del triple en la abundancia de la proteína fosforilada (Fig. 9).

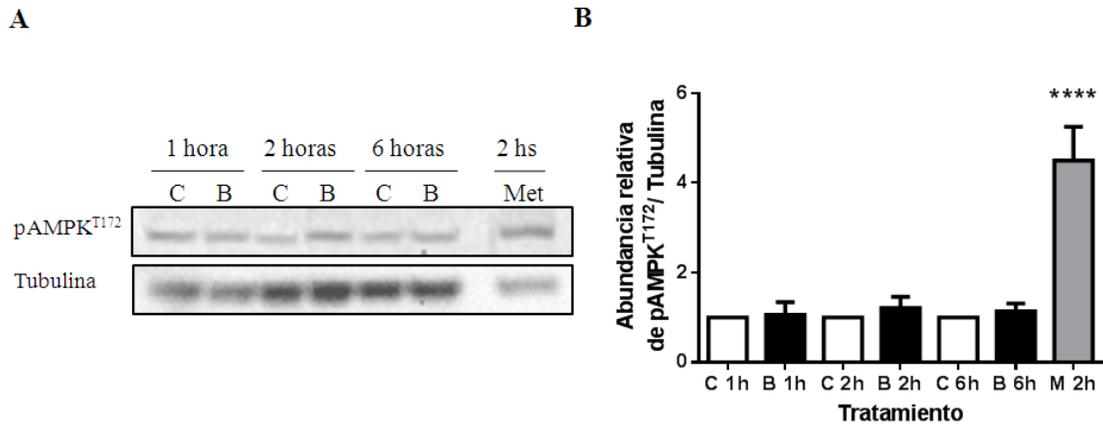
### 7.2 Células HepG2

#### 7.2.1 Establecimiento de la línea celular HepG2

Debido a que el cultivo primario de hepatocitos presentaba limitaciones en el número y el porcentaje de viabilidad de las células que se obtenían durante el procedimiento de aislamiento, así como los tiempos de tratamiento que se podían emplear para los

experimentos, se decidió cambiar el modelo de cultivo primario, por la línea celular de hepatocarcinoma HepG2.

La línea celular se compró directamente del American Type Culture Collection, por lo que antes de comenzar a realizar los experimentos, nos dispusimos a establecer las condiciones adecuadas para su crecimiento, así como a generar un banco en congelación que sirviera para su posterior utilización.

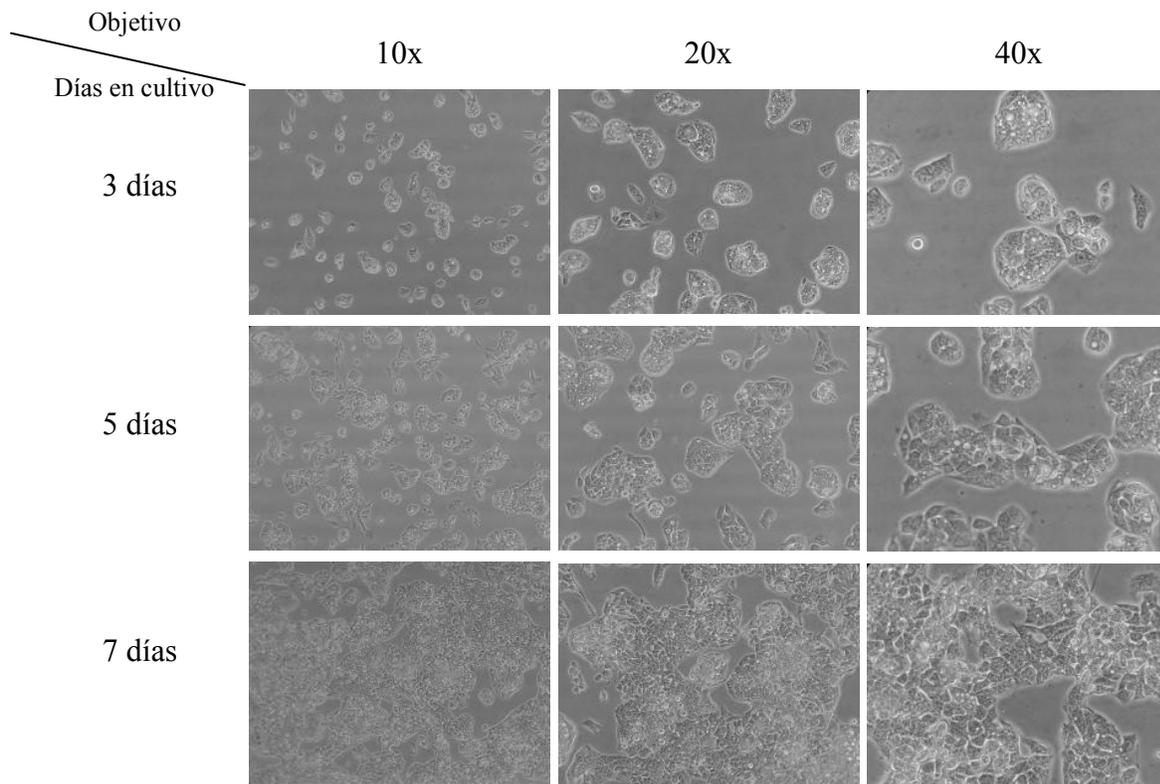


**Figura 9.** Efecto de los tratamientos con biotina por 1, 2 y 6 horas sobre la abundancia de AMPK fosforilada en cultivo primario de hepatocitos de rata. A. Western Blot representativo de AMPK fosforilada en Thr172 (p-AMPK<sup>Thr172</sup>). C: control, B: biotina (1  $\mu$ M), M: metformina (10 mM). B. Histograma de la abundancia relativa de pAMPK<sup>Thr172</sup> expresado en media  $\pm$  error estándar.  $n=3$  experimentos independientes. \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$

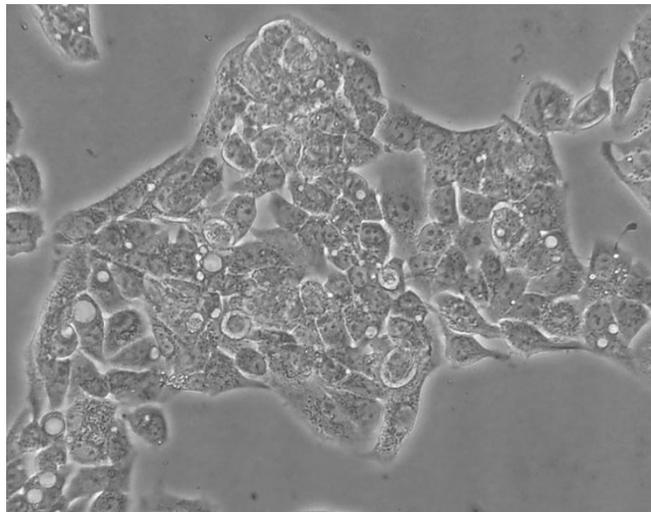
### 7.2.1.1 Características de las células HepG2

Las células fueron cultivadas en cajas de 100 mm en medio DMEM adicionado con 5.5 mM de glucosa, 10% SFB y 1% antibiótico - antimicótico. Bajo estas condiciones, las células formaban “pequeñas islas” que crecían hacia el exterior al paso de los días y se juntaban formando una monocapa, alrededor de una semana después de ser sembradas, se encontraban aproximadamente al 80% de confluencia (Fig. 10).

Morfológicamente las células mostraron ser irregulares con bordes alargados y un citoplasma granuloso que además presentaba un número variable de vesículas (Fig. 11).



**Figura 10. Patrón de proliferación de las células HepG2 a lo largo del tiempo de cultivo**

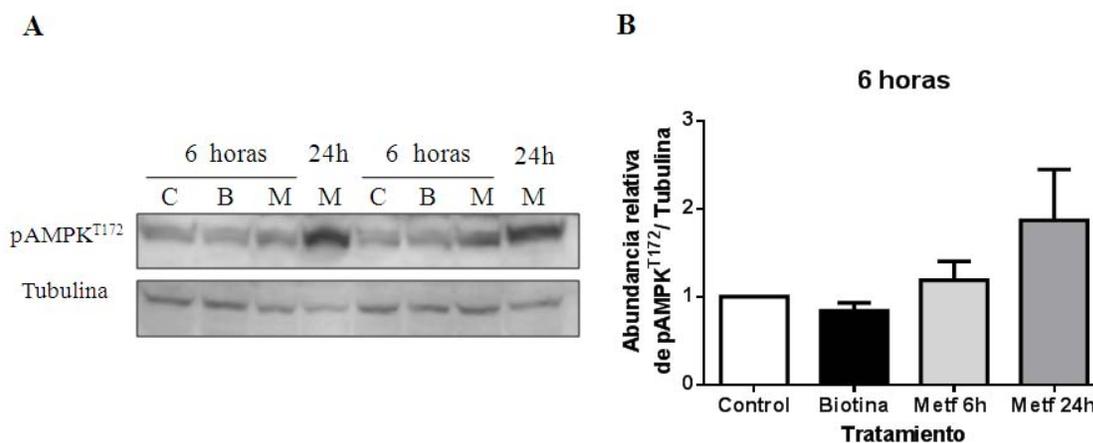


**Figura 11. Morfología de células HepG2 a un aumento de 40x.**

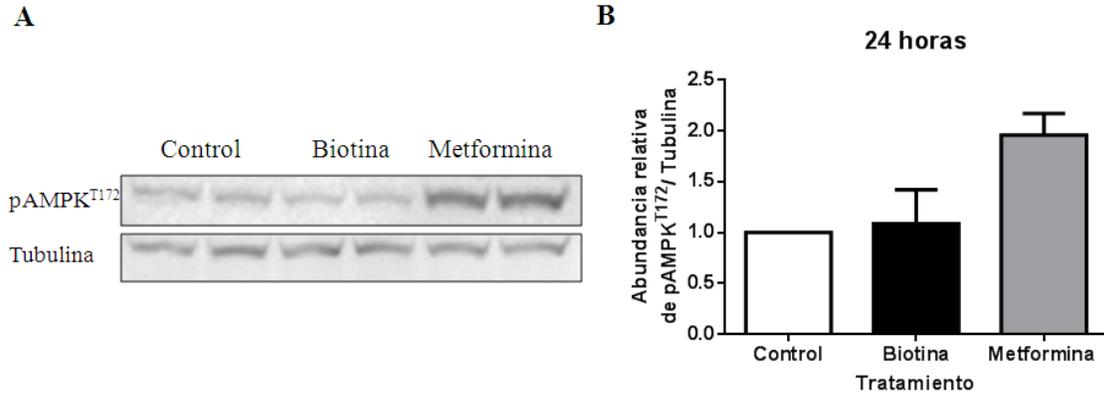
### 7.2.2 Efecto del tratamiento de biotina sobre la abundancia de la forma activa de AMPK en células HepG2

La línea celular HepG2 fue tratada con 1  $\mu$ M de biotina por 6 (Fig. 12) o 24 horas (Fig. 13), 3 y 7 días (Fig. 14) o con el fármaco metformina 2 mM por 6 y 24 horas, entonces la abundancia de p-AMPK<sup>Thr172</sup> fue analizada.

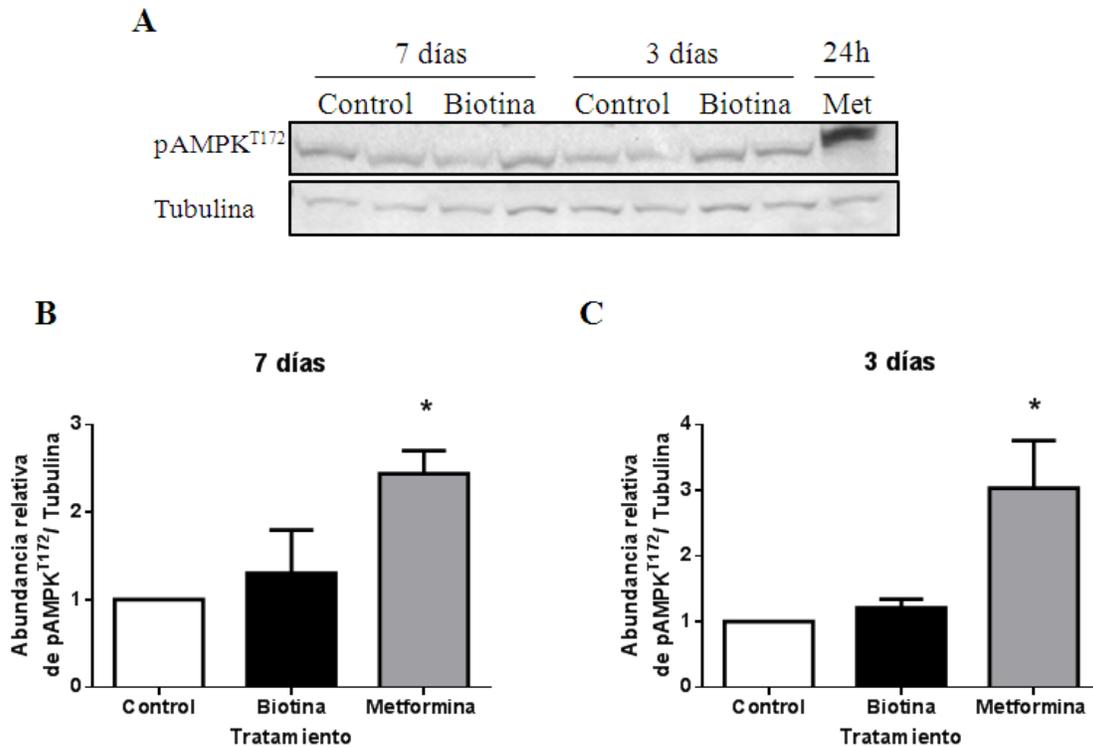
El tratamiento con Metformina 2 mM por 6 h en las células HepG2 no tuvo ningún efecto sobre la abundancia de p-AMPK<sup>Thr172</sup>, en contraposición, la incubación con la misma concentración del compuesto por 24 h mostró una clara tendencia de incremento en la abundancia de alrededor del doble, por lo que para el resto de los experimentos se empleó este tiempo de tratamiento como control positivo. El tratamiento con Biotina 1  $\mu$ M no demostró tener efecto sobre la fosforilación de AMPK en ninguno de los tiempos estudiados.



**Figura12. Efecto del tratamiento con biotina por 6 horas sobre la abundancia de AMPK fosforilada en células HepG2.** A. Western Blot representativo de p-AMPK<sup>Thr17</sup>. C: control, B: biotina (1  $\mu$ M), M: metformina (2 mM). B. Histograma de abundancia relativa de p-AMPK<sup>Thr172</sup> expresado en medias  $\pm$  error estándar.  $n=3$  experimentos independientes.



**Figura 13. Efecto del tratamiento con biotina por 24 horas sobre la abundancia de AMPK fosforilada en células HepG2.** A. Western Blot representativo de p-AMPK<sup>Thr172</sup>. C: control, B:biotina (1  $\mu$ M), M: metformina (2 mM). B. Histograma de la abundancia relativa de p-AMPK<sup>Thr172</sup> expresado en medias  $\pm$  error estándar.  $n=3$  experimentos independientes.

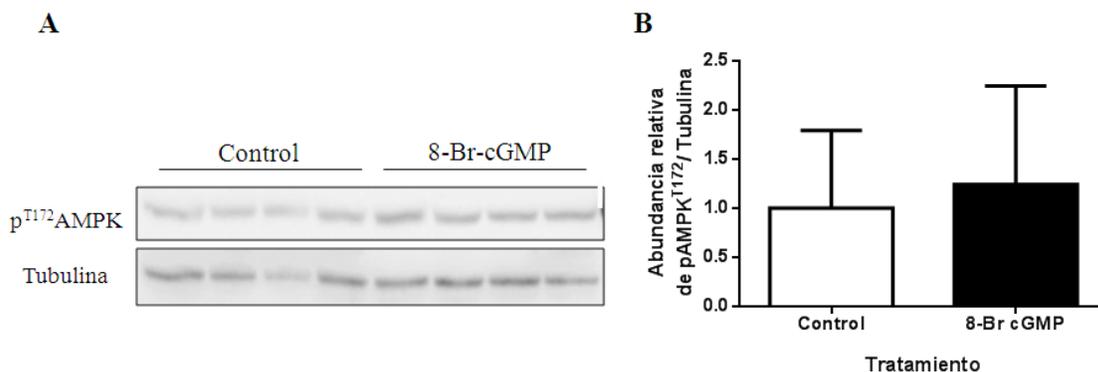


**Figura 14. Efecto del tratamiento con biotina por 7 y 3 días sobre la abundancia de AMPK fosforilada en células HepG2.** A. Western Blot representativo de p-AMPK<sup>Thr172</sup>. C: control, B: biotina (1  $\mu$ M), M: metformina (2 mM). B. y C. Histograma de la abundancia relativa de p-AMPK<sup>Thr172</sup> en respuesta a 3 días A. y 7 días de tratamiento B. expresado en medias  $\pm$  error estándar.  $n=3$  experimentos independientes. \*  $p \leq 0.05$

### 7.2.3 Efecto del tratamiento con 8-Bromo GMPc sobre la abundancia de la forma activa de la AMPK en células HepG2

En el estudio publicado por nuestro laboratorio, el incremento en la abundancia de la AMPK fosforilada se asoció con un aumento en la concentración de GMPc en hígado, lo que llevó a estructurar la hipótesis de que la activación de la enzima era resultado de la acción del segundo mensajero <sup>36</sup>.

Debido a que en el presente proyecto no observamos cambios en la abundancia de p-AMPK<sup>Thr172</sup> en respuesta a los tratamientos con biotina, pensamos que la vitamina podría estar actuando de manera indirecta sobre las células hepáticas mediante la generación de alguna señal proveniente de un tejido diferente que promoviera el incremento en los niveles de GMPc y este a su vez resultara en la activación de AMPK. Para analizar esta posibilidad, recurrimos a tratar el cultivo de HepG2 con un análogo sintético del GMPc, 8-Bromo-GMPc en una concentración 1mM por 1 hora, sin embargo, no se observó ningún efecto en respuesta al tratamiento (Fig. 15).



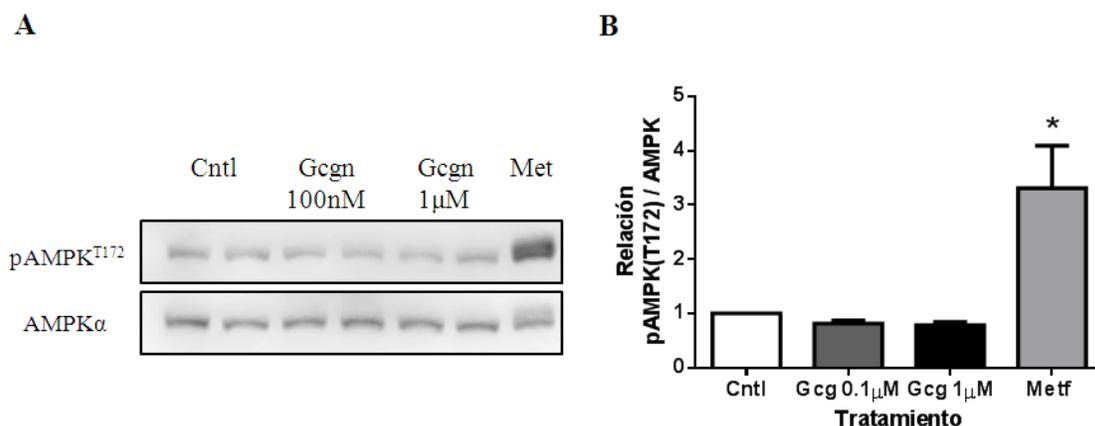
**Figura 15. Efecto del tratamiento con 8-Bromo GMPc por 1 hora sobre la abundancia de AMPK fosforilada en células HepG2.** A. Western Blot representativo de p-AMPK<sup>Thr172</sup>. B. Histograma de la abundancia relativa de p-AMPK<sup>Thr172</sup> expresado en medias  $\pm$  error estándar. 8-Bromo GMPc (1mM).  $n=3$  experimentos independientes.

#### 7.2.4 Efecto del tratamiento con Glucagon sobre la abundancia de la forma activa de AMPK en células HepG2

Trabajos no publicados del laboratorio han demostrado que la administración de dieta suplementada con biotina a ratones por 8 semanas resulta en un incremento en el área total de células alfa en los islotes pancreáticos así como en la síntesis, secreción de glucagon y las concentraciones plasmáticas de esta hormona.

Debido a que no se observaron cambios en la abundancia de la forma fosforilada de la proteína AMPK en presencia de biotina u 8-Bromo GMPc, consideramos que los efectos observados en el modelo *in vivo* podrían estar dados por la señalización generada por glucagon, que como se señaló en la introducción<sup>83-85</sup>, se ha reportado aumenta la actividad de AMPK.

La exposición de las células HepG2 a una concentración de 100 nM y 1  $\mu$ M de glucagon por 1 hora no generó ningún cambio sobre la forma fosforilada ni total de la proteína AMPK (Fig. 16).



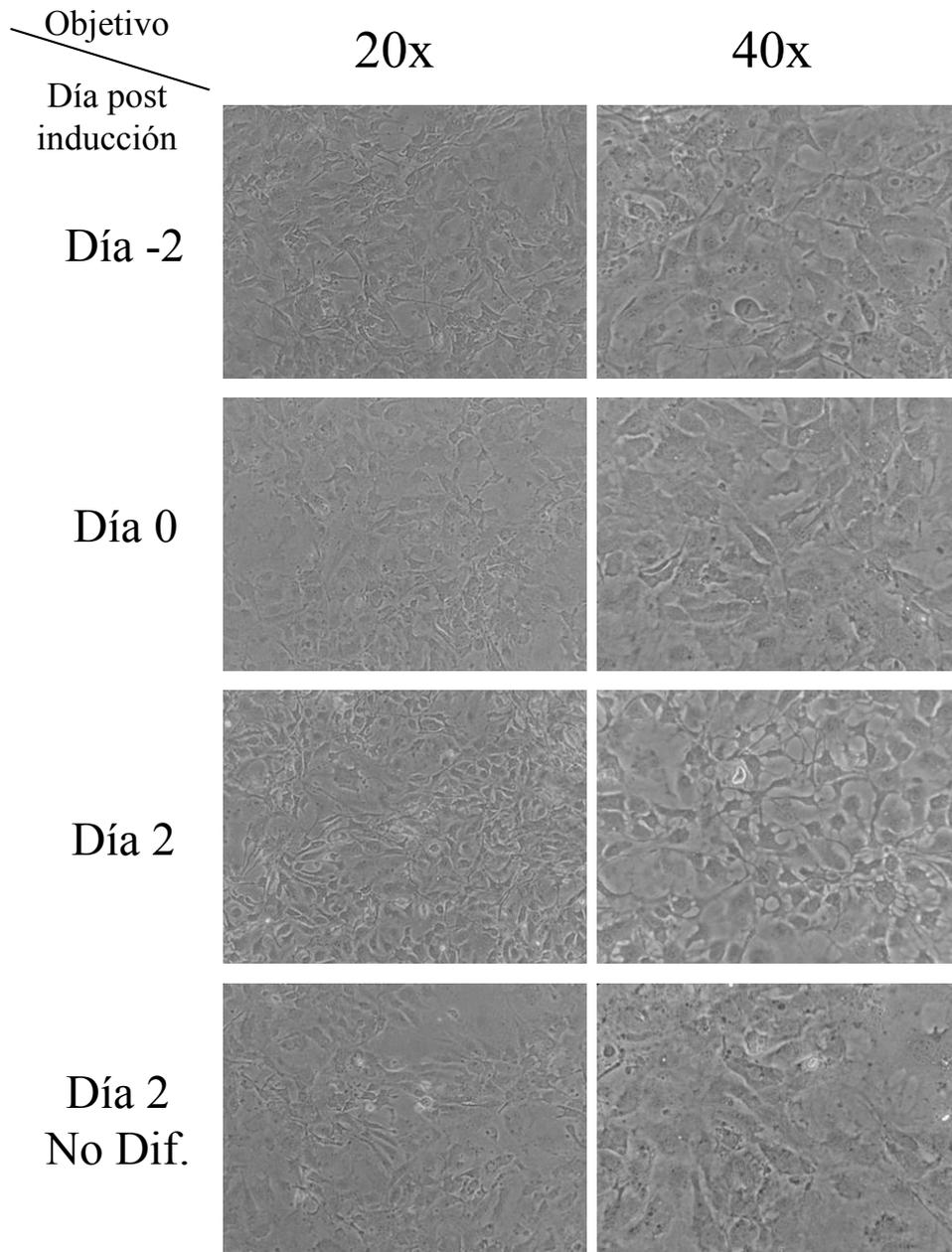
**Figura 16. Efecto del tratamiento con glucagon por 1 hora sobre la abundancia de AMPK fosforilada en células HepG2.** A. Western Blot representativo de p-AMPK<sup>Thr172</sup>. B. Histograma de la abundancia relativa de p-AMPK<sup>Thr172</sup> expresado en medias  $\pm$  error estándar. Cntl- Control, Gcgn- Glucagon 0.1  $\mu$ M y 1  $\mu$ M, Metf- Metformina  $n=3$  experimentos independientes. \* $p < 0.05$ .

## 7.3 Células 3T3-L1

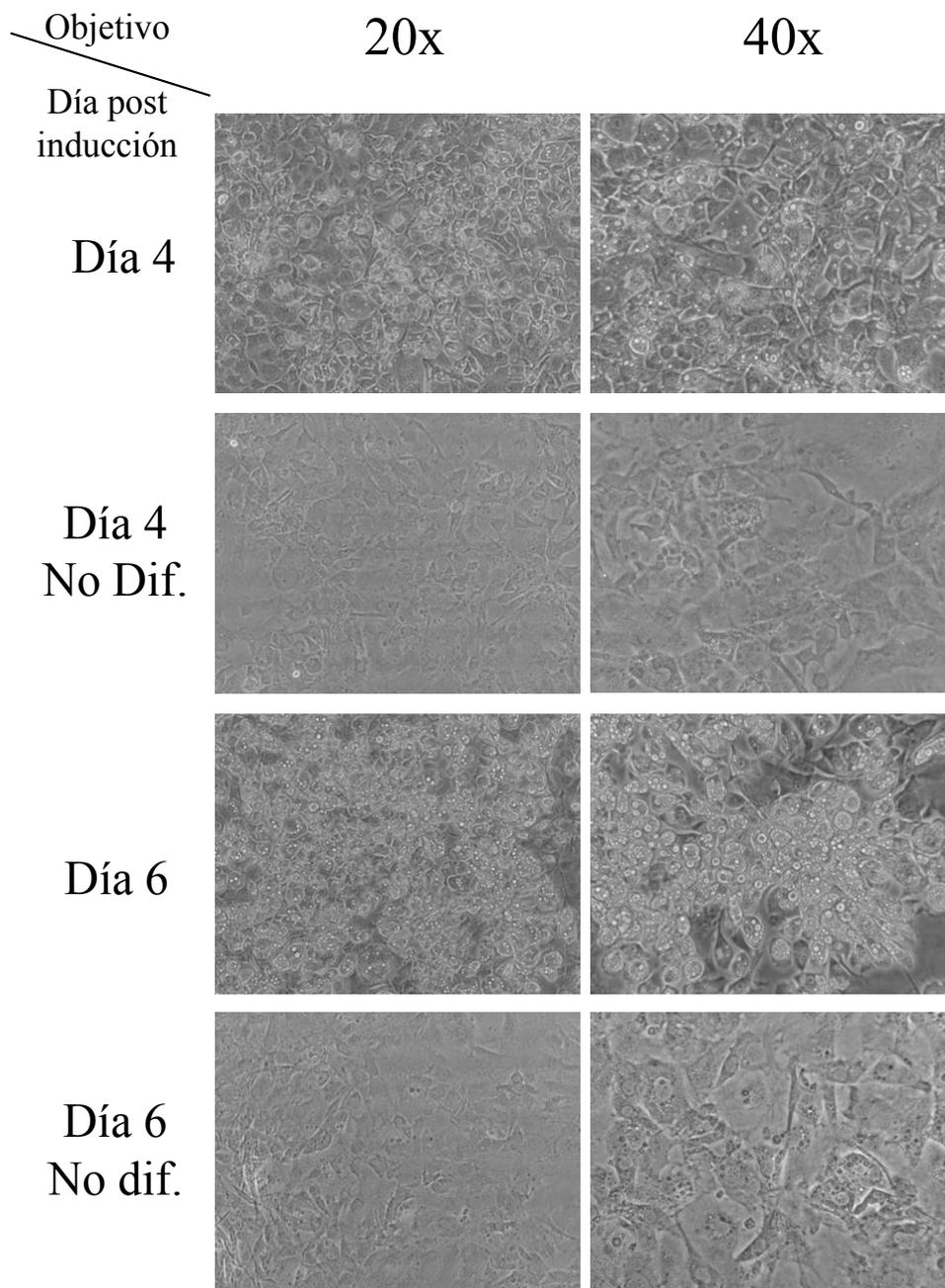
### 7.3.1 Diferenciación de células 3T3-L1 a adipocitos

Aun cuando algunos artículos han demostrado que la señalización por glucagon resulta en un incremento en la actividad de la proteína AMPK, la adición de la hormona a las células HepG2 no generó ningún cambio en la fosforilación de dicha proteína, de modo que decidimos cambiar nuestro modelo de estudio por la línea celular 3T3-L1 para la cual se ha reportado previamente una respuesta ante la presencia del glucagon <sup>84</sup>.

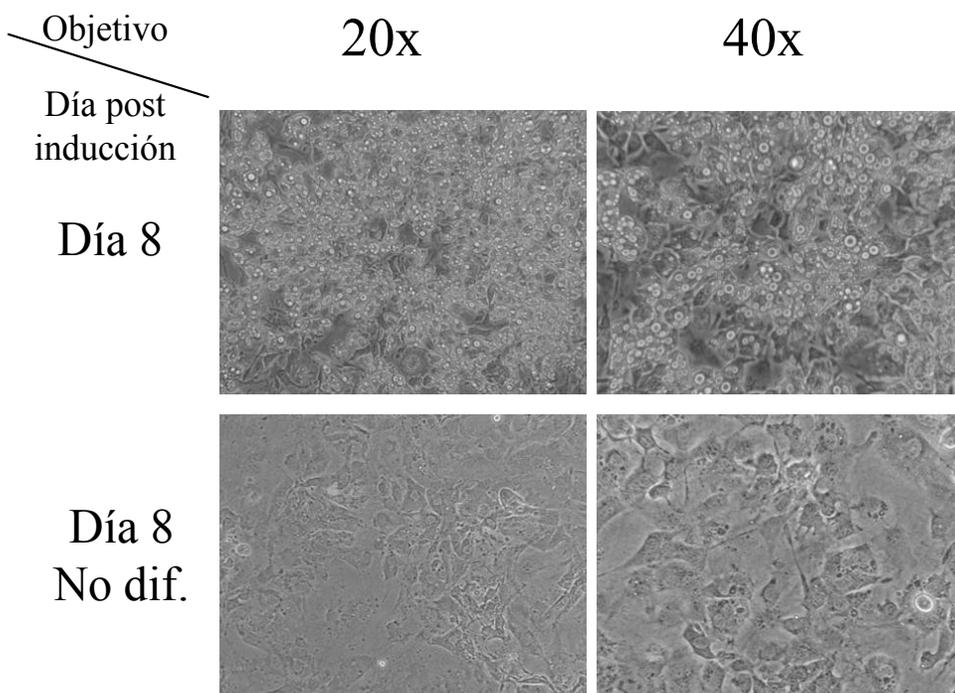
Debido a que el efecto del incremento en la fosforilación de AMPK en respuesta a glucagon en las células 3T3-L1 se observa una vez que éstas han sido diferenciadas a adipocitos <sup>84</sup>, como primer objetivo nos propusimos obtener células con características de adipocitos diferenciados en respuesta a la adición de los inductores IBMX, dexametasona e insulina. Como se puede observar en la Figura 17, después de 48 horas de la adición de los inductores, las células comenzaban a mostrar cambios morfológicos, su membrana celular parecía más delimitada, se observó una reducción en su tamaño y un incremento en los espacios intercelulares. En los días posteriores, se observó la formación de gotas lipídicas que comienzan como pequeñas estructuras irregulares que posteriormente se redondean, acumulan más lípidos y se fusionan entre ellas para incrementar su tamaño. A lo largo de los días, el número de células que presentaban gotas lipídicas incrementó hasta lograr un máximo de alrededor del 70% de la población total después de 8 días del inicio de la inducción de diferenciación.



**Figura 17a. Proceso de diferenciación de células 3T3-L1 a adipocitos en respuesta a la presencia de inductores de adipogénesis (Día -2 a Día 2).** Se muestran imágenes de las células que fueron tanto expuestas como no expuestas (No dif- No diferenciadas) a los inductores de adipogénesis y tomadas con dos diferentes objetivos, 20x y 40x.



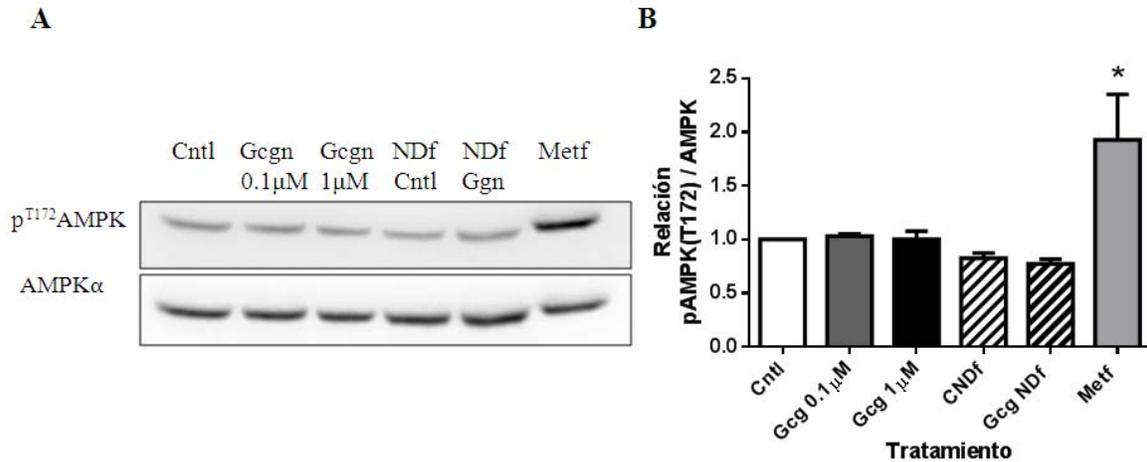
**Figura 17b. Proceso de diferenciación de células 3T3-L1 a adipocitos en respuesta a la presencia de inductores de adipogénesis (Día 4 y Día 6).** Se muestran imágenes de las células que fueron tanto expuestas como no expuestas (No dif- No diferenciadas) a los inductores de adipogénesis y tomadas con dos diferentes objetivos, 20x y 40x.



**Figura 17c. Proceso de diferenciación de células 3T3-L1 a adipocitos en respuesta a la presencia de inductores de adipogénesis (Día 8).** Se muestran imágenes de las células que fueron tanto expuestas como no expuestas (No dif- No diferenciadas) a los inductores de adipogénesis y tomadas con dos diferentes objetivos, 20x y 40x

### 7.3.2 Efecto del tratamiento con Glucagon sobre la expresión de la forma activa de la AMPK en células 3T3-L1

Una vez que se obtuvieron adipocitos diferenciados después de 8 días del inicio de su inducción, se realizaron los experimentos. En contraposición a los resultados esperados, no se observaron cambios en la fosforilación de AMPK en respuesta al tratamiento de glucagon 100 nM y 1  $\mu$ M por 2 horas en células 3T3-L1 tanto no diferenciadas como diferenciadas a adipocitos, en contraste sí se observó un incremento en la abundancia de p-AMPK<sup>Thr172</sup> en respuesta a la incubación con metformina, demostrando que la enzima sí puede ser fosforilada en estas células bajo condiciones que la activen (Fig.18).



**Figura 18. Efecto del tratamiento con glucagon por 2 horas sobre la abundancia de AMPK fosforilada en células 3T3-L1.** A. Western Blot representativo de p-AMPK<sup>Thr172</sup>. B. Histograma de la abundancia relativa de p-AMPK<sup>Thr172</sup> expresado en medias  $\pm$  error estándar. Cntl- Control, Gcgn- Glucagon 0.1  $\mu$ M y 1  $\mu$ M, Metf- Metformina. NDf- No diferenciadas (Células no expuestas a inductores de diferenciación)  $n=3$  experimentos independientes. \* $p < 0.05$ .

## 8. DISCUSIÓN

La biotina es una vitamina hidrosoluble que a concentraciones fisiológicas generadas con una ingesta diaria recomendada de 30µg, actúa como grupo prostético de carboxilasas, sin embargo, se ha demostrado que su administración a dosis farmacológicas, entre 30 y 650 veces los requerimientos diarios, modifica la abundancia de múltiples RNAm y proteínas<sup>12,15</sup>, algunos de ellos críticos del metabolismo de lípidos y carbohidratos<sup>9-11,17-21,35,36,89</sup>. Concordante con la modificación de genes del metabolismo de estos compuestos, a nivel fisiológico sus efectos resultan en una mayor tolerancia a la glucosa<sup>18,25</sup>, un incremento en la secreción<sup>19,21,27-29</sup> y sensibilidad<sup>26</sup> de la insulina así como en una reducción de los niveles de lípidos en sangre<sup>30-32,34,35</sup> e hígado<sup>36</sup> y una disminución en el peso del tejido adiposo<sup>35</sup>.

Existen diversos reportes que asocian los efectos de la suplementación con biotina con un incremento en la actividad de la guanilato ciclasa<sup>45</sup> y como consecuencia un aumento en las concentraciones de GMPc<sup>10,36,45-47</sup>. Se ha reportado que la adición del análogo sintético 8-Bromo-GMPc a células y tejidos resulta en la imitación de los efectos observados en presencia de la vitamina<sup>21,23,24,90</sup>, sin embargo, el mecanismo involucrado en la señalización tanto río arriba, como río abajo de la generación de GMPc continúan siendo poco conocidos.

En un estudio reciente de nuestro laboratorio<sup>36</sup> con el propósito de elucidar los mecanismos involucrados en los efectos hipolipemiantes observados en ratones en respuesta a la suplementación con biotina, se encontró un aumento en las concentraciones de GMPc en hígado y en la forma activa de la proteína AMPK, una enzima clave en el balance energético que inhibe vías anabólicas tales como la lipogénesis.

Dado que el uso de un modelo *in vivo* presenta dificultades para demostrar si la fosforilación de AMPK en respuesta a la suplementación con biotina es resultado de la acción directa de la vitamina en el hígado o depende de la intervención de otros tejidos para generarla, este proyecto se planteó usar células en cultivo para discernir entre ambas posibilidades.

Los resultados obtenidos mostraron que la incubación con biotina en el cultivo primario de hepatocitos así como en células HepG2 no resultó en cambios en la fosforilación de

AMPK. Tampoco se encontraron cambios en la forma activa de la proteína en respuesta al tratamiento con 8-Bromo-GMPc. Una explicación a la falta de cambios podría ser la existencia de una insensibilidad a la acción de la biotina en esta línea celular, aún cuando consideramos que es poco probable ya que existen otros estudios que describen efectos en respuesta a la incubación con la vitamina <sup>14,15,47,91</sup> y con 8-Bromo-GMPc <sup>47,91</sup> a las mismas concentraciones que las usadas en este trabajo. Sin embargo, no podemos descartar por completo esta posibilidad debido a que carecemos de mediciones de moléculas blanco de los compuestos analizados que nos permitan confirmar la acción de los compuestos a las concentraciones empleadas en estas células.

Otra posibilidad puede estar dada por una diferencia en los tiempos de exposición a la vitamina, pues en el estudio realizado en ratones, la suplementación con biotina se llevó a cabo por 8 semanas mientras que en este estudio debido a la limitación que presentan los cultivos, el tratamiento de mayor duración fue de una semana. Una tercera posibilidad es el requerimiento de factores que no se encuentran en las condiciones *in vitro* de nuestro experimento y que podrían estar presentes en el modelo *in vivo* que dio origen a este trabajo; el glucagon podría ser este factor.

Datos no publicados de nuestro laboratorio muestran un incremento en la síntesis y secreción de glucagon en respuesta a la suplementación con biotina; adicionalmente, existen trabajos que han reportado que en hígado y adipocitos de ratón, AMPK es activada en respuesta a glucagon <sup>80-84</sup> y que esto resulta en la inhibición de la lipogénesis <sup>84</sup> y la síntesis de proteínas <sup>80</sup>, es por ello que nos propusimos analizar la abundancia de p-AMPK<sup>T172</sup> en presencia de la hormona como posible mecanismo indirecto que pudiera explicar los resultados previamente observados en el hígado de ratón.

La incubación de las células HepG2 con glucagon no generó ningún cambio sobre la fosforilación de AMPK. Las diferencias entre los resultados descritos en la literatura y lo que nosotros observamos pueden deberse a variaciones entre especies debido a que los reportes existentes emplearon células y tejidos murinos <sup>80-84</sup>, mientras que la línea celular HepG2 es proveniente de humano. Por otro lado, las diferencias entre los tiempos de tratamiento empleados podrían generar variaciones en los niveles de fosforilación de AMPK en la treonina 172; Djouder <sup>87</sup> reportó que dependiendo de la duración de la estimulación de la proteína PKA por acción isoproterenol, un agonista de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, el estímulo puede resultar tanto en una inhibición de AMPK a tiempos cortos, como en una activación en respuesta a tiempos prolongados. Teniendo en cuenta

estos antecedentes, sería interesante analizar el efecto de glucagon a diferentes tiempos de exposición sobre la activación de AMPK en células HepG2.

Con el propósito de probar si la ausencia de cambios en la fosforilación de AMPK en presencia de glucagon es debido a una falta de sensibilidad a esta hormona en las células HepG2, decidimos tratar adipocitos diferenciados de la línea celular 3T3-L1 con glucagon, ya que previamente el grupo de Birnbaum<sup>85</sup> observó un incremento en la fosforilación de AMPK con este modelo experimental. Sorpresivamente no pudimos reproducir los resultados reportados pues no encontramos cambios en la abundancia de la proteína fosforilada; estas discrepancias podrían deberse a variaciones en el subtipo de la línea celular ya que nuestras células requieren suero fetal bovino para su crecimiento mientras que las del estudio mencionado dependen de la presencia de suero de ternera. Otra posibilidad es que se deba a la concentración de glucosa empleada, ya que en el artículo referido no se especifican las concentraciones de ésta presente en el medio. En el futuro sería interesante analizar el efecto del glucagon en combinación con diferentes concentraciones de glucosa para determinar si la acción de esta hormona sobre AMPK varía dependiendo las condiciones energéticas en las que se encuentren las células.

## 9. CONCLUSIONES

En conclusión, los resultados observados en el presente proyecto indican que el efecto de la biotina sobre la fosforilación de AMPK en hígado no está mediado por la acción directa de la vitamina sobre este tejido, ni como consecuencia de la señalización por GMPc sino que depende de la presencia de factores desencadenados *in vivo*. Entre los agentes posibles, el glucagon no parece ser el responsable de la activación de AMPK sin embargo, es necesario realizar más experimentos que permitan ahondar en la relevancia de esta hormona u otras moléculas sobre la activación de AMPK en respuesta a la suplementación con biotina.

## 10. PERSPECTIVAS

Analizar el patrón de fosforilación de AMPK en células HepG2 en respuesta a la exposición de glucagon a diferentes tiempos.

Analizar la abundancia de p-AMPK<sup>T172</sup> en respuesta a la incubación con suero obtenido de ratones que consumieron dieta suplementada con biotina.

## 11. REFERENCIAS

1. Boas, M. A. The Effect of Desiccation upon the Nutritive Properties of Egg-white. *Biochem. J.* **21**, 712–724.1 (1927).
2. Mock, D. M. in *Modern Nutrition in Health and Disease* (eds. Shils, M. E., Shike, M., Ross, C. A., Caballero, B. & Cousins, R. J.) 498–506 (Lippincott Williams & Wilkins, 2006).
3. Combs, G. F. in *The Vitamins* 325–338 (Elsevier, 2012). doi:doi:10.1016/B978-0-12-381980-2.00014-1
4. Du Vigneaud, V. THE STRUCTURE OF BIOTIN. *Science* **96**, 455–61 (1942).
5. Hamid M., S. in *Water Soluble Vitamins* (ed. Stranger, O.) 1–19 (Springer Netherlands, 2012). doi:10.1007/978-94-007-2199-9
6. Medicine, I. of. in *Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline* 374–389 (National Academies Press (US), 1998). at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK114310/>>
7. McMahon, R. J. Biotin in metabolism and molecular biology. *Annu. Rev. Nutr.* **22**, 221–239 (2002).
8. Nelson, D. L. & Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. (W. H. Freeman, 2008). at <<https://books.google.com/books?id=5Ek9J4p3NfkC&pgis=1>>
9. Dakshinamurti, K. & Cheah-Tan, C. Biotin-mediated synthesis of hepatic glucokinase in the rat. *Arch. Biochem. Biophys.* **127**, 17–21 (1968).
10. Spence, J. T. & Koudelka, a. P. Effects of biotin upon the intracellular level of cGMP and the activity of glucokinase in cultured rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **259**, 6393–6396 (1984).
11. Chauhan, J. & Dakshinamurti, K. Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats. *J. Biol. Chem.* **266**, 10035–10038 (1991).
12. Wiedmann, S., Rodriguez-Melendez, R., Ortega-Cuellar, D. & Zempleni, J. Clusters of biotin-responsive genes in human peripheral blood mononuclear cells. *J. Nutr. Biochem.* **15**, 433–439 (2004).
13. Rodriguez-Melendez, R., Griffin, J. B. & Zempleni, J. The expression of genes encoding ribosomal subunits and eukaryotic translation initiation factor 5A depends on biotin and bisnorbiotin in HepG2 cells. *J. Nutr. Biochem.* **17**, 23–30 (2006).
14. Collins, J. C., Paietta, E., Green, R., Morell, a. G. & Stockert, R. J. Biotin-dependent expression of the asialoglycoprotein receptor in HepG2. *J. Biol. Chem.* **263**, 11280–11283 (1988).

15. Rodriguez-melendez, R., Griffin, J. B., Sarath, G. & Zempleni, J. High-Throughput Immunoblotting Identifies Biotin-Dependent Signaling Proteins in HepG2 Hepatocarcinoma Cells. *J. Nutr.* **135**, 1659–1666 (2005).
16. Rodriguez-Melendez, R., Lewis, B., McMahon, R. J. & Zempleni, J. Diaminobiotin and desthiobiotin have biotin-like activities in Jurkat cells. *J. Nutr.* **133**, 1259–1264 (2003).
17. Sugita, Y., Shirakawa, H., Sugimoto, R., Furukawa, Y. & Komai, M. Effect of biotin treatment on hepatic gene expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**, 1290–1298 (2008).
18. Zhang, H., Osada, K., Sone, H. & Furukawa, Y. Biotin Administration Improves the Impaired Glucose Tolerance of Streptozotocin-Induced Diabetic Wistar Rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. **43**, 271–280 (1997).
19. Romero-Navarro, G. *et al.* Biotin Regulation of Pancreatic Glucokinase and Insulin in Primary Cultured Rat Islets and in Biotin- Deficient Rats. *Endocrinology* **140**, 4595–4600 (1999).
20. Dakshinamurti, K., Tarrago-Litvak, L. & Hong, H. C. Biotin and glucose metabolism. *Can. J. Biochem.* **48**, 493–500 (1970).
21. Vilches-Flores, A., Tovar, A. R., Marin-Hernandez, A., Rojas-Ochoa, A. & Fernandez-Mejia, C. Biotin increases glucokinase expression via soluble guanylate cyclase/protein kinase G, adenosine triphosphate production and autocrine action of insulin in pancreatic rat islets. *J. Nutr. Biochem.* **21**, 606–12 (2010).
22. Dakshinamurti, K. & Li, W. Transcriptional regulation of liver phosphoenolpyruvate carboxykinase by biotin in diabetic rats. *Mol. Cell. Biochem.* **132**, 127–132 (1994).
23. Coggeshall, J. C., Heggors, J. P., Robson, M. C. & Baker, H. Biotin Status and Plasma Glucose in Diabetics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **447**, 389–392 (1985).
24. Maebashi, M. *et al.* Therapeutic Evaluation of the Effect of Biotin on Hyperglycemia in Patients with Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **14**, 211–218 (1993).
25. Zhang, H. *et al.* A high biotin diet improves the impaired glucose tolerance of long-term spontaneously hyperglycemic rats with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. **42**, 517–526 (1996).
26. Reddi, A., DeAngelis, B., Frank, O., Lasker, N. & Baker, H. Biotin supplementation improves glucose and insulin tolerances in genetically diabetic KK mice. *Life Sci.* **42**, 1323–30 (1988).
27. Sone, H. *et al.* Biotin enhances glucose-stimulated insulin secretion in the isolated perfused pancreas of the rat. *J. Nutr. Biochem.* 237–243 (1999).

28. Sone, H. *et al.* Characteristics of the biotin enhancement of glucose-induced insulin release in pancreatic islets of the rat. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 550–554 (2000).
29. Lazo de la Vega-Monroy, M. L., Larrieta, E., German, M. S., Baez-Saldana, a. & Fernandez-Mejia, C. Effects of biotin supplementation in the diet on insulin secretion, islet gene expression, glucose homeostasis and beta-cell proportion. *J. Nutr. Biochem.* **24**, 169–177 (2013).
30. 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.* **60**, 182–5 (2006).
31. Geohas, J., Daly, A., Juturu, V., Finch, M. & Komorowski, J. R. Chromium picolinate and biotin combination reduces atherogenic index of plasma in patients with type 2 diabetes mellitus: a placebo-controlled, double-blinded, randomized clinical trial. *Am. J. Med. Sci.* **333**, 145–153 (2007).
32. 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. Cardiometab. Syndr.* **2**, 91–97 (2007).
33. 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.* **28**, 195–198 (2013).
34. Suchy, S. F., Rizzo, W. B. & Wolf, B. Effect of biotin deficiency and supplementation on lipid metabolism in rats, saturated fatty acids. *Am. J. Clin. Nutr.* **44**, 475–480 (1986).
35. Larrieta, E. *et al.* Pharmacological concentrations of biotin reduce serum triglycerides and the expression of lipogenic genes. *Eur. J. Pharmacol.* **644**, 263–8 (2010).
36. Aguilera-Méndez, A. & Fernández-Mejía, C. The hypotriglyceridemic effect of biotin supplementation involves increased levels of cGMP and AMPK activation. *Biofactors* **38**, 387–94 (2012).
37. Hymes, J. & Wolf, B. Human biotinidase isn't just for recycling biotin. *J. Nutr.* **129**, 485S–489S (1999).
38. Hymes, J., Fleischhauer, K. & Wolf, B. Biotinylation of histones by human serum biotinidase: assessment of biotinyl-transferase activity in sera from normal individuals and children with biotinidase deficiency. *Biochem. Mol. Med.* **56**, 76–83 (1995).
39. Rodriguez-Melendez, R. & Zemleni, J. Regulation of gene expression by biotin (review). *J. Nutr. Biochem.* **14**, 680–690 (2003).

40. Zempleni, J. Uptake, localization, and noncarboxylase roles of biotin. *Annu. Rev. Nutr.* **25**, 175–196 (2005).
41. Stanley, J. S., Griffin, J. B. & Zempleni, J. Biotinylation of histones in human cells. Effects of cell proliferation. *Eur. J. Biochem.* **268**, 5424–5429 (2001).
42. Peters, D. M., Griffin, J. B., Stanley, J. S., Beck, M. M. & Zempleni, J. Exposure to UV light causes increased biotinylation of histones in Jurkat cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **283**, C878–C884 (2002).
43. Bailey, L. M., Ivanov, R. a., Wallace, J. C. & Polyak, S. W. Artfactual detection of biotin on histones by streptavidin. *Anal. Biochem.* **373**, 71–77 (2008).
44. Healy, S. *et al.* Biotin is not a natural histone modification. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1789**, 719–733 (2009).
45. Vesely, D. L. Biotin enhances guanylate cyclase activity. *Science* **216**, 1329–30 (1982).
46. De La Vega, L. a & Stockert, R. J. Regulation of the insulin and asialoglycoprotein receptors via cGMP-dependent protein kinase. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **279**, C2037–C2042 (2000).
47. Solórzano-Vargas, R. S., Pacheco-Alvarez, D. & León-Del-Río, 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. U. S. A.* **99**, 5325–5330 (2002).
48. Boone-Villa, D., Aguilera-Méndez, A., Miranda-Cervantes, A. & Fernandez-Mejia, C. Effects of Biotin Supplementation in the Diet on Adipose Tissue cGMP Concentrations, AMPK Activation, Lipolysis, and Serum-Free Fatty Acid Levels. *J. Med. Food* (2015). doi:10.1089/jmf.2014.0170
49. Viollet, B. *et al.* AMP-activated protein kinase in the regulation of hepatic energy metabolism: From physiology to therapeutic perspectives. *Acta Physiol.* **196**, 81–98 (2009).
50. Hardie, D. G., Ross, F. a. & Hawley, S. a. AMP-activated protein kinase: A target for drugs both ancient and modern. *Chem. Biol.* **19**, 1222–1236 (2012).
51. Shirwany, N. A. & Zou, M.-H. AMPK: a cellular metabolic and redox sensor. A minireview. *Front. Biosci.* **19**, 447–474 (2014).
52. Hardie, D. G., Ross, F. a. & Hawley, S. a. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 251–262 (2012).
53. Carling, D., Mayer, F. V, Sanders, M. J. & Gamblin, S. J. AMP-activated protein kinase: nature's energy sensor. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 512–518 (2011).

54. Hardie, D. G. AMP-Activated Protein Kinase: Maintaining Energy Homeostasis at the Cellular and Whole-Body Levels. *Annu. Rev. Nutr.* **34**, 31–55 (2014).
55. Pehmøller, C. *et al.* Genetic disruption of AMPK signaling abolishes both contraction- and insulin-stimulated TBC1D1 phosphorylation and 14-3-3 binding in mouse skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **297**, E665–E675 (2009).
56. Barnes, K. *et al.* Activation of GLUT1 by metabolic and osmotic stress: potential involvement of AMP-activated protein kinase (AMPK). *J. Cell Sci.* **115**, 2433–2442 (2002).
57. Jørgensen, S. B. *et al.* The alpha2-5"AMP-activated protein kinase is a site 2 glycogen synthase kinase in skeletal muscle and is responsive to glucose loading. *Diabetes* **53**, 3074–3081 (2004).
58. Bultot, L. *et al.* AMP-activated protein kinase phosphorylates and inactivates liver glycogen synthase. *Biochem. J.* **443**, 193–203 (2012).
59. Marsin, a. S. *et al.* Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Curr. Biol.* **10**, 1247–1255 (2000).
60. Koo, S.-H. *et al.* The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. *Nature* **437**, 1109–1111 (2005).
61. Kawaguchi, T., Osatomi, K., Yamashita, H., Kabashima, T. & Uyeda, K. Mechanism for fatty acid „sparing” effect on glucose-induced transcription: Regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **277**, 3829–3835 (2002).
62. Habets, D. D. J. *et al.* Crucial role for LKB1 to AMPK $\alpha$ 2 axis in the regulation of CD36-mediated long-chain fatty acid uptake into cardiomyocytes. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1791**, 212–219 (2009).
63. Merrill, G. F., Kurth, E. J., Hardie, D. G. & Winder, W. W. AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. *Am. J. Physiol.* **273**, E1107–E1112 (1997).
64. Li, Y. *et al.* AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. *Cell Metab.* **13**, 376–388 (2011).
65. Muoio, D. M., Seefeld, K., Witters, L. a & Coleman, R. a. AMP-activated kinase reciprocally regulates triacylglycerol synthesis and fatty acid oxidation in liver and muscle: evidence that sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase is a novel target. *Biochem. J.* **338** ( Pt 3, 783–791 (1999).
66. Daval, M. *et al.* Anti-lipolytic action of AMP-activated protein kinase in rodent adipocytes. *J. Biol. Chem.* **280**, 25250–25257 (2005).

67. Carling, D., Clarke, P. R., Zammit, V. a. & Hardie, D. G. Purification and characterization of the AMP-activated protein kinase. Copurification of acetyl-CoA carboxylase kinase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase activities. *Eur. J. Biochem.* **186**, 129–136 (1989).
68. Browne, G. J., Finn, S. G. & Proud, C. G. Stimulation of the AMP-activated Protein Kinase Leads to Activation of Eukaryotic Elongation Factor 2 Kinase and to Its Phosphorylation at a Novel Site, Serine 398. *J. Biol. Chem.* **279**, 12220–12231 (2004).
69. Hoppe, S. *et al.* AMP-activated protein kinase adapts rRNA synthesis to cellular energy supply. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 17781–17786 (2009).
70. Inoki, K., Zhu, T. & Guan, K.-L. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* **115**, 577–590 (2003).
71. Gwinn, D. M. *et al.* AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint. *Mol. Cell* **30**, 214–226 (2008).
72. Jäger, S., Handschin, C., St-Pierre, J. & Spiegelman, B. M. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 12017–12022 (2007).
73. Egan, D. F. *et al.* Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science (80-. )*. **331**, 456–461 (2011).
74. Lira, V. a *et al.* Nitric oxide increases GLUT4 expression and regulates AMPK signaling in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **293**, E1062–E1068 (2007).
75. Deshmukh, a S. *et al.* Nitric oxide increases cyclic GMP levels, AMP-activated protein kinase (AMPK)alpha1-specific activity and glucose transport in human skeletal muscle. *Diabetologia* **53**, 1142–50 (2010).
76. De Castro Barbosa, T., Jiang, L. Q., Zierath, J. R. & Nunes, M. T. L-Arginine enhances glucose and lipid metabolism in rat L6 myotubes via the NO/ c-GMP pathway. *Metabolism.* **62**, 79–89 (2013).
77. Zhang, J. *et al.* Identification of nitric oxide as an endogenous activator of the AMP-activated protein kinase in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **283**, 27452–27461 (2008).
78. An, Z. *et al.* A soluble guanylate cyclase-dependent mechanism is involved in the regulation of net hepatic glucose uptake by nitric oxide in vivo. *Diabetes* **59**, 2999–3007 (2010).
79. Ramnanan, C. J., McMullen, D. C., Groom, A. G. & Storey, K. B. The regulation of AMPK signaling in a natural state of profound metabolic rate depression. *Mol. Cell. Biochem.* **335**, 91–105 (2010).

80. Kimball, S. R., Siegfried, B. a. & Jefferson, L. S. Glucagon represses signaling through the mammalian target of rapamycin in rat liver by activating AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **279**, 54103–54109 (2004).
81. Berglund, E. D. *et al.* Glucagon and lipid interactions in the regulation of hepatic AMPK signaling and expression of PPARalpha and FGF21 transcripts in vivo. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **299**, E607–E614 (2010).
82. Berglund, E. D. *et al.* Hepatic energy state is regulated by glucagon receptor signaling in mice. *J. Clin. Invest.* **119**, 2412–22 (2009).
83. Longuet, C. *et al.* The Glucagon Receptor Is Required for the Adaptive Metabolic Response to Fasting. *Cell Metab.* **8**, 359–371 (2008).
84. Peng, I.-C. *et al.* Glucagon regulates ACC activity in adipocytes through the CAMKK /AMPK pathway. *AJP Endocrinol. Metab.* **302**, E1560–E1568 (2012).
85. Yin, W., Mu, J. & Birnbaum, M. J. Role of AMP-activated Protein Kinase in Cyclic AMP-dependent Lipolysis in 3T3-L1 Adipocytes. *J. Biol. Chem.* **278**, 43074–43080 (2003).
86. Aw, D. K. L., Sinha, R. a., Xie, S. Y. & Yen, P. M. Differential AMPK phosphorylation by glucagon and metformin regulates insulin signaling in human hepatic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **447**, 569–573 (2014).
87. Djouder, N. *et al.* PKA phosphorylates and inactivates AMPKalpha to promote efficient lipolysis. *EMBO J.* **29**, 469–481 (2010).
88. Fernandez-Mejia, C. & Lazo-de-la-Vega-Monroy, M.-L. Biological Effects of Pharmacological Concentrations of Biotin. *J. Evid. Based. Complementary Altern. Med.* **16**, 40–48 (2011).
89. Levert, K. L., Waldrop, G. L. & Stephens, J. M. A biotin analog inhibits acetyl-CoA carboxylase activity and adipogenesis. *J. Biol. Chem.* **277**, 16347–16350 (2002).
90. Stockert, R. J. & Morell, a. G. Second messenger modulation of the asialoglycoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* **265**, 1841–1846 (1990).
91. Pacheco-Alvarez, D. *et al.* Biotin availability regulates expression of the sodium-dependent multivitamin transporter and the rate of biotin uptake in HepG2 cells. *Mol. Genet. Metab.* **85**, 301–307 (2005).