



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**“EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE BIOTINA EN LA DIETA SOBRE EL  
FACTOR TRANSCRIPCIONAL ChREBP”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Q.F.B. GUADALUPE HERMINIA VENTURA RAMÓN

TUTOR PRINCIPAL

DRA. MARÍA CRISTINA FERNÁNDEZ MEJÍA  
Instituto de Investigaciones Biomédicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Martha Alicia Menjívar Iraheta  
Departamento de Biología, Facultad de Química

Dr. Angel Zarain Herzberg  
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina

Ciudad de México, Marzo de 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis fue dirigida por:

**Dra. María Cristina Fernández Mejía**  
Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental  
Instituto de Investigaciones Biomédicas  
UNAM

Y con la asesoría de:

**Dra. Martha Alicia Menjivar Iraheta**  
Departamento de Biología  
Facultad de Química  
UNAM

**Dr. Angel Zarain Herzberg**  
Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina  
UNAM

Jurado de Examen de Grado

PRESIDENTE

**Dr. Armando Roberto Tovar Palacio**  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

VOCAL

**Dr. Samuel Canizales Quinteros**  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

VOCAL

**Dra. Verónica Guarner Lans**  
Instituto Nacional de Cardiología

VOCAL

**Dr. Horacio Reyes Vivas**  
Instituto Nacional de Pediatría

SECRETARIO

**Dr. Juan Miranda Ríos**  
Instituto Nacional de Pediatría

Este trabajo de tesis fue realizado en la Unidad de Genética de la Nutrición  
del Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM/ Instituto Nacional de Pediatría

El trabajo realizado para esta tesis fue posible gracias al apoyo de

Proyecto PAPIIT 214811

Fondos Federales 074/2013

y

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Proyecto 219787

CVU/becario: 453590/275680

## AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis, la **Dra. María Cristina Fernández Mejía**, por su invaluable dedicación, apoyo y tiempo proporcionado para la realización de este trabajo. Cada crítica, comentario o sugerencia permitieron el acrecentamiento de mi capacidad crítica y analítica en la resolución de problemas.

A mi comité tutorial, el **Dr. Angel Zarain Herzberg** y la **Dra. Martha Menjívar Hiraeta**, por sus valiosas observaciones y sugerencias que permitieron la dirección de este trabajo.

Al **Dr. Juan Miranda Ríos** por su incondicional apoyo sin importar la hora o el momento, por complementar las necesidades o esclarecer las dificultades en el desarrollo de este trabajo.

A la inigualable **Dra. Carolina Álvarez Delgado**, por su gran apoyo, confianza, orientación, por sus enseñanzas técnicas, teóricas y de la vida, por su gran corazón y respeto mostrado hacia los animales utilizados para la ciencia, por eso y muchas cosas más, ¡mil gracias, Caro!.

Al **M. en C. Alain de J. Hernández Vázquez**, por su apoyo técnico en la realización de esta tesis.

A mis compañeros y amigos **Jonathan, Rafael y Saray** por sus grandes aportaciones, comentarios y esclarecimientos de dudas, sobre todo en la cuestión de estadística, ¡gracias!.

A mis demás compañeros, amigos y casi hermanos, por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas, por todas las vivencias compartidas; sin ustedes no hubiese vivido una de las maravillosas experiencias de mi vida, la maestría; así que, **Marianita, Wilma, Lety, Ile, Esme, Erika, Edgar, Canúl, Brianda, Everardo y Adriana**, ¡muchas gracias!.

A **Clotilde**, por su gran apoyo en la parte técnica, así como su disposición de animarme en los momentos difíciles y de engrandecer al máximo mi autoestima.

A **mis padres**, que con su invaluable e incondicional apoyo, me permitió alcanzar una meta más en mi vida, viendo así, que todo el esfuerzo puesto y toda la lucha constante e incansable desde que era niña, no ha sido en vano, ¡gracias papás!, que Dios me permita conservarlos por muchos años más.

A mi hermanita **Imelda**, cuyo apoyo incondicional fue imprescindible para lograr esta meta.

Y por último, a un ser maravilloso e inteligente, que a pesar de ser muy pequeñito ofreció sin lugar a dudas la mejor compañía, sobre todo cuando el factor distancia dio como resultado una soledad y añoranza que fueron directamente proporcionales al tiempo transcurrido. Ese animalito fue mi ratona **PUFA**, exclusiva para el tiempo que duró mi estancia en la Cd. de México y un poquitito más para mi ciudad natal, Tepic de Nervo.

## DEDICATORIA

A **Dios** por nunca soltar mi mano y siempre acompañarme en cada paso que doy, ese que en ocasiones puede ser muy corto o muy inestable, pero que con su fortaleza aplana la vereda cuál iluminada ha sido elegida para mí.

A **mis padres**, quienes decidieron ponerme en este mundo del cual queda mucho por forjar.

## ÍNDICE

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>11</b>
<b>INDICE DE FIGURAS Y TABLAS .....</b>	<b>14</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>16</b>
<b>ABSTRACTS .....</b>	<b>18</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>20</b>
<b>1.1 Biotina.....</b>	<b>20</b>
<b>1.2 Requerimientos de biotina .....</b>	<b>21</b>
<b>1.3 Metabolismo de la biotina .....</b>	<b>21</b>
1.3.1 Digestión y absorción de la biotina .....	21
1.3.1.1 Absorción de biotina en los tejidos .....	22
1.3.1.2 Transporte de la biotina intracelular.....	23
<b>1.4 Funciones de la biotina .....</b>	<b>23</b>
<b>1.5 Catabolismo de la biotina .....</b>	<b>24</b>
<b>1.6 Efectos farmacológicos de la biotina.....</b>	<b>25</b>
1.6.1 Efecto de la biotina sobre la homeostasis de la glucosa y de los triglicéridos .....	25
1.6.2 Efecto de la biotina sobre la expresión de genes del metabolismo de carbohidratos .....	28
1.6.3 Efecto de la biotina sobre la expresión de genes del metabolismo de lípidos.....	28
<b>2. METABOLISMO DE LOS LÍPIDOS .....</b>	<b>29</b>

<b>2.1 Digestión de lípidos.....</b>	<b>29</b>
<b>2.2 Lipogénesis de novo .....</b>	<b>30</b>
<b>2.3 Regulación de la lipogénesis.....</b>	<b>32</b>
<b>2.4 Regulación transcripcional de la lipogénesis .....</b>	<b>33</b>
2.4.1 LXR $\alpha$ (Liver Receptor alpha).....	33
2.4.2 SREBP-1c (Sterol Responsive Element Binding Protein 1c)...	33
2.4.3 ChREBP (Carbohydrate Responsive Element Binding Protein) .....	34
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>38</b>
<b>4. HIPÓTESIS .....</b>	<b>38</b>
<b>5. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>38</b>
<b>6. OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>39</b>
<b>7. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>40</b>
7.1 Modelo animal.....	40
7.2 Curva de tolerancia a la glucosa.....	40
7.3 Inducción de la translocación del factor transcripcional ChREBP al núcleo .....	41
7.4 Fraccionamiento subcelular de hígado .....	41
7.5 Determinación de la concentración de proteínas por el método de Bradford.....	42
7.6 Western Blot.....	42

7.7 Análisis de la expresión del ARNm de ChREBP en el hígado .....	43
7.8 Determinación de glucosa-6-fosfato en el hígado .....	45
7.9 Análisis Estadístico .....	46
<b>8. RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
8.1 Efecto de la suplementación con biotina sobre el peso corporal y la ingesta de alimento .....	47
8.2 Efecto de la suplementación con biotina sobre la expresión del ARN mensajero del factor transcripcional ChREBP en extracto de hígado .....	48
8.3 Efecto de la suplementación con biotina sobre la expresión proteica del factor transcripcional ChREBP en extracto de hígado.....	49
8.4 Efecto de la suplementación con biotina sobre la expresión proteica del factor transcripcional ChREBP en fracción citoplásmica	50
8.5 Inducción de la translocación nuclear del factor transcripcional ChREBP por efecto del incremento de la glucosa intracelular .....	52
8.6 Efecto de la suplementación con biotina sobre la translocación del factor transcripcional ChREBP hacia el núcleo en respuesta a glucosa con respecto al tiempo.....	53
8.7 Efecto de la suplementación con biotina sobre la presencia del factor transcripcional ChREBP en el citoplasma en respuesta a glucosa con respecto al tiempo .....	54
8.8 Efecto de la suplementación con biotina sobre el curso temporal de las concentraciones de glucosa sanguínea .....	56

8.9 Efecto de la suplementación con biotina sobre la cantidad de glucosa-6-fosfato en hígado de ratón .....	58
9. DISCUSIÓN .....	59
10. CONCLUSIONES .....	63
11. PERSPECTIVAS.....	63
12. BIBLIOGRAFIA .....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACC	Acetil-CoA carboxilasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AMPK	Proteína cinasa activada por AMP
ANOVA	Análisis de varianza
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosina trifosfato
ChORE	Elemento de respuesta a carbohidratos
ChREBP	Proteína de unión a elementos de respuesta a carbohidratos
CoA	Coenzima A
Ct	Ciclo umbral
dL	Decilitros
dNTPs	Desoxidinucleótidos trifosfatos
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
EE	Error estándar
EGTA	Ácido etilenglicol-bis (aminoetileter)-N,N,N',N' tetraacético
FAS	Ácido graso sintasa
FOXO-1	Forkhead box O1
g	Gramos
<i>g</i>	Gravedad
G6P	Glucosa-6-fosfato
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
GMS	Módulo sensor de glucosa
GRACE	Elemento conservado de respuesta a glucosa

h	Horas
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Bicarbonato
HCS	Holocarboxilasa sintetasa
HEPES	Ácido N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-2-etanosulfónico
HNF	Factor nuclear del hepatocito
Hz	Hertz
IgG	Inmunoglobulina
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de potasio
KCl	Cloruro de potasio
Kg	Kilogramos
LID	Dominio inhibitorio para baja glucosa
LXR	Receptor X del hígado
M	Molar (mol/L)
MCC	Metilcrotonil-CoA carboxilasa
MCD	Malonil-CoA descarboxilasa
MCR	Región conservada Mondo
mg	Miligramos
mL	Mililitros
Mlx	Proteína como Max
mM	Milimolar
M-MVL-RT	Transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina Moloney
NaCl	Cloruro de sodio
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NES	Señal de exportación nuclear
ng	Nanogramos
NLS	Señal de localización nuclear
nm	Nanómetros
°C	Grados centígrados
PCC	Propionil-CoA carboxilasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

pH	Potencial de hidrógenos
pHH3	Fosfohistona H3
PK	Piruvato cinasa
PKA	Proteína cinasa A
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
RXR	Receptor retinoide X
SDC	Estearoil-CoA carboxilasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
seg	Segundo
SMVT	Transportador múltiple de vitamina dependiente de sodio
SREBP1c	Proteína de unión a elementos de respuesta a esteroides
TBS-T	Tris (hidroximetil) aminometano - Tween
TEMED	N,N,N',N' tetrametiletildiamina
V	Volts
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
X5P	Xilulosa-5-fosfato
%	Por ciento
µg	Microgramos
µL	Microlitros

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

### FIGURAS

**Figura 1.** Estructura de la biotina

**Figura 2.** Transporte y metabolismo de la biotina

**Figura 3.** Lipogénesis hepática *de novo*

**Figura 4.** Estructura de la proteína ChREBP

**Figura 5.** Curva de crecimiento de ratones de la cepa BALB/cAnN

**Figura 6.** Consumo de alimento control o suplementado con biotina en ratones de la cepa BALB/cAnN

**Figura 7.** Efecto de la suplementación con biotina sobre la expresión de ARNm del factor transcripcional ChREBP en extracto de hígado de ratón de la cepa BALB/cAnN

**Figura 8.** Efecto de la suplementación con biotina sobre la expresión proteica del factor transcripcional ChREBP en extracto de hígado de ratón de la cepa BALB/cAnN

**Figura 9.** Expresión proteica del factor transcripcional ChREBP en la fracción citoplásmica de hígado de ratón de la cepa BALB/cAnN

**Figura 10.** Presencia del factor transcripcional ChREBP en fracciones nucleares de hígado de ratón de la cepa BALB/cAnN

**Figura 11.** Efecto de la suplementación con biotina sobre la translocación del factor transcripcional ChREBP en respuesta a glucosa con respecto al tiempo

**Figura 12.** Efecto de la suplementación con biotina sobre la presencia del factor transcripcional ChREBP en fracciones citoplásmicas de hígado de ratón de la cepa BALB/cAnN

**Figura 13.** Determinación de glucosa sanguínea en un curso temporal después de la administración de glucosa intraperitoneal en ratones de la cepa BALB/cAnN

**Figura 14.** Efecto de la suplementación con biotina sobre la cantidad de glucosa-6-fosfato en hígado de ratón de la cepa BALB/cAnN

## TABLAS

**Tabla 1.** Distribución de frecuencias relativas (%) de las concentraciones de glucosa con respecto al tiempo después de la aplicación de glucosa intraperitoneal en ratones de la cepa BALB/cAnN

## RESUMEN

La biotina es una vitamina que actúa como grupo prostético de las carboxilasas. Se ha encontrado que en concentraciones entre 30 a 650 veces mayor a su requerimiento diario (30 µg) es capaz de modificar varias funciones biológicas, como la homeostasis de la glucosa y de los triglicéridos. En estudios previos en un modelo experimental de ratones normales, la administración durante ocho semanas de una dieta conteniendo 56 veces la cantidad de biotina presente en la dieta control disminuyó en el hígado la expresión del mensajero del factor transcripcional lipogénico SREBP-1c. En concordancia con este efecto la expresión de las enzimas ácido graso sintasa y acetil-CoA carboxilasa-1, genes cuya transcripción se encuentra regulada por SREBP-1c, disminuyeron proporcionalmente a la reducción observada en el factor transcripcional. Sin embargo, los ARNm de otras enzimas lipogénicas que se conocen están regulados por SREBP-1c como la glucocinasa hepática, de la esteroil-CoA desaturasa y de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, no mostraron cambios acordes a la disminución de SREBP-1c, lo que sugiere que otros factores transcripcionales que participan en la regulación de la lipogénesis como ChREBP, se encuentre participando en la compensación por la disminución de SREBP-1c. En este trabajo analizamos el efecto de la suplementación de biotina en la dieta sobre la expresión proteica y del ARNm de ChREBP, así como su localización nuclear y citoplásmica del factor transcripcional en respuesta a una carga de glucosa. También se analizó el contenido de glucosa-6-fosfato, metabolito que se ha sugerido como señal en su translocación hacia el núcleo. Ratones BALB/cAnN, machos recién destetados fueron alimentados con una dieta control o una dieta suplementada con concentraciones 56 veces el contenido de la dieta control durante 8 semanas, al final de este período los ratones se anestesiaron y se extrajo el hígado. Los resultados encontraron que la suplementación con biotina: a) no modificó la expresión del ARNm ni de la proteína del factor transcripcional ChREBP en condiciones de ayuno; b) tiende a aumentar la presencia de ChREBP en el núcleo tanto en el ayuno como inducido por glucosa, sin embargo, el análisis

estadístico no mostró diferencias significativas; c) disminuye significativamente la cantidad de glucosa-6-fosfato en el hígado de ratón. Los datos de este trabajo sugieren, pero no permiten concluir, que los efectos de la biotina sobre ChREBP  $\beta$  se encuentre compensando la disminución de SREBP-1c en la regulación de la transcripción de genes lipogénicos: glucocinasa, esteroil-CoA desaturasa y de la glucoa-6-fosfato deshidrogenasa. Sin embargo, es posible que otros factores transcripcionales o mecanismos que participan en la regulación de la lipogénesis, se encuentren también participando.

## ABSTRACTS

Biotin is a water-soluble vitamin that acts as a prosthetic group of carboxylases. Unrelated to this role, biotin at pharmacological concentrations, 30-650 times greater than its requirement of 30 micrograms per day, modifies several biological functions, such as glucose and triglyceride homeostasis. In previous studies we found that in normal mice the administration of a diet containing 56-fold more biotin than the control diet for eight weeks resulted in a decrease in the lipogenic transcriptional factor SREBP-1c mRNA in liver. Concomitantly, the expression of fatty acid synthase and acetyl-CoA carboxylase-1, whose transcription is regulated by SREBP-1c diminished in the same proportion as that of SREBP-1c. In contrast, the mRNA content of several other lipogenic enzymes that are regulated by SREBP-1c such as hepatic glucokinase, stearoyl-CoA desaturase and glucose-6-phosphate dehydrogenase, did not change under this condition, suggesting that other lipogenic transcription factors, such as ChREBP, might compensate for SREBP-1c decrease. In this work we investigated the effect of biotin supplementation in the diet on the mRNA and protein content of ChREBP, as well as on the nuclear and cytoplasmic ChREBP expression in response to glucose administration. In addition, the content of glucose-6-phosphate was determined, since this metabolite has been suggested to act as a signal for ChREBP nuclear translocation. Male BALB/cAnN mice were fed a control or a biotin-supplemented diet (56X) over 8 weeks post-weaning, at the end of this period, mice were anesthetised and the liver was extracted. Our findings show that biotin supplementation: a) Did not modify ChREBP's mRNA and protein expression in fasted conditions; b) ChREBP protein expression content in the nuclei in fasting or in glucose-treated animals showed a tendency to increase, although the difference was not statistically significant; c) glucose-6-phosphate content was significantly diminished. The data presented suggest, but does not allow concluding, that biotin effects on ChREBP- $\beta$  might compensate for the diminished expression of SREBP-1c on the transcription regulation of the lipogenic genes: glucokinase, stearoyl-CoA desaturase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. However, it is also possible

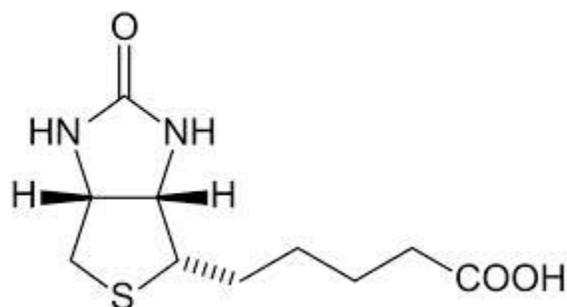
that other transcriptional factor(s) or mechanisms that participate in the regulation of lipogenesis, might also be participating.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Biotina

La biotina es una vitamina hidrosoluble del complejo B cuya función en el organismo es ser grupo prostético de las carboxilasas, enzimas que catalizan reacciones de carboxilación dentro del metabolismo intermediario. Los humanos y otros mamíferos no pueden sintetizar esta vitamina, de modo que deben obtenerla de la dieta y, en menor medida, de la síntesis *de novo* realizadas por las bacterias intestinales (McMahon 2002; Said 2012).

El nombre químico de la biotina es ácido hexahidro-2-oxo-1H-tieno-[3,4-d]imidazol-4-pentoico. La estructura química de la biotina consiste en un compuesto heterocíclico, con un anillo que contiene un grupo ureido (-N-CO-N-) y otro que contiene azufre formando el anillo de tetrahidrotiofeno y éste unido a una cadena lateral de ácido valérico (Figura 1). Es soluble en agua, insoluble en disolventes orgánicos y estable entre un rango de pH 5 a 8 (Mock 2006; Sarawut y Wallace 2003).



**Figura 1. Estructura de la Biotina**, compuesta por un anillo de imidazodilona y un anillo de tetrahidrotiofeno con una cadena lateral de ácido valérico.

Existen 8 posibles estereoisómeros de la molécula de biotina, pero solo el isómero D-biotina es biológicamente activo (Said, 2009).

Los humanos y otros mamíferos no pueden sintetizar la biotina, por lo que es necesario consumirla en la dieta diaria. La biotina está ampliamente distribuida en alimentos como hígado y riñones, yemas de huevo, algunos vegetales y leche de

vaca representando buenas fuentes para esta vitamina. Se encuentra en los alimentos principalmente unida al grupo  $\epsilon$ -amino de una lisina formando el dímero biocitina, péptidos biotinilados o en forma libre (Said 2009; Dakshinamurti y Chauhan 1994).

## **1.2 Requerimientos de biotina**

La dosis diaria recomendada de biotina no se encuentra claramente establecida debido a la incertidumbre de la contribución de la biotina sintetizada por las bacterias del intestino grueso, a la variabilidad en la evaluación de los niveles de biotina en el organismo y a la baja prevalencia de la deficiencia clínica de la biotina (Said 2012; Mock 2006). Sin embargo, se estima una ingesta diaria recomendada de biotina de 35  $\mu\text{g}$  para niños y mujeres en lactancia y 30  $\mu\text{g}$  para adultos y mujeres embarazadas (Food and Nutrition Board, 1998).

## **1.3 Metabolismo de la biotina**

### **1.3.1 Digestión y absorción de la biotina**

Una vez que la biotina se ingiere en la dieta, las proteínas unidas a la biotina son digeridas por peptidasas y proteasas hasta generar biocitina (biotinil-L-lisina) y péptidos pequeños unidos a biotina (Figura 2). Después la biotinidasa, una enzima presente en el jugo pancreático, rompe el enlace entre la biotina y la lisina, y la biotina libre se absorbe por los enterocitos de la porción distal del duodeno y la proximal del yeyuno. A pH fisiológico, el grupo carboxilo de la biotina se encuentra cargado negativamente, por lo que la biotina requiere de un transportador para cruzar las membranas plasmáticas. Este transportador es el SMVT (Transportador múltiple de vitaminas dependientes de sodio), que se encuentra en la porción apical de los enterocitos (Said 2012).

Una vez que la biotina cruza la membrana apical, su salida del enterocito también se da a través de un transportador pero independiente de sodio (Mock 2006).

### 1.3.1.1 Absorción de biotina en los tejidos

Después de absorberse en el intestino, la biotina pasa al plasma, en el cual se puede encontrar libre (81%), unida a proteínas de manera covalente (12%) o reversible (7%) (Mock y Malik 1992). La biotina se absorbe de la circulación por los órganos periféricos. La cantidad de biotina que se encuentra dentro de las células, ya sea en forma unida o libre, depende del balance entre su absorción, su liberación de apocarboxilasas, su incorporación a las mismas, su liberación de proteínas biotiniladas y su catabolismo (Mock 2006) (Figura 2). La biotina en el hígado se encuentra principalmente en la mitocondria y en el citoplasma, mientras que solo el 0.7% se encuentra en el núcleo (Zempleni 2005).

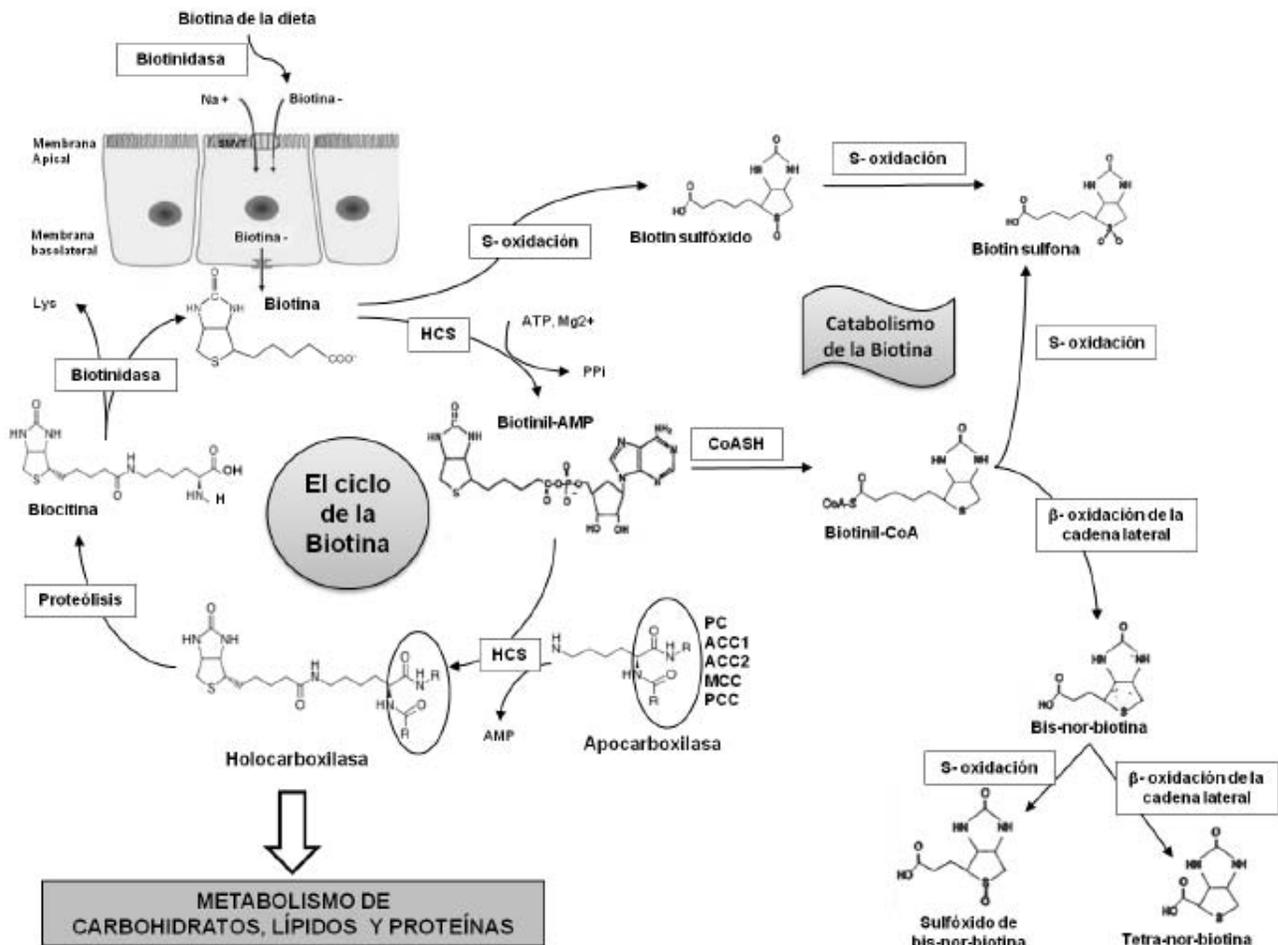


Figura 2. Transporte y metabolismo de la biotina.

El hígado es el órgano que absorbe la mayor cantidad de biotina para su metabolismo y utilización, y lo realiza a través del transportador múltiple de vitaminas dependiente de sodio (SMTV). Este mecanismo de transporte dependiente de sodio, similar al que se encuentra en los enterocitos, también está presente en otros tejidos como riñón, cerebro, corazón y placenta (Said 2012).

### **1.3.1.2 Transporte de la biotina intracelular**

Parte de la biotina libre que se internaliza hacia la célula requiere transportarse hacia la mitocondria, donde realizan sus funciones tres carboxilasas. El mecanismo de transporte de biotina hacia la mitocondria se estudió utilizando mitocondrias aisladas de hepatocitos, y se sugirió que es dependiente de pH. Se cree que la biotina entra al espacio intramitocondrial en su forma protonada (neutra), para posteriormente disociarse en su forma aniónica ( $pK_a = 4.5$ ) en el pH alcalino de la mitocondria, con lo cual queda atrapada dentro de la ella (Said 2012).

## **1.4 Funciones de la biotina**

En los mamíferos la biotina actúa como cofactor de cuatro carboxilasas que participan en el metabolismo intermediario. Estas carboxilasas dependientes de biotina son: piruvato carboxilasa (PC, EC 6.4.1.1), la cual convierte piruvato a oxalacetato, siendo crítica en la gluconeogénesis y en las reacciones anapleróticas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos; propionil-CoA carboxilasa (PCC, EC 6.6.1.3), quien cataliza los pasos esenciales en el metabolismo de aminoácidos, colesterol y ácidos grasos de cadena impar;  $\beta$ -metilcrotonil-CoA carboxilasa (MCC, EC 6.4.1.4), que participa en el metabolismo de la leucina; y acetil-CoA carboxilasa (ACC, EC 6.4.1.2) existiendo dos formas genéticamente distintas, la ACC1 que se localiza en el citosol y cataliza la unión de bicarbonato a acetil-CoA generando malonil-CoA para la síntesis de ácidos grasos y la ACC2 que se encuentra en la mitocondria y participa en la regulación de la oxidación de los ácidos grasos. Estas enzimas catalizan la incorporación de bicarbonato, en

forma de un grupo carboxilo, a sus respectivos sustratos (Mock 2006; Zemleni *et al.* 2009; Shriver *et al.*, 1993).

La biotina se une a las carboxilasas inactivas (apocarboxilasas) mediante una reacción de condensación dependiente de ATP, catalizada por la enzima holocarboxilasa sintetasa (HCS, EC 6.3.4.10). Primero, se forma un intermediario de biotina y ATP, el biotinil-5'-adenilato. Posteriormente, el grupo carboxilo de la cadena de ácido valérico de la biotina y el grupo  $\epsilon$ -amino de una lisina en una región específica de la apocarboxilasa forman un enlace covalente. Estas regiones de las apocarboxilasas contienen residuos de aminoácidos altamente conservados entre especies. Una vez unida a la biotina, las holocarboxilasas son capaces de formar un intermediario carboxifosfatos en presencia de  $\text{HCO}_3^-$  y ATP, para de esta forma trasladar el  $\text{CO}_2$  de la biotinil al sustrato (Said 2012; Mock 2006; Zemleni *et al.* 2009).

La biotina unida a las holocarboxilasas se libera en forma de biocitina por degradación proteolítica de las holocarboxilasas. Esta biocitina puede ser reutilizada por otras carboxilasas, o catalizarse hacia biotin sulfóxido o a bisnorbiotina y posteriormente excretarse en orina (Said 2012; Mock 2006; Zemleni *et al.* 2009).

### **1.5 Catabolismo de la biotina**

En el organismo, el catabolismo de la biotina ocurre con baja frecuencia. Una parte de biotina libre se oxida, produciendo biotin sulfóxidos D y L, pero el anillo ureido no se degrada. La oxidación del sulfuro en la molécula de biotina ocurre en el retículo endoplásmico liso en una reacción que depende de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) La cadena lateral del ácido valérico se metaboliza vía mitocondrial por  $\beta$ -oxidación produciendo bisnorbiotina y sus productos de degradación, bisnorbiotin sulfóxido y tetranorbiotina. Después de la degradación de biotina a tetranorbiotina, los microorganismos rompen y degradan el anillo heterocíclico (Mock 2006; Zemleni *et al.*, 2009).

La biotina se excreta principalmente a través de la orina. Aproximadamente el 95% de la biotina de una dosis de 5mg/Kg es excretada en la orina de 24 h. La biotina que no es absorbida va a las heces. Sin embargo, la mayoría de la biotina fecal es de origen microbiano, ya que las bacterias del intestino producen biotina y ésta también puede ser absorbida por el organismo. Debido a esta fuente bacteriana de biotina, la excreción urinaria puede llegar a exceder a la ingesta de biotina, particularmente en casos de suplementación con biotina para el tratamiento de deficiencias de esta vitamina (Combs, 1992).

## **1.6 Efectos farmacológicos de la biotina**

Independientemente de su papel como grupo prostético de carboxilasas, se observó que concentraciones farmacológicas de biotina son capaces de modificar la expresión génica (Rodríguez-Melendez 2003; Fernández-Mejía 2005 y 2011). También se observó que posee diversos efectos sobre procesos sistémicos como la reproducción (Baez-Saldana 2009; Simmins 1983), el desarrollo (Watanabe 1996) y el metabolismo (Fernández-Mejía 2005, 2010, Vilches-Flores 2005).

### **1.6.1 Efecto de la biotina sobre la homeostasis de la glucosa y de los triglicéridos**

Diversos estudios encontraron que la administración de biotina a concentraciones farmacológicas modifica la homeostasis de estos metabolitos. Estudios en pacientes diabéticos (Coggeshall *et al.*, 1985; Maebashi *et al.*, 1993; Koutsikos *et al.*, 1996) y en modelos experimentales de animales con resistencia a la insulina y diabetes (Zhan *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1997; Reddi *et al.*, 1988) se encontraron que la administración de biotina reduce la hiperglucemia. Estudios clínicos de pacientes con diabetes tipo 1 sin complicaciones clínicas a los cuales se suplementó con 16 mg/día de biotina durante una semana, suspendiendo la administración de insulina exógena, se observó una disminución de la glucosa en ayuno (Coggeshall *et al.*, 1985). En otro estudio con pacientes japoneses con diabetes tipo 2, la administración oral de 9 mg/día de biotina durante un mes disminuyó las concentraciones de glucosa en ayuno (Maebashi *et al.*, 1993). En

pacientes de hemodiálisis, una dosis de 50 mg/día de biotina por 2 meses mejoró la tolerancia a la glucosa (Koutsikos *et al.*, 1996).

La suplementación con biotina también disminuye la hiperglucemia en modelos de animales de diabetes. En ratones de la cepa KK, un modelo animal de diabetes tipo 2 moderada, el tratamiento con biotina por día (2 y 4 mg/Kg de peso) durante 10 semanas disminuyó la glucosa post-prandial mejorando la tolerancia a la glucosa (Reddi *et al.*, 1988). Otro estudio con ratas Wistar con diabetes inducida con estreptozotocina se encontró que la tolerancia a la glucosa mejoró con un tratamiento de 800 µg/Kg de peso/día de biotina durante 15 días (Zhang *et al.*, 1997). Efectos similares se observaron en las ratas OLETF, una cepa que desarrolla características de diabetes tipo 2, con las cuales una suplementación con biotina (7.44 mg/Kg de alimento) durante 9 semanas también mejoró la tolerancia a la glucosa (Zhang *et al.*, 1996). También en modelos de ratas con diabetes tipo 2 las cuales fueron suplementadas con biotina (300 µg/Kg de peso por día) y picolinato de cromo (80 µg/Kg de peso por día) y alimentadas con una dieta alta en grasa se encontró una disminución en la glucosa sanguínea (Sahin *et al.*, 2013).

Igualmente, se observó que la administración de biotina reduce las concentraciones sanguíneas de lípidos, tanto en investigaciones clínicas (Marshall *et al.* 1980; Dokusova y Krivoruchenko, 1972; Baez *et al.*, 2004; Revilla *et al.*, 2006) como en animales de experimentación (Marshall *et al.*, 1969 y 1976; Dokusova *et al.*, 1967; Larrieta *et al.*, 2010). En estudios con humanos se observó que la biotina modificó la hiperlipidemia. En voluntarios sanos la administración de 0.9 mg/día de biotina durante 4 semanas produjo modificaciones en los niveles de lípidos plasmáticos, los cuales variaron dependiendo del tiempo de administración, encontrándose que durante las primeras dos semanas se incrementaron las concentraciones de lípidos totales, fosfolípidos y lipoproteínas alfa y beta. Posterior a este período, se observó una disminución en las concentraciones de lípidos y estas variaciones fueron mayores en los individuos que presentaron hiperlipidemia (Marshall *et al.*, 1980). En pacientes con aterosclerosis e

hipercolesterolemia, la administración de 5 mg de biotina durante 4 semanas produjo disminuciones en las concentraciones sanguíneas de colesterol total (Dokusova y Krivoruchenko, 1972). Otro estudio en pacientes con diabetes tipo 1, la administración oral de 40 mg de biotina/Kg de peso durante 3 meses produjo disminuciones en las concentraciones sanguíneas de glucosa, colesterol total, lipoproteínas de baja densidad y triglicéridos (Hemmati *et al.*, 2013). En nuestro laboratorio encontramos que el tratamiento con 5 mg de biotina tres veces al día en pacientes con hipertrigliceridemia con o sin diabetes, disminuyó las concentraciones de triglicéridos plasmáticos (Baez *et al.*, 2004; Revilla *et al.*, 2006). Actualmente se cuentan con suplementos comerciales que contienen concentraciones farmacológicas de biotina utilizados en el tratamiento de la diabetes que reducen el índice aterogénico y la hipertrigliceridemia (Geohas *et al.*, 2007; Albarracin *et al.*, 2005).

En estudios con animales de experimentación también se encontró que la biotina modificó la hiperlipidemia. En la cepa con ratas BHE con predisposición genética para desarrollar elevadas concentraciones sanguíneas de glucosa y de lípidos (Marshall *et al.*, 1969), el tratamiento con biotina disminuyó las concentraciones de lípidos séricos (Marshall *et al.*, 1976). Otros estudios encontraron que la biotina previno el desarrollo experimental de aterosclerosis en conejos (Dokusova *et al.*, 1967). En modelos de ratas con diabetes tipo 2 las cuales fueron suplementadas con biotina (300 µg/Kg de peso por día) y picolinato de cromo (80 µg/Kg de peso por día) y alimentadas con una dieta alta en grasa se encontró una disminución en las concentraciones de colesterol total y ácidos grasos (Sahin *et al.*, 2013).

Estudios en nuestro laboratorio demostraron que la administración a ratones de la cepa Balb/cAnN de una dieta de 13.5 mg de biotina/Kg de peso de ratón/día durante 8 semanas, redujo las concentraciones de triglicéridos sanguíneos (Larrieta *et al.*, 2010).

### **1.6.2 Efecto de la biotina sobre la expresión de genes del metabolismo de carbohidratos**

El efecto hipoglucemiante e hipolipemiante de la biotina se encuentra acorde con observaciones que indican que la biotina aumenta la expresión de genes de enzimas cuya actividad favorece la disminución de las concentraciones de glucosa sanguíneas y reduce la expresión del ARNm de proteínas de acción hiperglucemiante. Estudios pioneros revelaron que la administración de biotina (1-2 mg/Kg de peso) aumenta la actividad glucocinasa hepática (Dakshinamurti *et al.* 1970). Subsecuentemente, se mostró que este efecto se debió a un aumento en la cantidad de ARNm que codifica para la glucocinasa hepática (Chauhan y Dakshinamurti, 1991). En hepatocitos en cultivo obtenidos de ratas a una concentración final de  $10^{-6}$ M de biotina aumentó la actividad de la glucocinasa (Spence y Koudelka, 1984). El efecto inductor sobre la glucocinasa también se observó para la isoenzima pancreática (Borboni *et al.*, 1996, Romero-Navarro *et al.*, 1999, Vilches-Flores *et al.*, 2010).

La glucocinasa no es la única enzima en el metabolismo de la glucosa que es afectada por la administración de biotina. En ratas diabéticas la administración de concentraciones farmacológicas de biotina disminuyeron la expresión de la enzima fosfoenolpiruvato carboxicinas hepática (Dakshinamurti y Chauhan, 1994), una enzima clave en la gluconeogénesis de acción hiperglucemiante. También otros estudios en ratas diabéticas se observó que a las 3 horas de la administración de 1mg de biotina/kg de peso se redujo la expresión de otros genes gluconeogénicos como la enzima glucosa-6-fosfatasa, y los factores transcripcionales HNF-4-alfa, y FoxO-1 (Sugita *et al.*, 2008).

### **1.6.3 Efecto de la biotina sobre la expresión de genes del metabolismo de lípidos**

El laboratorio donde efectué este trabajo de tesis, ha investigado los mecanismos moleculares que participan en el efecto hipolipémico de concentraciones farmacológicas de biotina. En ratones normales, la administración durante ocho

semanas de una dieta conteniendo concentraciones farmacológicas de biotina, 56 veces la presente en la dieta control, disminuyó en el hígado la expresión del ARN mensajero del factor transcripcional lipogénico SREBP-1c (Larrieta *et al.*, 2010). En concordancia con este efecto, la expresión de las enzimas ácido graso sintasa y acetil-CoA carboxilasa-1, genes cuya transcripción se encuentra regulada por SREBP-1c (Foufelle *et al.*, 2002), disminuyeron proporcionalmente a la reducción observada en el factor transcripcional. Un efecto similar se encontró en ratas con diabetes inducida por estreptozotocina (Sugita *et al.*, 2008). No concordante con la disminución de SREBP-1c, el ARNm de la glucocinasa hepática, de la esteroil-CoA desaturasa y de la glucosa-6-fosfato, cuyos transcritos se conocen están regulados por SREBP-1c (Foufelle *et al.*, 2002), no mostraron disminuciones.

En estudios subsecuentes profundizamos los conocimientos sobre los mecanismos post-transcripcionales y vía de señalización que participan en el efecto hipotrigliceridémico de la vitamina (Aguilera-Méndez y Fernández-Mejía 2012). Nuestros datos indican que la suplementación con biotina disminuyen las concentraciones plasmáticas e intrahepáticas de triglicéridos mediante un mecanismo en que participan: aumentos en las concentraciones de GMPc y de la forma activa de la AMPK; incrementos en la acetil-CoA carboxilasa-1 fosforilada, forma inactiva de la enzima; disminución en la forma madura del factor transcripcional SREBP-1c y de la expresión proteica de la ácido graso sintasa, enzima cuya expresión está regulada por este factor transcripcional. Estos resultados indican que la disminución que produce la biotina sobre la lipogénesis se efectúa tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional.

## **2. Metabolismo de los lípidos**

### **2.1 Digestión de lípidos**

Durante el ayuno, la energía proviene principalmente de los triglicéridos, los cuales, en personas con índice de masa corporal normal, constituyen del 15 al 20% del peso total y proveen 9 kcal/g (Stryer 1988).

En condiciones post-prandiales, los triglicéridos pueden provenir de la dieta o bien pueden ser sintetizados *de novo* a partir de azúcares mediante el proceso denominado lipogénesis y son almacenados en el tejido adiposo cuando hay un exceso de ellos (AbouRjaili *et al.*, 2010).

Los triglicéridos que provienen de la dieta son hidrolizados por lipasas pancreáticas en el lumen intestinal y emulsificadas por los ácidos biliares formando micelas. El colesterol y el retinol de la dieta son esterificados con un ácido graso para formar colesteril-éster o retinol-éster. En esta forma los lípidos son entonces empacados en partículas proteicas llamadas quilomicrones. Los quilomicrones se encuentran constituidos por apolipoproteínas, la más abundante es la ApoB-48, otras de las apolipoproteínas presentes son la A-I, A-IV, C-I, C-II y C-III. Los quilomicrones son secretados a la linfa intestinal y son transportados a la circulación. En las superficies endoteliales del tejido adiposo, principalmente, los quilomicrones pierden su contenido de triglicéridos por la acción catalítica de la enzima lipoproteín lipasa. Dependiendo de las necesidades del adipocito, los ácidos grasos liberados son oxidados o re-esterificados en triglicéridos. El proceso mediado por la lipoproteín lipasa, también se lleva a cabo en el corazón y el músculo esquelético (Kasper *et al.*, 2005), sin embargo, se realiza en tiempo posterior al post-prandio.

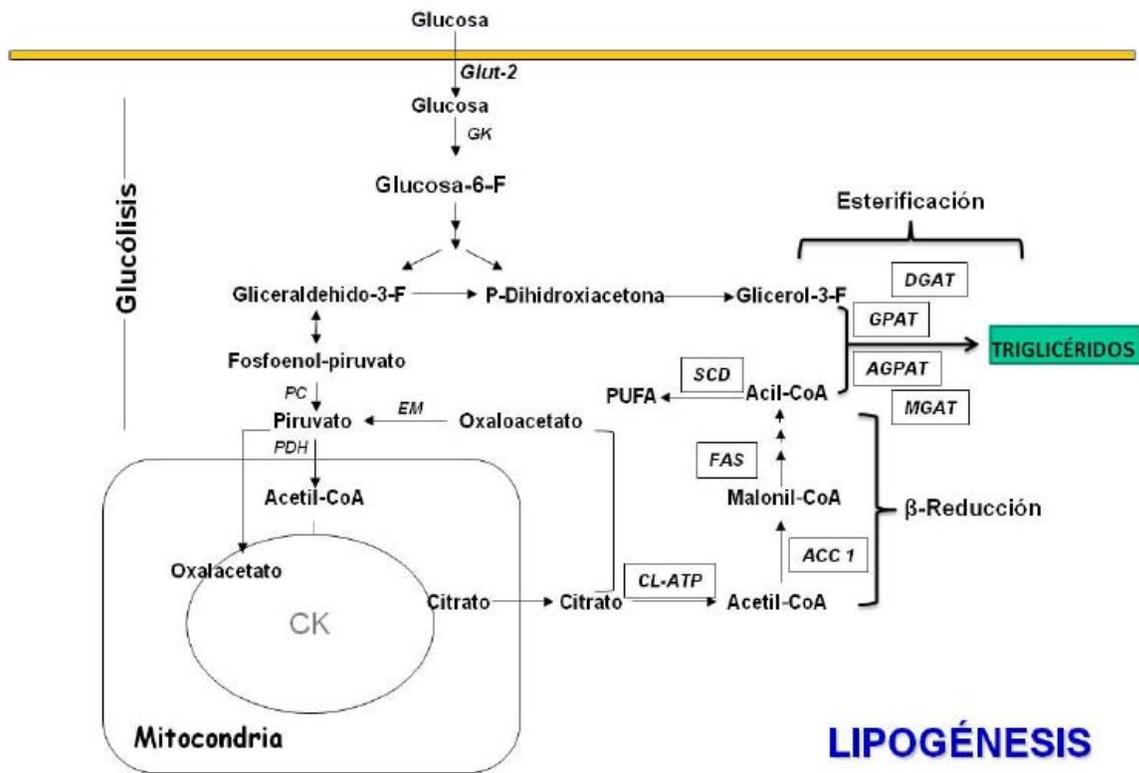
## **2.2 Lipogénesis de novo**

Cuando existe un exceso de glucosa en la dieta, y ésta no puede ser almacenada debido a la saturación de los depósitos de glucógeno tanto en el hígado como en el músculo, a partir de ella se sintetizan triglicéridos mediante la lipogénesis *de novo* (Stryer 1998).

La lipogénesis *de novo* o síntesis de ácidos grasos *de novo* es la vía metabólica que sintetiza ácidos grasos a partir de un exceso de carbohidratos. En condiciones normales, la lipogénesis *de novo* se lleva a cabo en el hígado y en el tejido adiposo y es considerado como un contribuyente menor en el mantenimiento de la homeostasis de triglicéridos séricos, ya que se considera que la mayoría de éstos

proviene de la dieta (Bjorntorp y Sjostrom, 1978). Sin embargo, algunos estudios sugieren que la lipogénesis hepática *de novo* podría contribuir significativamente al contenido de lípidos séricos en individuos con dietas ricas en carbohidratos (Shwarz *et al.*, 2003).

La lipogénesis *de novo* a partir de carbohidratos utiliza la vía glucolítica para la formación de triglicéridos (Figura 3). El producto final de esta vía, el piruvato, a través de la acción catalítica de la piruvato deshidrogenasa, se convierte en acetil-CoA y subsecuentemente en citrato en la mitocondria. A través de un acarreador en la membrana el citrato sale del organelo hacia el citoplasma donde es transformado por la citrato-liasa, en acetil-CoA.



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

síntesis de los ácidos grasos. El malonil-CoA mediante la ácido-graso-sintasa (FAS) se conjuga con una molécula de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA, que se conjuga a su vez con el bloque básico, el malonil-CoA, formando un ácido graso con mayor número de carbonos, este paso se repite hasta formar ácidos grasos de cadena larga (Bergen y Mersmann, 2005). El principal producto de la lipogénesis *de novo* es el palmitato, pero el estearato y otros ácidos grasos de cadena corta son también generados (Ameer *et al.*, 2014). Tres ácidos grasos de cadena larga se esterifican con una molécula de glicerol para formar triacilglicerol. Los triglicéridos sintetizados en el hígado son exportados a otros tejidos por las proteínas de muy baja densidad (VLDL), en particular al tejido adiposo donde se almacenan (Bergen y Mersmann, 2005).

### **2.3 Regulación de la lipogénesis**

La actividad de las vías metabólicas que conducen a la síntesis de los lípidos en el hígado es fuertemente dependiente de las condiciones nutricionales. Una dieta rica en carbohidratos estimula tanto la vía glucolítica como la lipogénica, mientras que el ayuno o una dieta rica en grasa disminuye su actividad (Postic *et al.*, 2007).

La lipogénesis se promueve por la acción de la insulina y por el aumento de la glucosa intracelular. En tanto se inhibe por el glucagon y por la condición energética de la célula mediante la relación entre las concentraciones de ATP, AMP y ADP (carga energética). La proteína mediadora de este proceso es la proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK) (Foufelle *et al.*, 2002).

La mayoría de las enzimas que participan en el proceso de lipogénesis, están reguladas por mecanismos moleculares postraduccionales y alostéricos pero también se controlan a largo plazo mediante una modulación de su tasa de transcripción. De hecho, ahora está claro que la transcripción de los genes glucolíticos y lipogénicos requieren tanto la insulina y una alta concentración de glucosa para ser inducida totalmente (Foufelle *et al.*, 2002) y que en ella participan diversos factores transcripcionales.

## **2.4 Regulación transcripcional de la lipogénesis**

A nivel transcripcional la lipogénesis está regulada por diversos factores transcripcionales. Los mejores estudiados son LXR (Liver Receptor alpha), SREBP1c (Sterol Responsive Element Binding Protein 1c) y ChREBP (Carbohydrate Responsive Element Binding Protein).

### **2.4.1 LXR $\alpha$ (Liver Receptor alpha)**

LXR $\alpha$  es un factor transcripcional activado por ligando que pertenece a la superfamilia de los receptores nucleares (Baranowski, 2008) y que actúa como sensor del colesterol (Calkin 2012); es activado por derivados del colesterol incluyendo oxisteroles y 24(S), 25-epoxicolesterol. LXR $\alpha$  se expresa en tejidos con una alta actividad metabólica incluyendo hígado, tejido adiposo y macrófagos (Calkin y Tontonoz, 2012).

Este factor transcripcional forma un heterodímero con el receptor retinoide X (RXR) que unen a los elementos de respuestas a LXR (LXREs) en genes blancos de LXR en asociación con co-represores tales como SMRT (mediador de los receptores de hormona tiroidea y retinoides) y NCoR (co-represor del receptor nuclear (Willy *et. al.*, 1995).

Una de las funciones importantes de LXR en el hígado es la promoción de la lipogénesis *de novo*. LXR estimula la lipogénesis a través de la inducción de la expresión de SREBP-1c y en genes lipogénicos como acetil-CoA carboxilasa, esteroil-CoA desaturasa y ácido graso sintasa.

### **2.4.2 SREBP-1c (Sterol Responsive Element Binding Protein 1c)**

SREBP-1c es un factor transcripcional que se expresa ampliamente en el hígado y tejido adiposo (Foufelle *et al.*, 2002). SREBP-1c actúa como mediador de la insulina en la expresión de genes lipogénicos, habiéndose identificado sitios de unión para SREBP-1c en los promotores de acetil-CoA carboxilasa, ácido graso sintasa, glicerol-fosfato acil-transferasa y esteroil-CoA desaturasa, enzimas

críticas en la síntesis de los triglicéridos (Foufelle *et al.*, 2002). Sin embargo, a pesar de que está bien establecido que este factor transcripcional juega un papel importante en el control de la síntesis de triglicéridos, SREBP1c no regula absoluta y únicamente la transcripción de genes lipogénicos, sino que actúa en sinergismo con el factor transcripcional ChREBP (Postic *et al.*, 2007).

### **2.4.3 ChREBP (Carbohydrate Responsive Element Binding Protein)**

ChREBP es una proteína perteneciente a la familia Mondo de factores transcripcionales bHLH/LZ altamente conservada entre las especies (Yamashita *et al.*, 2001). La expresión de ChREBP es más abundante en el hígado y en el tejido adiposo (Iizuka *et al.*, 2004), los sitios más activos de la lipogénesis *de novo*. También se expresa en otros tejidos que no son clásicamente lipogénicos como en el intestino delgado, riñones (Proctor *et al.*, 2006) e islotes pancreáticos (da Silva Xavier *et al.*, 2006). Su expresión es inducida en respuesta a una dieta alta en carbohidratos pero no en respuesta a una dieta con alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) o al ayuno (Dentin *et al.*, 2005).

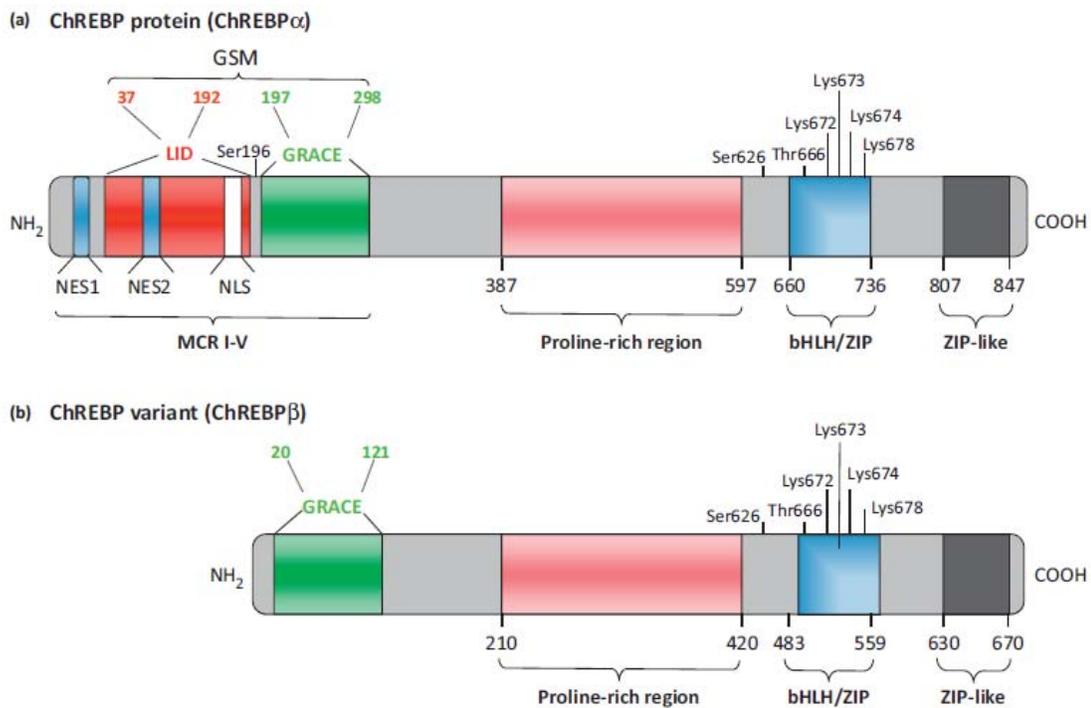
En ratones con diabetes tipo 1 y alteración en el metabolismo de los lípidos, se encontró una acumulación de triglicéridos en los riñones debido al incremento en la expresión y actividad de ChREBP. Sin embargo, la regulación de este factor en este tejido no se ha determinado aún (Proctor *et al.*, 2006). En células  $\beta$  pancreáticas se reportó tiene dos efectos disímboles. ChREBP es un regulador crítico de genes glucolíticos y lipogénicos (PK y FAS respectivamente) y juega un papel detrimental favoreciendo el desarrollo de glucolipototoxicidad y falla de la célula  $\beta$  a través de la alteración en la expresión de genes en diabetes tipo 2 (da Silva Xavier *et al.*, 2006). Por otro lado se encontró que participa en la proliferación de las células  $\beta$  pancreáticas cuando son estimuladas por glucosa (Proctor *et al.*, 2006).

ChREBP se descubrió en el 2001 por el grupo de Uyeda y posteriormente se identificó a su compañero funcional, la proteína Mlx (Ma *et al.*, 2005) que juntos forman heterodímeros (Stoeckman *et al.*, 2004 e Ishii *et al.*, 2004) y que unen al elemento de respuesta a los carbohidratos (ChoRE), el cual está compuesto por dos cajas E separadas por cinco pares de bases (Shih *et al.*, 1995 y Ma *et al.*, 2006). El heterodímero ChREBP/Mlx participa en el metabolismo de lípidos a través de la regulación de la expresión de genes lipogénicos como ácido graso sintasa (Fasn), acetil-CoA carboxilasa 1 (Acc1) y estearoil-CoA desaturasa 1 (Scd1) (Iizuka *et al.*, 2004, Ishii *et al.*, 2004, Ma *et al.*, 2006 e Iizuka *et al.*, 2006), gluconeogénicos como glucosa-6-fosfatasa subunidad catalítica (G6pc) (Iizuka *et al.*, 2004, Pedersen *et al.*, 2007 e Iizuka *et al.*, 2006) y glucolíticos como piruvato cinasa hepática (Pklr) y fructocinasa (Fk) (Yamashita *et al.*, 2001 e Iizuka *et al.*, 2004).

Este factor transcripcional presenta dos isoformas, ChREBP  $\alpha$  y ChREBP  $\beta$  (Herman *et al.*, 2012 y Iizuka *et al.*, 2013) los cuales están compuesta de 864 y 687 aminoácidos respectivamente (Herman *et al.*, 2012). ChREBP  $\alpha$  contiene un módulo sensor de glucosa (GSM) (Figura 4), también conocido como regiones conservadas Mondo (MCR) compuestas de cinco subdominios MCR I-V, de los cuales MCR I-IV corresponden al dominio LID, dominio inhibitorio para baja glucosa (LID, residuos 37-192). También contiene un elemento conservado de respuesta a glucosa (GRACE, residuos 197-298) (Li *et al.*, 2006). ChREBP  $\alpha$  contiene una señal de localización nuclear (NLS) en MCR IV y dos señales de exportación nuclear (NES1 y NES2) unido por el factor de exportación nuclear Crml (Ge *et al.*, 2011). La proteína 14-3-3 se encuentra unido constitutivamente a MCR III y es necesaria para la respuesta con glucosa (Li *et al.*, 2008). Esta proteína contribuye a la localización citoplásmica de ChREBP (Sakiyama *et al.*, 2008 y Ge *et al.*, 2011). En contraste, ChREBP  $\beta$  solamente contiene el elemento conservado de respuesta a glucosa (GRACE) (Herman *et al.*, 2012). ChREBP  $\alpha$  se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma y ChREBP  $\beta$  se encuentra

solamente en el núcleo. Además ChREBP  $\alpha$  y ChREBP  $\beta$  sensan la concentración de glucosa a través de diferentes mecanismos.

La actividad de ChREBP es regulada a través de modificaciones postraduccionales como fosforilación/desfosforilación, acetilación y acetilglucosaminación (Iizuka *et al.*, 2013). Aún existe controversia en la definición de los metabolitos que activan la translocación de ChREBP, sin embargo xilulosa-5-fosfato (X5P) (Kabashima *et al.*, 2003, Iizuka *et al.*, 2013 y Towle *et al.*, 1997),



**Figura 4. Estructura de la proteína ChREBP. (a) ChREBP  $\alpha$ .** Esta proteína está conformada por 864 aminoácidos y contiene varios dominios incluyendo una señal de localización nuclear (NLS), dos señales de exportación nuclear (NES1 y NES2) cerca del amino terminal, dominios de poliprolina, un dominio bHLH/LZ y un dominio como cremallera de leucina. **(b) ChREBP  $\beta$ .** Esta proteína es producto de la traducción del sitio de comienzo localizada en el exón 4 y la cual está conformada por 687 aminoácidos. A la proteína ChREBP  $\beta$  le faltan los primeros 177 aminoácidos en comparación con la proteína completa ChREBP  $\alpha$ .

glucosa 6-fosfato (G6P) (Iizuka *et al.*, 2013, Towle *et al.*, 1997, Girard *et al.*, 1997, Li *et al.*, 2010 y Dentin *et al.*, 2012) y fructosa-2,6-bisfosfato (Iizuka *et al.*, 2013 y Arden *et al.*, 2012) son las moléculas candidatas para la regulación en la expresión de genes blancos de ChREBP. El mecanismo clásico propuesto para la regulación de la translocación de ChREBP es a través de la fosforilación/desfosforilación (Kawaguchi *et al.*, 2001 y Kabashima *et al.*, 2003).

Después de la estimulación con glucosa, ChREBP  $\alpha$  se transloca al núcleo para unirse al ChoRE después de su desfosforilación por una proteína fosfatasa 2A. Bajo condiciones de ayuno, ChREBP  $\alpha$  es inactivado por fosforilación en los residuos Ser196, Ser626 y Thr666 por una proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) y en Ser568 por una proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK) (Kawaguchi *et al.*, 2001 y 2002).

Recientemente se ha reportado, la existencia de otras modificaciones postraduccionales que modifican la actividad de ChREBP en respuesta a glucosa; se ha observado que a altas concentraciones de glucosa, ChREBP es modificado por acetilación (Bricambert *et al.*, 2010) y por O-GlcNacilación (Guinez *et al.*, 2011). Sin embargo, la acetilación y O-GlcNacilación no influyen en el transporte hacia el núcleo de ChREBP, pero sí incrementa su actividad transcripcional dentro del núcleo favoreciendo su reclutamiento hacia los sitios de unión sobre el ADN (Guinez *et al.*, 2011 y Bricambert *et al.*, 2010).

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En estudios previos en un modelo experimental de ratones normales, la administración durante ocho semanas de una dieta conteniendo concentraciones farmacológicas de biotina disminuyó en el hígado la expresión del mensajero del factor transcripcional lipogénico SREBP-1c. En concordancia con este efecto la expresión de las enzimas ácido graso sintasa y acetil-CoA carboxilasa-1, genes cuya transcripción se encuentra regulada por SREBP-1c (Foufelle *et al.*, 2002), disminuyeron proporcionalmente a la reducción observada en el factor transcripcional (Larrieta *et al.*, 2010). Sin embargo, los ARNm de otras enzimas lipogénicas que se conocen están regulados por SREBP-1c (Foufelle *et al.*, 2002) como la glucocinasa hepática, de la esteroil-CoA desaturasa y de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, no mostraron cambios acordes a la disminución de SREBP1c, lo que sugiere que otros factores transcripcionales podrían estar compensando la reducción de SREBP-1c.

Existen otros importantes factores transcripcionales que participan en la regulación de la lipogénesis como ChREBP. Es posible, por lo tanto, que este factor transcripcional se encuentren participando en la compensación por la disminución de SREBP-1c.

### **4. HIPÓTESIS**

El factor transcripcional ChREBP se encuentra participando en las acciones de la biotina sobre la expresión de genes lipogénicos.

### **5. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la participación del factor transcripcional ChREBP en los efectos de la biotina.

## **6. OBJETIVOS PARTICULARES**

Comparar los cambios en la expresión proteica y del ARNm del factor transcripcional ChREBP entre ratones que reciban durante ocho semanas una dieta control o una dieta suplementada con biotina.

Comparar los cambios en la localización nuclear y citoplásmica del factor transcripcional ChREBP en respuesta a una carga de glucosa, entre ratones que reciban durante ocho semanas una dieta control o una suplementada con biotina.

Comparar los cambios en el contenido de glucosa-6-fosfato en el hígado de ratones que reciban durante ocho semanas una dieta control o una dieta suplementada con biotina.

## **7. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **7.1 Modelo animal**

Ratones machos de la cepa BALB/cAnN recién destetados (21 días postnatales) se mantuvieron en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM bajo ciclos de luz/obscuridad de 12 horas, con libre acceso a agua y alimento durante todo el período experimental. Los procedimientos fueron aprobados por el comité de Ética y Experimentación del Instituto de investigaciones Biomédicas. Diferentes lotes de ratones recibieron una dieta control o una dieta suplementada con biotina durante ocho semanas, según el protocolo utilizado previamente en el laboratorio en el que se han observado los distintos efectos que tiene la biotina sobre el metabolismo (Báez-Saldaña 2009, Larrieta *et. al.*, 2010, Lazo de la Vega *et. al.*, 2012 y Aguilera-Méndez *e.t al.*, 2012). La dieta control con concentraciones de 1.76 mg de biotina/Kg de alimento (TD-01362, Harlan Teklad) fue suficiente para cubrir los requerimientos normales de los ratones y la dieta suplementada con concentraciones de 97.7 mg de biotina/Kg de alimento (TD-01363, Harlan Teklad), es decir 55.6 veces la concentración del grupo control, proporción comparable a la que aportan los suplementos vitamínicos de biotina recomendados para diabetes.

El peso corporal y el consumo de alimento se determinaron cada semana para cada lote. Posterior a las ocho semanas de tratamiento, los ratones se ayunaron durante 12 horas, se anestesiaron con sevoflurano (Sevorane®, Abbott Laboratories) y se les extrajo el hígado. Al finalizar la extracción, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical.

### **7.2 Curva de tolerancia a la glucosa**

Al finalizar el período de la ingesta de la dieta durante ocho semanas, se realizó una curva de tolerancia a la glucosa. A un lote de ratones que se mantuvieron en ayuno durante 16 horas, se les inyectó 6 g de glucosa/Kg de peso corporal vía intraperitoneal. Se midieron las concentraciones de glucosa en sangre de la vena de la cola utilizando un glucómetro (FreeStyle Optium, MediSense, Inc., Abbott

Laboratories.) antes de la inyección y a los 15, 30, 90, 120 y 180 minutos posteriores a la inyección de glucosa. Las frecuencias relativas fueron determinadas utilizando el software GraphPad Prim Version 6.0 (GraphPad Software, Inc.).

### **7.3 Inducción de la translocación del factor transcripcional ChREBP al núcleo**

Ratones tratados con dieta control o dieta suplementada durante ocho semanas y ratones no tratados proporcionados directamente por el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, se mantuvieron en ayuno durante 12 horas. Se dividieron en cuatro grupos de los cuales sólo tres recibieron una inyección de glucosa (6 g/Kg de peso corporal) vía intraperitoneal. A una, 2, 4 y hasta 6 horas después de la aplicación de glucosa, se les extrajo el hígado previa anestesia con sevoflurano (Sevorane®, Abbott Laboratories). El grupo de ratones que no recibieron una dosis de glucosa inmediatamente se les extrajo el hígado previa anestesia con sevoflurano (Sevorane®, Abbott Laboratories) y después se sacrificaron por dislocaron cervical.

### **7.4 Fraccionamiento subcelular de hígado**

Todos los pasos del fraccionamiento subcelular y centrifugaciones se realizaron a 4°C en una centrífuga 5804R con un rotor F45-30-11 (Eppendorf, Alemania), siguiendo el protocolo con mínimas modificaciones, descrito por Álvarez-Delgado *et. al.*, 2010. El hígado recién extraído se lavó en una solución amortiguadora isotónica (manitol 210 mM, sacarosa 70 mM, EDTA 1 mM, HEPES 10 mM, 0.5 mg/mL de albúmina deslipidada e inhibidores de proteasas de Roche Diagnostics; pH 7.5), posteriormente se homogenizó en un potter de vidrio con 4 mL de solución amortiguadora isotónica con 11 pases lentos, se centrifugó a 800 g durante 25 minutos. El sobrenadante (fracción citoplásmica) se separó y se guardó a -20°C para su análisis posterior. El precipitado se resuspendió en 1 mL de solución amortiguadora isotónica y nuevamente se homogenizó y se centrifugó a 800 g durante 25 minutos; este proceso se repitió hasta completar un total de

cinco homogenizaciones. El último precipitado (fracción nuclear cruda) se resuspendió en 500  $\mu$ L de solución de lisis (HEPES 50 mM, KCl 50 mM, EDTA 1mM, EGTA 1 mM, ortovanadato de sodio 2 mM, DTT 1 mM, fluoruro de sodio 25 mM, pirofosfato de sodio 5 mM, Tritón X-100 0.1% e inhibidores de proteasas de Roche Diagnostics), se sonicó en frío en un Ultrasonic Processor por 10 ciclos con 3 seg de pulso a 60 Hz de amplitud, se centrifugó a 12,500 g durante 30 minutos, se obtuvo el sobrenadante y se guardó a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su análisis posterior.

### **7.5 Determinación de la concentración de proteínas por el método de Bradford**

La determinación de la concentración de proteínas se realizó por el método de Bradford utilizando el kit protein assay (Bio-Rad Laboratories, Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó una curva estándar a partir de una solución de albúmina bovina sérica (BSA, Sigma-Aldrich, Inc. USA) en un rango de 0-20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Se diluyeron 1  $\mu\text{L}$  de cada muestra en 799  $\mu\text{L}$  de agua destilada desionizada, a cada tubo se le agregaron 200  $\mu\text{L}$  de reactivo de Bradford, se incubaron durante 5 minutos y se midieron las absorbancias a una longitud de onda de 595 nm utilizando un lector de microplacas Sinergy HT (BioTeck Instruments, Inc).

### **7.6 Western Blot**

En geles de poliacrilamida al 10% (solución de bis-acrilamida 30%, SDS 10%, Tris 1.5M pH 8.8, persulfato de amonio 10%, TEMED) se cargaron 50  $\mu\text{g}$  de proteínas de las fracciones nucleares y/o fracciones citoplásmicas en cada uno de los pozos. Como marcador de peso molecular se utilizó Precisión Plus Protein Standards (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Se realizó el corrimiento electroforético a 50 V durante 1 hora y a 90 V durante dos horas más, usando solución de corrida (Tris-base 25 mM, glicina 190 mM, SDS 10%) en el sistema de electroforesis Mini Protean II (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

Se realizó la electrotransferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratories, Inc.) o membranas de PVDF (Bio-Rad Laboratories, Inc.) a

100 V durante 1.5 horas usando solución de electrotransferencia (Tris-base 25 mM, glicina 190 mM, SDS 10%, metanol 20%) en el sistema de electrotransferencia Mini Protean II (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Al terminar las membranas se lavaron con TBS-T (Tris-base 50 mM, NaCl 166 mM, Tween 0.1%, pH 7.4) durante unos minutos y después se incubaron con solución de tinción rojo ponceau (Sigma-Aldrich, Inc. USA) para la confirmación de la transferencia de proteínas. Después las membranas se lavaron con solución TBS-T hasta la desaparición de las bandas teñidas por el rojo ponceau. Las membranas se bloquearon con solución de bloqueo (Tris-base 50 mM, NaCl 166 mM, Tween 0.1% pH 7.4, leche svelty baja en grasa 5%) durante 1 hora a temperatura ambiente, después se incubaron con cualquiera de los siguientes anticuerpos primarios: anti-ChREBP 1 µg/mL (ab81958, Abcam), anti-α-Tubulina 0.02 µg/mL (B-7: sc-5286, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) y anti-phospho Histona H3 2 µg/mL (Ser-10, Millipore Corporation). La incubación fue a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente las membranas se lavaron con solución TBS-T durante 10 minutos dos veces y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (cabra anti-ratón IgG-HRP 0.02 µg/mL (sc-2005, Santa Cruz Biotechnology, Inc.); cabra anti-conejo IgG-HRP 0.1 µg/mL (sc-2030, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron con solución TBS-T durante 10 minutos dos veces. La observación de las bandas se realizó con el kit Immobilon Western (Millipore Corporation) por reacción de quimioluminiscencia y mediante el uso del equipo Molecular Imager Chemidoc XRS System (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Las intensidades de las bandas obtenidas se cuantificaron por densitometría utilizando el programa Imagen J 1.48q (HIMH, Bethesda, MD, USA).

### **7.7 Análisis de la expresión del ARNm de ChREBP en el hígado**

El ARN se obtuvo de los hígados extraídos de los lotes de ratones utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen, Life Technologies). La cantidad del ARN se determinó por espectrofotometría (NanoDrop ND-1000, USA) a 260 nm y la pureza del ARN por la relación de las densidades ópticas obtenidas (260/280 nm y 260/230nm). La integridad del ARN se verificó en un gel de agarosa al 1.5%. Se obtuvo el ADNc

en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$  a partir de 100 ng de ARN. En un tubo de reacción se agregó el ARN, 1  $\mu\text{L}$  de Oligo dT (0.5 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ ) (Invitrogen, Life Technologies) y 1  $\mu\text{L}$  de dNTPs 10mM (Roche Diagnostics GmbH), la mezcla se calentó a 65°C por 5 minutos, se pasó rápidamente al hielo, después se centrifugó por unos segundos y se agregaron los siguientes componentes: 4  $\mu\text{L}$  de buffer de reacción 5X (Invitrogen, Life Technologies), 2  $\mu\text{L}$  de DTT (Invitrogen, Life Technologies) y 1  $\mu\text{L}$  de agua libre de RNAsas, se mezcló suavemente y se incubó a 37°C por 2 minutos, posteriormente se agregaron 200 unidades de la enzima retrotranscriptasa reversa del virus M-MVL RT (Invitrogen, Life Technologies), se incubó la mezcla a 37°C por 50 minutos y se realizó la inactivación de la enzima a 70°C durante 15 minutos y finalmente se mantuvieron las muestras a 4°C. Una vez obtenido el ADNc, éste se empleó como templado para llevar a cabo las reacciones de PCR.

Se evaluó la expresión del ARNm para el factor transcripcional lipogénico ChREBP por PCR en tiempo real utilizando el equipo ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Para las reacciones de PCR se utilizó 5 ng de ADNc en un volumen final de 12  $\mu\text{L}$ . Para la mezcla de reacción se utilizó 6.25  $\mu\text{L}$  de reactivo TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) y 0.625  $\mu\text{L}$  de sondas TaqMan Mlxipl Mm02342723\_m1 marcadas el extremo 5' con el fluorocromo FAM. Como gen de referencia de expresión endógena se utilizó  $\beta$ -actina (Applied Biosystems). Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo inicial a 50°C por 2 min, un ciclo de desnaturalización a 95°C por 10 min y 40 ciclos de amplificación (desnaturalización, 95°C por 15 seg., alineamiento-extensión 60°C por 1 min). Las muestras se analizaron por triplicado. La expresión relativa del gen de ChREBP se analizó con el método  $\Delta\Delta\text{Ct}$  (Livak y Dschmittgen, 2008) usando la  $\beta$ -actina como control interno y normalizando los resultados con respecto a la expresión en el grupo control.

## 7.8 Determinación de glucosa-6-fosfato en el hígado

Para la determinación de glucosa-6-fosfato se siguió el protocolo de Hans-Jürgen Hohorst (1963) basado en la reacción acoplada de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) para la producción de NADPH. a) Extracción. 100 mg de tejido hepático congelado en nitrógeno líquido se agregaron a 500  $\mu$ L de ácido perclórico al 6% y se homogenizaron utilizando un pistilo (PES-15-B-SI, Axygen Scientific) hasta la disgregación completa del tejido. El homogenizado se centrifugó a 3000 g (centrífuga 5804R, rotor F45-30-11; Eppendorf, Alemania) durante 10 minutos. El sobrenadante se separó en un tubo de 1.5 mL (Eppendorf) y al precipitado se le agregaron 100  $\mu$ L de ácido perclórico al 6% (Sigma-Aldrich, Inc. USA) y 100  $\mu$ L de agua bidestilada, volviéndose a homogenizar hasta la resuspensión completa del precipitado. Se centrifugó nuevamente a 3000 g durante 10 minutos y el sobrenadante se juntó con el anterior completando un volumen final de 800  $\mu$ L con agua bidestilada. b) Neutralización. A los 800  $\mu$ L del extracto se le agregaron 2  $\mu$ L de solución indicadora (Anaranjado de Metilo, Sigma-Aldrich, Inc. USA 50 mg en 100 mL de agua bidestilada,) y solución de carbonato de potasio 5M ( $K_2CO_3$ , J.T. Baker), la cantidad necesaria para el viraje de pH (pH 3.5) (entre 35 a 40  $\mu$ L de  $K_2CO_3$ ), se permitió la liberación de  $CO_2$  y se dejó reposar durante 10 minutos en hielo. c) Reacción. La mezcla de reacción para la determinación de glucosa-6-fosfato fue la siguiente:

<b>Mezcla de Reacción</b>	
Extracto	125 $\mu$ L
Buffer de hidrócloruro de trietanolamina 0.4 M, pH 7.6 (Sigma-Aldrich, Inc. USA)	125 $\mu$ L
NADP <sup>+</sup> , 20 mg en 1 mL de agua bidestilada (Sigma-Aldrich, Inc. USA)	2.5 $\mu$ L
Cloruro de magnesio 0.5 M (J.T.Baker)	2.5 $\mu$ L
<b>Lectura (E1) a 340 nm</b>	
Enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Sigma-Aldrich, Inc. USA)	2 $\mu$ L

Lectura a 340 nm después de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente (E2)	
---	--

d) Cálculos. Las concentraciones de glucosa-6-fosfato en cada una de las muestras fueron calculadas de la diferencias en las densidades ópticas, mediante la siguiente fórmula:  $\frac{\Delta E \times \text{dil}}{\epsilon \times d} = \mu\text{moles de G-6-P/mg de tejido}$

donde:

$\Delta E$  = diferencia de las densidades ópticas ( $E_2 - E_1$ )

dil = Factor de dilución total en el ensayo

$\epsilon$  = coeficiente de extinción,  $6.22 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

d = longitud de la luz en la celda (1 cm)

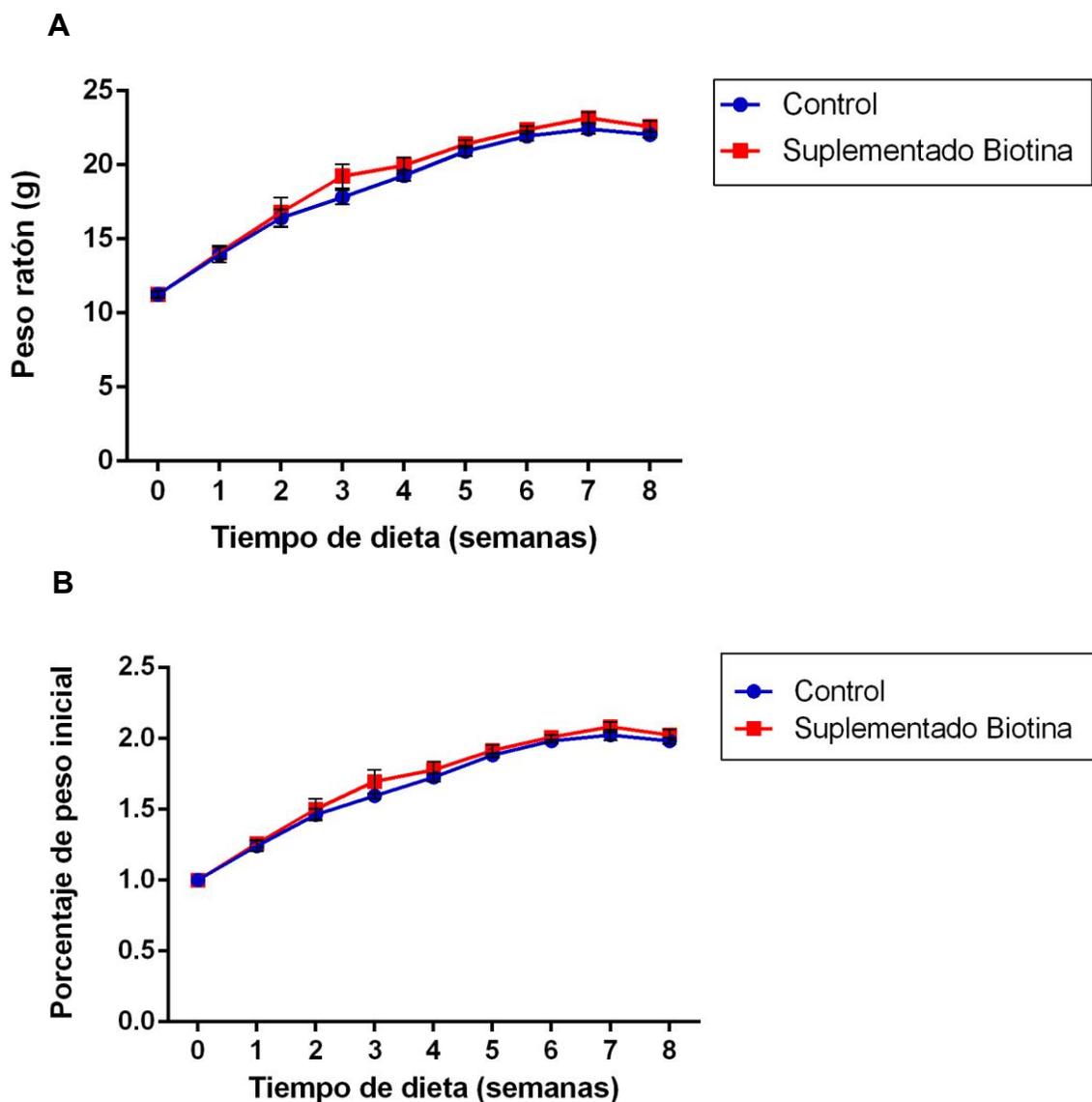
### 7.9 Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prim Version 6.0 (GraphPad Software, Inc. USA). Los datos se presentaron como la media  $\pm$  error estándar (EE) y se analizaron mediante una Prueba *t* de Student y ANOVA de una o de dos vías. Se consideró una significancia estadística con un valor de *p* menor de 0.05 ( $P < 0.05$ ).

## 8. RESULTADOS

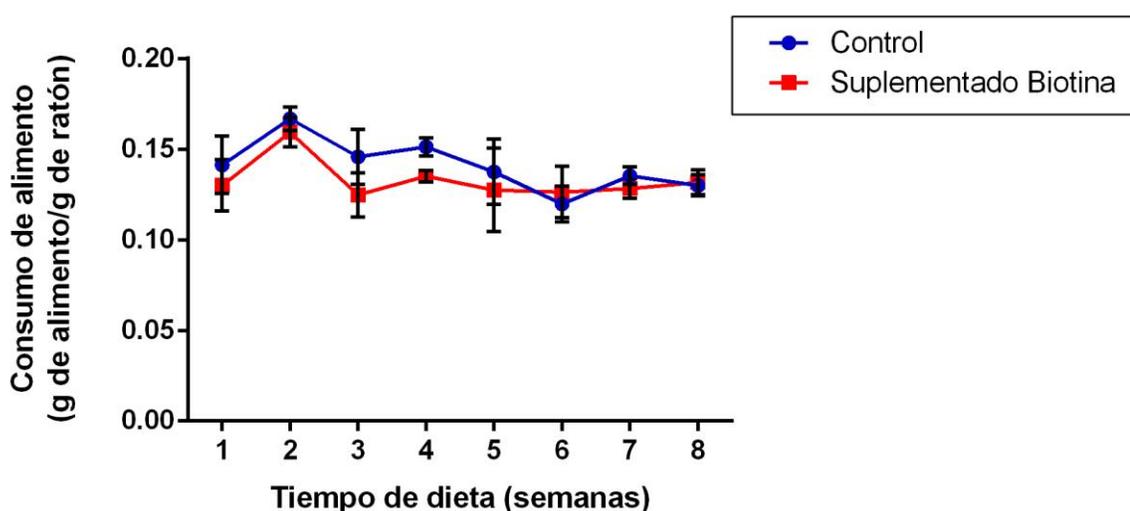
### 8.1 Efecto de la suplementación con biotina sobre el peso corporal y la ingesta de alimento

La suplementación de biotina no modificó el peso corporal absoluto (Figura 5A) ni relativo (Figura 5B) de los ratones.



**Figura 5. Curva de crecimiento de ratones de la cepa BALB/cAnN con tratamiento con dieta suplementada con biotina durante 8 semanas después del destete. A.** Peso corporal de ratones con respecto al tiempo de duración del tratamiento. **B.** Porcentaje de peso inicial con respecto a cada uno de los tiempos durante el tratamiento. Los datos representan la media  $\pm$  EE de 4 repeticiones experimentales,  $n=39$  para ambos grupos. ANOVA de dos vías,  $P=0.1772$ .

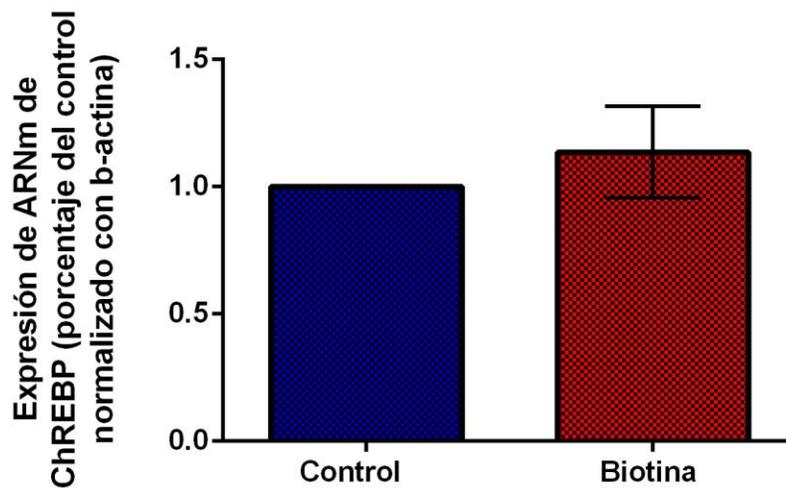
Tampoco se observaron diferencias en el consumo de alimento relativo al peso del ratón en el grupo suplementado con respecto al grupo control (Figura 6), siendo la ingesta diaria promedio de alimento de  $0.14 \pm 0.014$  g de alimento/g de peso corporal en el grupo control, y  $0.13 \pm 0.011$  g de alimento/g de peso corporal en el grupo suplementado. Tomando en cuenta el contenido de biotina en la dieta, la ingesta diaria de biotina fue de  $0.24 \mu\text{g}$  de biotina/g de peso corporal para el grupo control y de  $12.7 \mu\text{g}$  de biotina/g de peso corporal para el grupo suplementado, lo que representa 53 veces más biotina en el grupo suplementado.



**Figura 6. Consumo de alimento control o suplementado con biotina en ratones de la cepa BALB/cAnN durante 8 semanas de tratamiento después del destete.** Los datos representan la media  $\pm$  EE de 4 repeticiones experimentales; grupo control n=42 y grupo suplementado con biotina n=43. ANOVA de dos vías,  $P= 6520$ .

## 8.2 Efecto de la suplementación con biotina sobre la expresión del ARN mensajero del factor transcripcional ChREBP en extracto de hígado

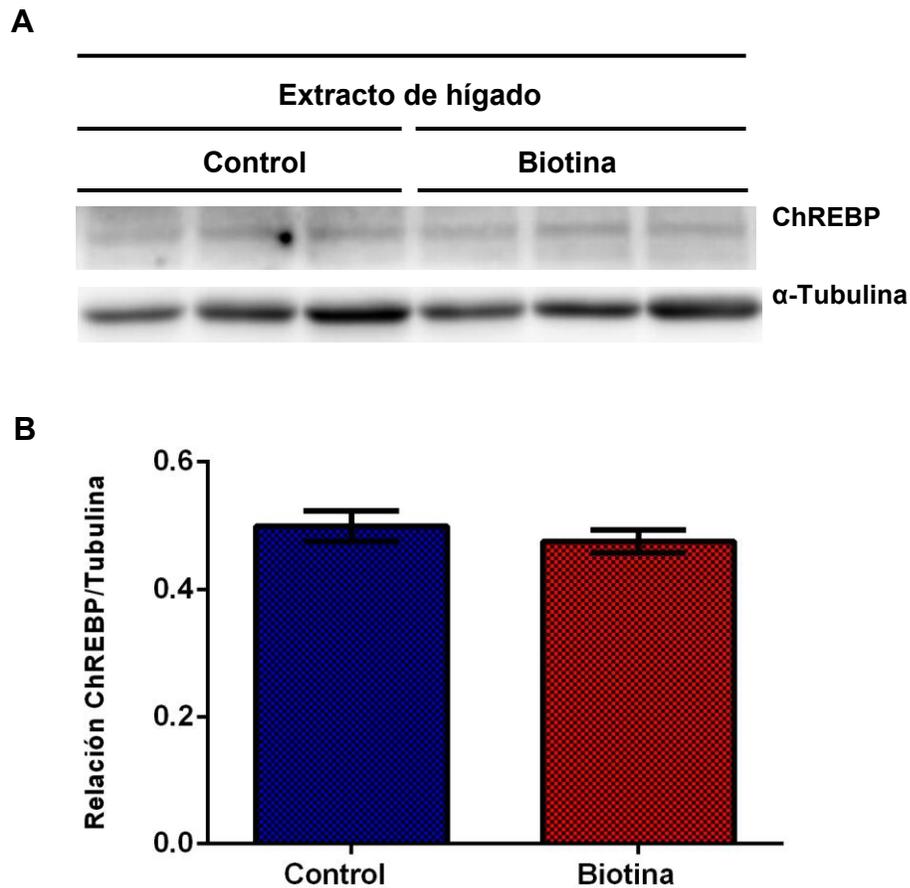
Se analizó el efecto de la suplementación con biotina sobre la expresión del ARN mensajero de ChREBP en extractos de hígado de ratón que consumieron las dietas control o suplementada durante 8 semanas después del destete. Los resultados obtenidos revelaron un aumento no significativo ( $P>0.05$ ) en la expresión del ARNm de ChREBP (Figura 7).



**Figura 7. Efecto de la suplementación con biotina sobre la expresión de ARNm del factor transcripcional ChREBP en extracto de hígado de ratón de la cepa BALB/cAnN tratados con una dieta control o suplementada con biotina durante 8 semanas después del destete. Los resultados representan el porcentaje de cambio con respecto a la expresión de  $\beta$ -actina. Los datos de la gráfica representan la media  $\pm$  EE de 6 ratones del grupo control y 7 ratones del grupo suplementado. Prueba *t* de Student,  $P= 0.5021$ .**

### **8.3 Efecto de la suplementación con biotina sobre la expresión proteica del factor transcripcional ChREBP en extracto de hígado**

También se analizó el efecto de la suplementación con biotina sobre la expresión proteica de ChREBP en extractos de hígado de ratón que consumieron las diferentes dietas, obteniéndose la presencia de la banda correspondiente a ChREBP tanto para el grupo control como para el grupo suplementado, sin embargo no se encontraron diferencias significativas ( $P>0.05$ ) entre los grupos analizados (Figura 8).



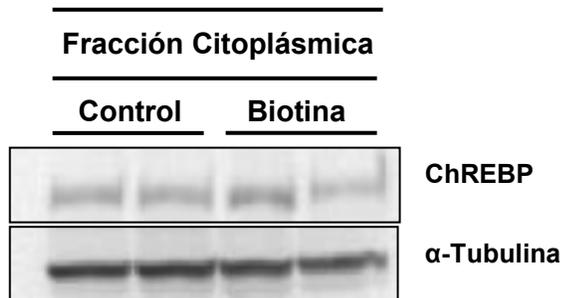
**Figura 8. Efecto de la suplementación con biotina sobre la expresión proteica del factor transcripcional ChREBP en extracto de hígado de ratón de la cepa BALB/cAnN tratados durante 8 semanas después del destete. A.** Western Blot representativo de ChREBP.  $\alpha$ -Tubulina fue utilizada como referencia de extracto de hígado. **B.** Análisis densitométrico de la expresión de ChREBP en extracto de hígado de ratón. Los datos de la gráfica representan la media  $\pm$  EE de 6 ratones para cada grupo. Prueba *t* de Student,  $P=0.4369$ .

#### 8.4 Efecto de la suplementación con biotina sobre la expresión proteica del factor transcripcional ChREBP en fracción citoplásmica

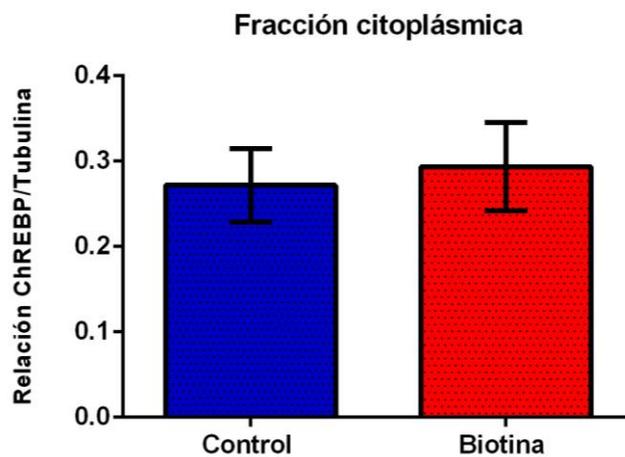
Se ha reportado que en condiciones de ayuno ChREBP se localiza de forma inactiva en el citoplasma (Kawaguchi *et al.*, 2001, Ishii *et al.*, 2004). Como siguiente paso de nuestro estudio se analizó la expresión proteica del factor

transcripcional ChREBP en condiciones de ayuno de fracciones citoplásmicas. No se encontraron diferencias significativas ( $P>0.05$ ) por efecto de la biotina entre los grupos analizados (Figura 9A y 9B).

**A**



**B**

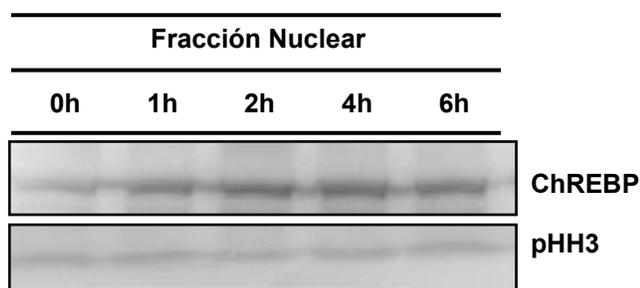


**Figura 9. Expresión proteica del factor transcripcional ChREBP** en la fracción citoplásmica de hígado de ratón de la cepa BALB/cAnN tratados durante 8 semanas después del destete. **A.** Western Blot representativo de ChREBP. Como proteína de referencia citoplásmica se utilizó  $\alpha$ -Tubulina. **B.** Análisis densitométrico de la expresión de ChREBP en la fracción citoplásmica. Los datos de la gráfica representan la media  $\pm$  EE de 3 ratones para cada grupo. Prueba *t* de Student,  $P=0.7508$ .

### 8.5 Inducción de la translocación nuclear del factor transcripcional ChREBP por efecto del incremento de la glucosa intracelular

Como se ha descrito, concentraciones altas de glucosa produce la translocación nuclear de ChREBP (Kawaguchi *et al.*, 2001, Ishii *et al.*, 2004) quien de esta manera se une a sus elementos de respuesta en el ADN regulando así la transcripción.

Como un indicativo de la actividad de la proteína se planteó analizar la translocación del factor transcripcional hacia el núcleo en respuesta a altas concentraciones de glucosa. En un estudio piloto se usaron ratones a los que se les administró 6 g de glucosa/Kg de peso de ratón vía intraperitoneal y se analizó el curso temporal de la presencia del factor transcripcional en el núcleo. Cabe señalar que estos ratones recibieron una dieta Chow de bioterio control (2018S Teklad Global 18% Protein Rodent Maintenance Diet, Harlan Teklad). En la Figura 10 se muestran los resultados en donde se observa un aumento gradual en la intensidad de la banda correspondiente a ChREBP con respecto al tiempo cero siendo mayor a las 2 horas después de la aplicación de la glucosa y una disminución a partir de las 6 horas.

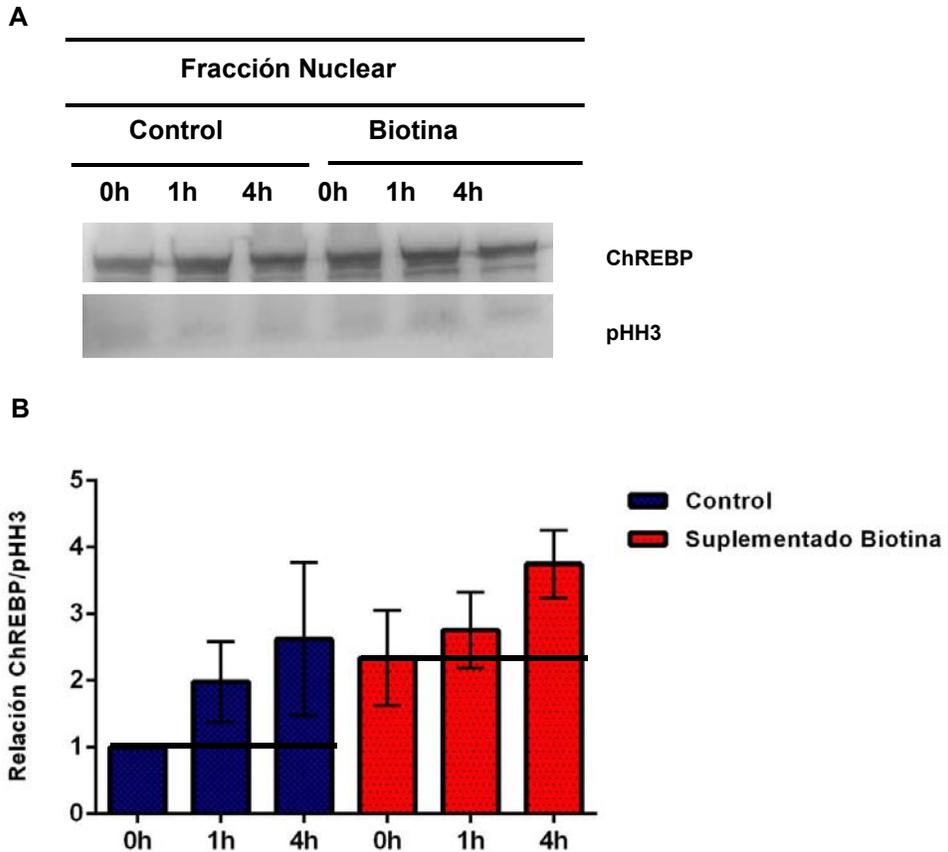


**Figura 10. Presencia del factor transcripcional ChREBP en fracciones nucleares de hígado de ratón de la cepa BALB/cAnN.** Western blot representativo de la translocación de ChREBP como respuesta a la administración de 6 g de glucosa/Kg de peso de ratón con respecto al tiempo. Como proteína de referencia nuclear fue utilizada pHH3.

## **8.6 Efecto de la suplementación con biotina sobre la translocación del factor transcripcional ChREBP hacia el núcleo en respuesta a glucosa con respecto al tiempo**

Una vez montada la metodología para determinar el curso temporal de la translocación de ChREBP, se procedió a analizar cuál es el efecto de la suplementación de la vitamina sobre la translocación de este factor transcripcional. En extractos nucleares provenientes de ratones que recibieron la dieta con y sin biotina durante 8 semanas se analizó la expresión proteica de ChREBP al tiempo 0, así como a 1 y 4 horas después de la administración de la glucosa.

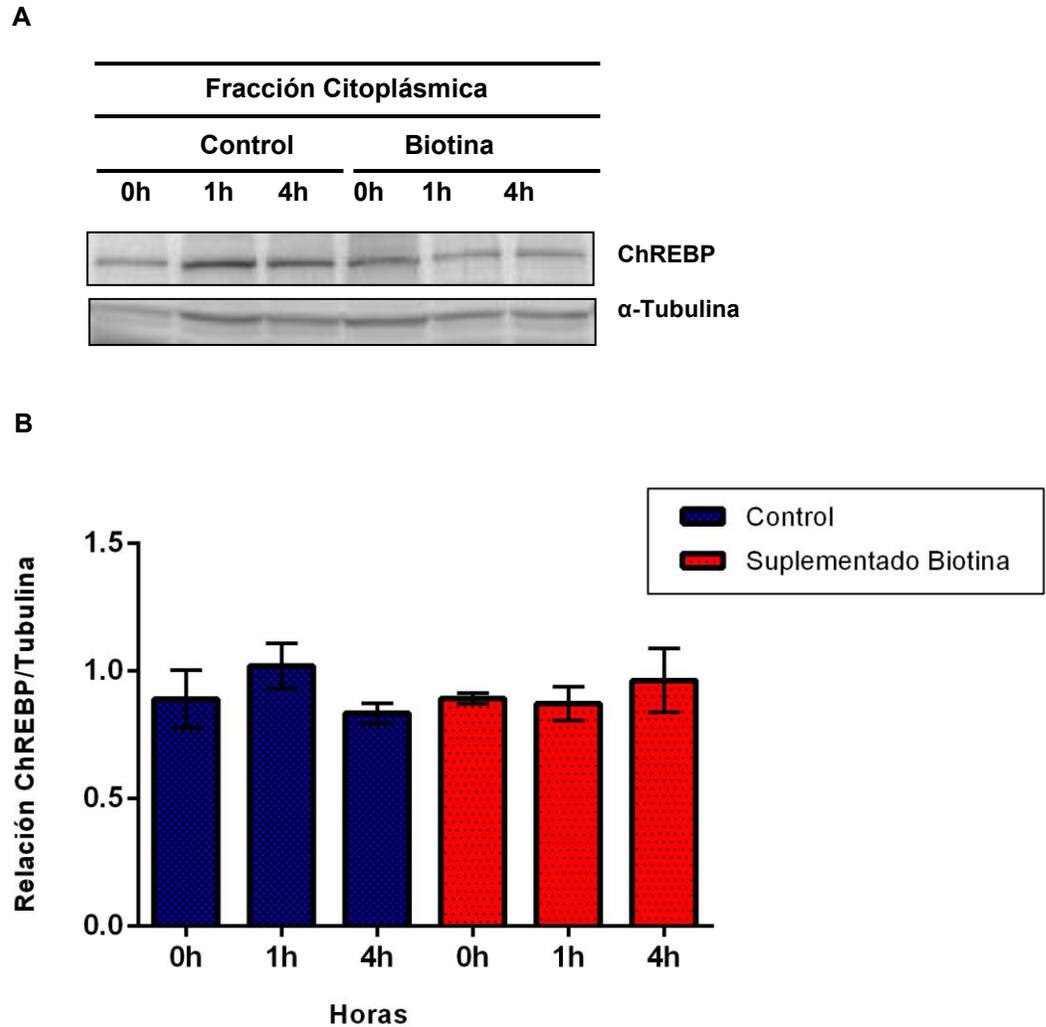
Como se muestra en la Figura 11, si bien, la suplementación con biotina aumentó la presencia de ChREBP en el núcleo con respecto al grupo control en cada uno de los tiempos analizados, esta diferencia no fue significativa ( $P = >0.05$ ). Igualmente, el curso temporal del efecto de la glucosa, reveló una translocación más pronunciada en el grupo control que en el grupo suplementado, sin embargo, el análisis estadístico tampoco mostró diferencias significativas.



**Figura 11. Efecto de la suplementación con biotina sobre la translocación del factor transcripcional ChREBP en respuesta a glucosa con respecto al tiempo.**

**A.** Western blot representativo de fracciones nucleares de hígado de ratón de la cepa BALB/cAnN tratados con una dieta control o suplementada con biotina, a los que una vez terminado el tratamiento, se les administraron 6 g de glucosa/Kg de peso de ratón. Como proteína de referencia nuclear fue utilizada pHH3. **B.** Análisis densitométrico de la translocación de ChREBP en fracciones nucleares del grupo control y suplementado. Los datos de la gráfica representan la media  $\pm$  EE de 3 ratones. ANOVA de dos vías,  $P=0.0763$ .

### 8.7 Efecto de la suplementación con biotina sobre la presencia del factor transcripcional ChREBP en el citoplasma en respuesta a glucosa con respecto al tiempo



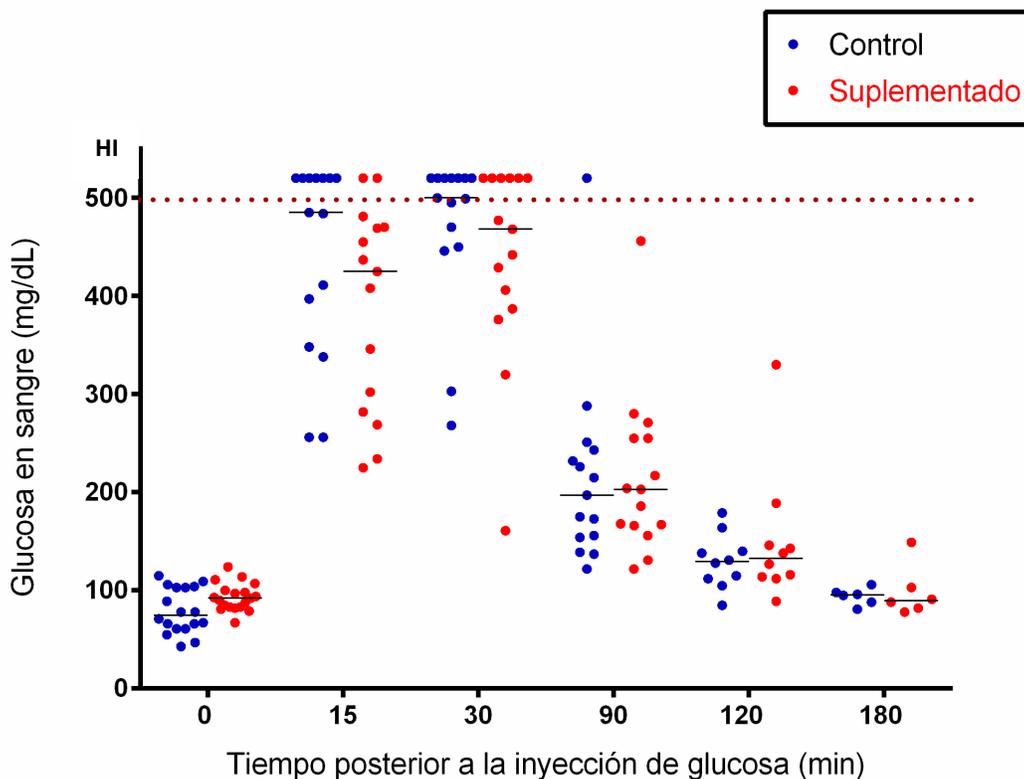
**Figura 12. Efecto de la suplementación con biotina sobre la presencia del factor transcripcional ChREBP en fracciones citoplásmicas de hígado de ratón de la cepa BALB/cAnN. A.** Western blot representativo de la fracción citoplásmica de hígado de ratón tratado con una dieta control o suplementada con biotina durante 8 semanas después del destete, a los que se les administraron 6 g de glucosa/Kg de peso de ratón. Como proteína de referencia citoplásmica fue utilizada  $\alpha$ -Tubulina. **B.** Análisis densitométrico de la presencia de ChREBP de la fracción citoplásmica del grupo control y suplementado con biotina. Los datos de la gráfica representan la media  $\pm$  EE de 3 ratones. ANOVA de dos vías,  $P=0.4095$ .

Como contraparte del estudio anterior también se analizó la presencia del factor transcripcional de ChREBP en respuesta a la glucosa en las fracciones citoplásmicas obtenidas a partir de ratones que fueron tratados con una dieta control y/o suplementada con biotina durante 8 semanas. Los resultados

mostraron bandas del factor ChREBP de intensidad semejante entre los dos grupos (Figura 12).

### 8.8 Efecto de la suplementación con biotina sobre el curso temporal de las concentraciones de glucosa sanguínea

Estos experimentos se complementaron con el análisis del curso temporal de las concentraciones de glucosa sanguínea durante el período de inyección de 6 g de glucosa/Kg de peso corporal vía intraperitoneal. Los resultados obtenidos se



**Figura 13. Determinación de glucosa sanguínea en un curso temporal después de la administración de glucosa intraperitoneal en ratones de la cepa BALB/cAnN tratados con una dieta control o suplementada con biotina durante 8 semanas después del destete. Los ratones recibieron una inyección intraperitoneal de 6 g de glucosa/Kg de peso corporal. En cada punto de la curva se muestra la distribución del conjunto de datos respecto a la mediana tanto para el grupo control (círculos azules) como grupo suplementado con biotina (círculos rojos).**

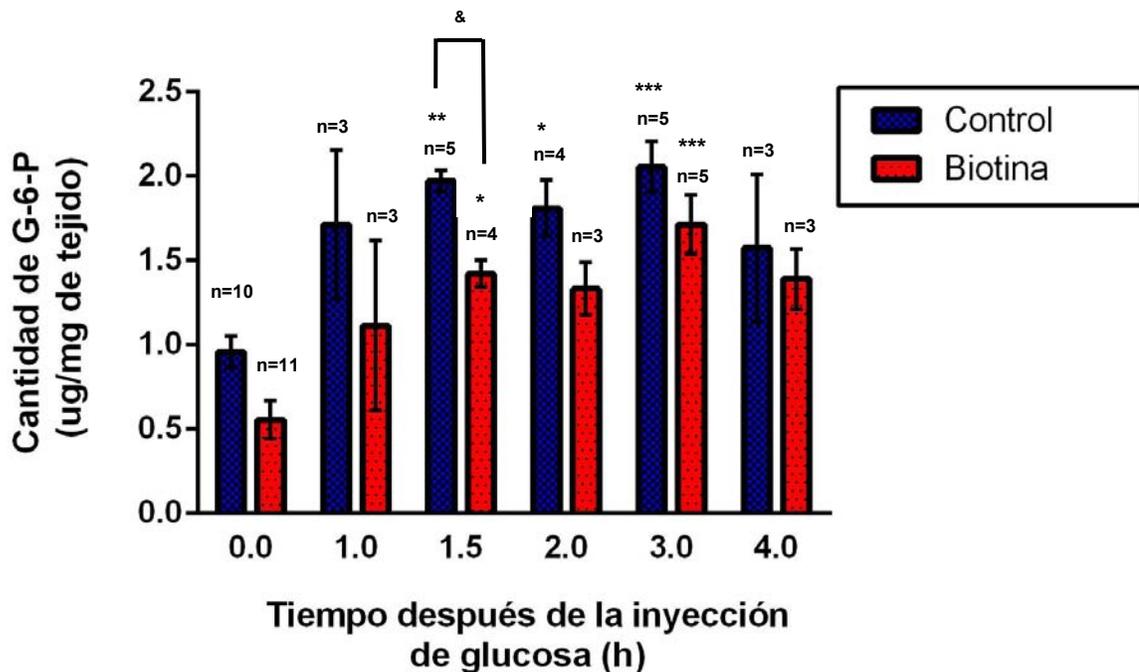
muestran en la Tabla 1 y en la Figura 12. Estos son reportados como frecuencias relativas debido a que la detección del glucómetro usado presentó una sensibilidad máxima de 500 mg/dL, siendo las cantidades mayores reportadas por el equipo con la leyenda “HI” (Figura 13). Los resultados mostraron que a los 15 minutos después de la inyección de glucosa, la frecuencia relativa de las concentraciones de glucosa fue de 26.7% (Tabla 1), sin embargo para el grupo control, la mayoría de las concentraciones de glucosa sanguínea fueron mayores a 500 mg/dL (Figura 13) con una frecuencia relativa de 46.7% (Tabla 1). No fueron hasta los 30 minutos después de la aplicación de glucosa cuando las concentraciones de glucosa sanguínea de la mayoría de los ratones del grupo suplementado sobrepasaron los 500 mg/dL (frecuencia relativa del 40%) al igual que las concentraciones de glucosa para el grupo control (frecuencia del 46.7%) (Figura 13).

Rangos (mg/dL)	GRUPO CONTROL						GRUPO SUPLEMENTADO					
	0 min	15 min	30 min	90 min	120 min	180 min	0 min	15 min	30 min	90 min	120 min	180 min
n	18	15	15	15	10	6	19	15	15	15	10	6
40 -100	66.6				10.0	83.3	78.9				10.0	66.7
101 -150	33.3			20.0	70.0	16.7	21.1		6.7	13.3	70.0	33.3
151- 200				33.3	20.0					33.3	10.0	
201 -250		13.3		26.7				13.3		20.0		
251 - 300			6.7	13.3				13.3		26.7	10.0	
301 - 350		13.3	6.7					13.3	6.7			
351 - 400		6.7							13.3			
401 - 450		6.7	13.3					20.0	20.0			
451 - 500		13.3	26.7	6.7				26.7	13.3	6.7		
mayor 500		46.7	46.7					13.3	40.0			

**Tabla 1. Distribución de las frecuencias relativas (%) de las concentraciones de glucosa con respecto al tiempo después de la aplicación de glucosa intraperitoneal en ratones de la cepa BALB/cAnN. Se aplicaron 6 g de glucosa/Kg de peso corporal vía intraperitoneal, a ratones tratados con una dieta control o suplementada con biotina durante 8 semanas después del destete.**

### 8.9 Efecto de la suplementación con biotina sobre la cantidad de glucosa-6-fosfato en hígado de ratón

Como se ha descrito en la introducción uno de los inductores propuestos como regulador de la transcripción del factor transcripcional ChREBP es la glucosa-6-fosfato (Iizuka *et al.*, 2013, Dentin *et al.*, 2012 y Arden *et al.*, 2012) por lo que se decidió analizar el efecto de la suplementación con biotina sobre la cantidad de este metabolito en hígado de ratones a los cuales se les dio la dieta control y la dieta suplementada durante 8 semanas, al finalizar se les aplicaron 6 g de glucosa/Kg de peso corporal vía intraperitoneal. Dicho análisis se realizó a las 1.0, 1.5, 2, 3 y 4 horas después de la administración de glucosa y al tiempo 0 donde los ratones no recibieron glucosa.



**Figura 14. Efecto de la suplementación con biotina sobre la cantidad de glucosa-6-fosfato en hígado de ratón de la cepa BALB/cAnN.** Los datos de la gráfica representan la media  $\pm$  EE de varios ratones. ANOVA de dos vías, diferencias significativa por tiempo (\*, \*\*, \*\*\*  $P < 0.05$ ) y por tratamiento (&  $P = 0.0421$ ).

Los resultados encontraron que la administración de glucosa aumentó la concentración de glucosa-6-fosfato con respecto al tiempo (Figura 14). En tanto

que la comparación entre los grupos reveló que la concentración de glucosa-6-fosfato fue significativamente menor en el grupo suplementado a las 1.5 horas ( $P=0.0421$ ) con respecto al grupo control (Figura 14).

## 9. DISCUSIÓN

En estudios previos se demostró que la suplementación con biotina en la dieta durante un período de ocho semanas disminuyó en el hígado la expresión del ARN mensajero del factor transcripcional lipogénico SREBP-1c, y de enzimas reguladas por este factor como la acetil-CoA carboxilasa 1 y la ácido graso sintasa (Larrieta *et al.*, 2010). Sin embargo, se observó otras enzimas que también se encuentran bajo la regulación de SREBP-1c, como son glucocinasa hepática y estearoil-CoA desaturasa, no fueron modificadas por el tratamiento, lo que sugiere que otros factores transcripcionales podrían estar compensando la reducción de SREBP-1c. Esta compensación podría estar dada por el factor transcripcional ChREBP que en conjunto con SREBP-1c regula la expresión de genes lipogénicos. En este trabajo se analizó el efecto de la suplementación con biotina en la dieta sobre el factor transcripcional ChREBP.

En el mismo modelo experimental en que se obtuvieron los datos que dan origen al presente estudio encontramos que la administración de una dieta suplementada con biotina durante ocho semanas no modificó significativamente el ARN mensajero de ChREBP, ni sus concentraciones proteicas citoplásmicas en condiciones de ayuno.

Debido a que los anticuerpos existentes para la detección de ChREBP no discriminan entre la forma activa o inactiva fue necesario establecer una estrategia para la detección de la forma activa, debido a que concentraciones altas de glucosa producen la translocación nuclear de ChREBP (Kawaguchi *et al.*, 2001, Ishii *et al.*, 2004), quien de esta manera se une a sus elementos de respuesta en el ADN regulando así la transcripción de sus genes blanco. Como un indicativo de la forma activa de la proteína se planteó analizar la presencia del factor

transcripcional, para la cual se administraron concentraciones altas de glucosa para activar la translocación de ChREBP hacia el núcleo. El grupo de Postic reportó una dosis de 5 g de glucosa/Kg de peso por ratón de la cepa C57BL/6J vía oral para lograr tal efecto (Guinez *et al.*, 2011). Debido a que en nuestros experimentos se realizaron en ratones BalbC, y diversos estudios han encontrado que esta cepa es menos sensible a la glucosa y a desarrollar síndrome metabólico (Montgomery *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2000; Cardinal *et al.*, 1998; Coleman *et al.*, 2012), en nuestro laboratorio decidimos utilizar una cantidad de 6 g de glucosa/Kg de peso, la cual se administró vía intraperitoneal. Los resultados obtenidos en los experimentos sobre el efecto de translocación del factor transcripcional ChREBP en un curso temporal encontraron un aumento en la presencia proteica de ChREBP en el núcleo, posteriormente la presencia de la proteína disminuyó a las 6 horas, tiempo máximo utilizado en estos experimentos. Un resultado similar lo obtuvo el grupo de Guinez y cols. (2011) quienes reportaron por medio de inmunofluorescencia en secciones de hígado de ratón sobre el efecto de la translocación nuclear de ChREBP a las 4 y 8 horas como respuesta a una carga de glucosa oral.

Una vez que logramos observar el efecto de translocación de ChREBP por inducción de glucosa, analizamos el efecto de la suplementación con biotina sobre la translocación de este factor. Como se ha descrito, existen dos isoformas para este factor: ChREBP  $\alpha$  que se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma y ChREBP  $\beta$  que se encuentra únicamente en el núcleo (Herman *et al.*, 2012). Si bien nuestros resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la translocación de ChREBP se observó un aumento en su expresión en el núcleo aún en ausencia de la estimulación con glucosa (tiempo 0) lo que sugiere que la isoforma  $\beta$  está incrementada en respuesta a la suplementación con biotina. Por otro lado, los aumentos, si bien discretos, de ChREBP en el núcleo inducida por la glucosa administrada podrían ser el resultado de la isoforma translocable alfa. Sin embargo, dado que se desconoce la rapidez de transcripción y traducción de la isoforma beta en respuesta a la glucosa, no se puede descartar la posibilidad

de que sea inducción en la expresión de ésta la responsable del aumento. Es por lo tanto necesario realizar experimentos para diferenciar el tipo de isoforma del factor transcripcional para llegar a una conclusión, así como para profundizar en la observación de la falta de cambios de ChREBP en el citoplasma.

En nuestro estudio también analizamos el efecto de la suplementación con biotina sobre las concentraciones de glucosa sanguínea en los ratones a los que se les administró glucosa. Los resultados revelaron que el grupo suplementado mostró diferencias menores en niveles de glucosa por arriba de 500 mg/dL que los ratones control a los 15 y 30 minutos, siendo la suma de las frecuencias a estos tiempos de 93.4 en el grupo control y de 53.4 en el grupo suplementado. Interesantemente, en el grupo suplementado se observó una mayor frecuencia de ratones con niveles de glucosa por arriba de 500 mg/dL a los 30 minutos con respecto a los 15 minutos, lo que sugiere un retardo en la absorción de la glucosa administrada. Se necesitarán otros estudios para dilucidar los mecanismos que participan en este efecto.

Si bien existen discrepancias sobre la señal de translocación de ChREBP hacia el núcleo (Kabashima *et al.*, 2003, Dentin *et al.*, 2012 y Li *et al.*, 2010), estudios recientes han reportado a la glucosa-6-fosfato como un inductor de ésta. Por ello, fue también de nuestro interés analizar las concentraciones de uno de los inductores propuestos en la translocación, la glucosa-6-fosfato. En esta serie de experimentos se analizó el curso temporal del efecto de la suplementación con biotina sobre la cantidad de la glucosa-6-fosfato después de la aplicación de glucosa. Los resultados mostraron menores concentraciones de glucosa-6-fosfato en el grupo suplementado ( $P < 0.05$ ). La menor concentración de este metabolito no es acorde con la tendencia del aumento observado de ChREBP en el núcleo en particular en ayuno, lo que podría apoyar que es la forma beta del factor transcripcional la que se encuentra aumentada.

Dado que existen discrepancias sobre la señal de translocación de ChREBP hacia el núcleo (Kabashima *et al.*, 2003, Dentin *et al.*, 2012 y Li *et al.*, 2010) sería

interesante evaluar otros de los metabolitos putativos de esta acción como la xilulosa-5-fosfato (Kabashima *et al.*, 2003, Iizuka *et al.*, 2013 y Towle *et al.*, 1997) y la fructosa-2,6-bisfosfato (Iizuka *et al.*, 2013 y Arden *et al.*, 2012), así como modificaciones postraduccionales como fosforilación/desfosforilación, acetilación y acetilglucosaminación (Iizuka *et al.*, 2013), que se han propuesto como mecanismos participantes en la translocación. Por otro lado, resulta interesante señalar que en estudios previos en nuestro laboratorio, la suplementación con biotina aumentó la expresión del ARNm de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) (Larrieta *et al.*, 2010), una enzima de la vía de las pentosas. Este efecto podría estar aumentando el rápido consumo de glucosa-6-fosfato y podría estar aumentando la formación de xilulosa-5-fosfato en la vía de las pentosas, uno de los metabolitos propuestos para la translocación nuclear de ChREBP.

Kamaguchi y cols. (2002) reportaron que un aumento de la proteína sensora de energía AMPK inhibió la unión al DNA de ChREBP y por consiguiente su actividad. Estudios en nuestro laboratorio demostraron que la suplementación con biotina aumentó tanto la masa proteica como la abundancia de la forma fosforilada de AMPK (Aguilera-Méndez *et al.*, 2012). Por consiguiente debido a la suplementación con biotina en nuestros estudios, la presencia de ChREBP en las fracciones nucleares debería ser menor con respecto al grupo control, pero encontramos el efecto contrario, sin embargo no se analizó la unión de ChREBP al DNA por lo que es necesario otros experimentos que demuestren que la presencia de ChREBP en el núcleo es funcional.

De acuerdo con nuestro planteamiento del problema, los resultados de este trabajo no permiten concluir que los efectos de la biotina sobre ChREBP se encuentren compensando la disminución de SREBP-1c en la regulación de la transcripción de genes lipogénicos: glucocinasa, esteroil-CoA desaturasa y de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Es posible que otros factores transcripcionales o mecanismos que participan en la regulación de la lipogénesis, como LXR se encuentren participando, en particular para la esteroil-

CoA desaturasa, gen cuya expresión se sabe es regulado por este factor transcripcional (Calkin A.C.and Tontonoz P. 2012, Schultz J.R. *et. al.*, 2000).

## **10. CONCLUSIONES**

La suplementación con biotina no modifica la expresión del ARN mensajero ni de la proteína del factor transcripcional ChREBP en condiciones de ayuno.

La suplementación con biotina no modifica las concentraciones del factor transcripcional ChREBP en el citoplasma en condiciones de ayuno ni después de la administración de glucosa.

La suplementación con biotina tiende a aumentar la presencia de ChREBP en el núcleo tanto en ayuno como inducido por glucosa. Sin embargo, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas.

La suplementación con biotina disminuye significativamente la cantidad de glucosa-6-fosfato en el hígado de ratón.

## **11. PERSPECTIVAS**

Determinar la expresión del ARNm de las isoformas de ChREBP.

Analizar la expresión proteica de las isoformas de ChREBP por estudios de Western-blot en las fracciones celulares citoplásmicas y nucleares.

Analizar la translocación de ChREBP por técnicas de microscopía por inmunofluorescencia.

Analizar la participación de otros factores transcripcionales que pudiesen estar contrarrestando la reducción de SREBP-1c, en la expresión de glucocinasa hepática, de la estearoil-CoA desaturasa y de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

## 12. BIBLIOGRAFIA

AbouRjaili G., Shtaynberg N., Wetz R., Costantino T., Abela G.S. (2010) Current concepts in triglyceride metabolism, pathophysiology and treatment. *Metabolism* 59(8):1210-1220.

Aguilera-Méndez, A., and Fernández-Mejía, C. (2012) The hypotriglyceridemic effect of biotin supplementation involves increases levels of cGMP and AMPK activation. *BioFactor*. 38, 387-394.

Albarracin, C., Fuqua, B., Geohas, J., *et al.* (2005) Improvement in glycemic control, lipids and insulin sensitivity with the combination of chromium picolinate and biotin in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes care*. 54, (S):A428.

Álvarez-Delgado C., Mendoza-Rodriguez C.A., Picazo O. y Cerbón M. (2010) Different expression of alpha and beta mitochondrial estrogen receptors in the aging rat brain: interaction with respiratory complex V. *Exp. Gerontol*. 45, 580-585.

Ameer F., Scanduzzi L., Hasnain S., Kalbacher H., and Zaidi N. (2014) De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism* 63(7): 895-902.

Arden C., Tudhope S.J., Petrie J.L., Al-Oanzi Z.H., Cullen K.S., *et al.* (2012) Fructose 2,6-biphosphate is essential for glucose-regulated gene transcription of glucose-6-phosphate and other ChREBP target genes in hepatocytes. *Biochem. J*. 443, 111-123.

Baez-Saldana, A., Zendejas-Ruiz, I., Revilla-Monsalve, C., *et al.* (2004) Effects of biotin on pyruvate carboxylase, acetyl-CoA carboxylase, propionyl-CoA carboxylase, and markers for glucose and lipid homeostasis in type 2 diabetic patients and nondiabetic subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 238-243.

Baez-Saldana A., Camacho-Arroyo I., Espinosa-Aguirre J.J., Neri-Gómez T., Rojas-Ochoa A., Guerra-Araiza C., Larrieta E., Vital P., Díaz G., Chavira R., Fernandez-Mejia C. (2009) Biotin deficiency and biotin excess: effects on the female reproductive system. *Steroids* 74, 863-869.

Baranowski, M. (2008) Biological role of liver X receptors. *J. Physiol. Pharmacol.* 59, Suppl (7) 31-5554.

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

Bergmeyer Hans-Ulrich; Hohorst Hans-Jürgen. D-Glucose-6-phosphate and D-fructose-6-phosphate in Methods of Enzymatic Analysis. Verlag Chemie GmbH, Weinheim, German. 1963.

Bjorntorp P and Sjostrom L. (1978) Carbohydrate storage in man: speculations and some quantitative considerations. *Metabolism* 27(12 Suppl.2):1853-1865.

Borboni, P., Magnaterra, R., Rabini, R.A., Staffolani, R., Porzio, O., Sesti, G., Fusco, A., Mazzanti, L., Lauro, R., and Marlier, L.N.J.L. (1996) Effect of biotin on glucokinase activity, mRNA expression and insulin release in cultured beta-cells. *Acta Diabetol.* 33, 154–158.

Bricambert J., Miranda J., Benhamed F., Girard J., Postic C., and Dentin R. (2010) Salt-inducible kinase 2 links transcriptional coactivator p300 phosphorylation to the prevention of ChREBP dependent hepatic steatosis in mice. *J. Clin. Invest.* 120, 4316-4331.

Calkin A.C. and Tontonoz P. (2012) Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* Vol (13(4), 213-224.

Cardinal J.W., Allan D.J., and Cameron D.P. (1998) Differential metabolite accumulation may be the cause of strain differences in sensitivity to streptozotocin-induced cell death in inbred mice. *Endocrinology* 139, 2885–2891.

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

Coggeshall, J.C., Heggors, J.P., Robson, M.C., *et al.* (1985) Biotin Status and Plasma Glucose in Diabetics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 447, 389-392.

Coleman D.L. and Hummel K.P. (2012) The influence of genetic background on the expression of the obese (Ob) gene in the mouse. *Diabetologia.* 9(4), 287-293.

Combs G.F. (1992) Biotin. In: *The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health.* Academic Press Inc. USA. p. 329–43.

da Silva Xavier G., Rutter G.A., Diraison F., Andreolas C., and Leclerc I. (2006) Carbohydrate responsive-element binding protein (ChREBP) binding to fatty acid synthase and L-type pyruvate kinase genes is stimulated by glucose in pancreatic MIN6 cells. *J. Lipid. Res.* 47, 2482-2491.

Dakshinamurti, K., and Chauhan, J. (1994) Biotin-binding proteins. In *Vitamins Receptors: Vitamins as Ligands in Cell Communication* (Dakshinamurti, K., ed.). pp. 200-249, Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Dakshinamurti K., Tarrago-Litvak L., Hong H.C. (1970) Biotin and glucose metabolism *Can.J. Biochem.* 48(4), 493-500.

Davies M.N., O'Callaghan B.L., and Towle H.C. (2010) Activation and repression of glucose-stimulated ChREBP requires the concerted action of multiple domains within the MondoA conserved region. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 299, E665-E674.

Dentin, R., Benhamed F., Pégrier J.P., Foufelle F., Viollet B., Vaulont S., Girard J., and Postic C. (2005) Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation. *J. Clin. Invest.* 115, 2843-2854.

Dentin, R., Tomas-Cobas, L., Foufelle, F., Leopold, J., Girard, J., Postic, C., and Ferré, P. (2012) Glucose 6-phosphate, rather than xilulose 5-phosphate, is required for the activation of ChREBP in response to glucose in the liver. *J. Hepatol.* 56, 199-209.

Dokusova, O.K., and Klimov, A.N. (1967) Prevention of the development of experimental atherosclerosis by biotin. *Dokl Akad Nauk SSSR*. 172, 1454-1456.

Dokusova, O.K., and Krivoruchenko, I.V. (1972) The effect of biotin on the level of cholesterol in the blood of patients with atherosclerosis and essential hyperlipidemia. *Kardiologiya*. 12, 113.

Dubuquoy C., Robichon C., Lasnier F., Langlois C., Dugail I., Fougelle F., Girard J., Burnol A.F., Postic C., Moldes M. (2011) Distinct regulation of adiponutrin/PNPLA3 gene expression by the transcription factors ChREBP and SREBP1c in mouse and human hepatocytes. *J. Hepatol*. 55, 145-153.

Fernandez-Mejia, C., and Lazo de la Vega, M.L. (2010) Biological effects of pharmacological concentrations of biotin. *J. Evid. Comp. Altern. Med*. 16, 40-48.

Fernandez-Mejia, C. (2005) Pharmacological effects of biotin. *J. Natl. Biochem*. 16, 424-427.

Filhoulaud G., Guilmeau S., Dentin R., Girard J., and Postic C. (2013) Novel insights into ChREBP regulation and function. *Trends Endocrinol. Metab*. 24(5), 257-268.

Food and Nutrition Board. (1998) Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. 374-389 (National Academic Press, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, Washington, DC, 1998).

Fougelle, F., and Ferre, P. (2002) New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochem J*. 366(Pt 2), 377-391.

Fukasawa M., Ge Q., Wynn R.M., Ishii S., and Uyeda K. (2010) Coordinate regulation/localization of the carbohydrate responsive binding protein (ChREBP) by

two nuclear export signal sites: discovery of a new leucine-rich nuclear export signal site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391, 1166-1169.

Ge Q., Nakagawa T., Wynn R.M., Chook Y.M., Miller B.C., and Uyeda K. (2011) Importin- $\alpha$  protein binding to a nuclear localization signal of carbohydrate response element binding protein (ChREBP) *J. Biol. Chem.* 286, 28119-28127.

Geohas, J., Daly, A., Juturu, V., Finch M., and Komorowski J.R. (2007) Chromium picolinate and biotin combination reduces atherogenic index of plasma in patients with type 2 diabetes mellitus: a placebo-controlled, double-blinded, randomized clinical trial. *Am. J. Med. Sci.* 333, 145-153.

Girard J., Ferré P., and Foufelle F., (1997) Mechanisms by which carbohydrates regulates expression of genes for glycolytic and lipogenic enzymes. *Annu. Rev. Nutr.* 17, 325-352.

Guinez C., Fillhoulaud G., Rayah-Benhamed F., Marmier S., Dubuquoy C., Dentin R., Moldes M., Burnol A.F., Yang X., Lefebvre T., Girard J., and Postic C. (2011) O-GlcNAcylation increases ChREBP protein content and transcriptional activity in the liver. *Diabetes* 60, 1399-1413.

Guyton, editor (2000) Textbook of medical physiology 10<sup>th</sup> ed. W.B. Saunders Company, p 1064.

Havula E., and Hietakangas V. (2012) Glucose sensing by ChREBP/Mondo A-Mlx transcription factor. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 23, 640-647.

Hemmati M., Babaei H., and Abdolsalehei M. (2013) Survey of the effect of biotin on glycemic control and plasma lipid concentrations in Type 1 Diabetic Patients in Kermanshahin in Iran (2008-2009). *Oman Medical Journal* 28 (3), 195-198.

Herman M.A., Peroni O.D., Villoria J., Schön M.R., Abumrad N.A., Blüher M., Klein S., and Kahn B.B. (2012) A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism. *Nature* 484, 333-338.

Iizuka K., Takeda J., Horikawa Y., (2009) Hepatic overexpression of dominant negative Mlx improves metabolic profile in diabetes-prone C57BL/6J mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379, 499-504.

Iizuka K., Bruick R.K., Liang G., Horton J.D., and Uyeda K. (2004) Deficiency of carbohydrate response element binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 7281-7286.

Iizuka K., Miller B., and Uyeda K. (2006) Deficiency of carbohydrate-activated transcription factor ChREBP prevents obesity and improves plasma glucose control in leptin-deficient (*ob/ob*) mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 291, E358-E364.

Iizuka K., and Horikawa Y. (2008) ChREBP: a glucose-activated transcription factor involved in the development of metabolic syndrome. *Endocr. J.* 55, 617-624.

Iizuka K., Wu W., Horikawa Y., and Takeda J. (2013) Role of glucose-6-phosphate and xylulose-5-phosphate in the regulation of glucose-stimulated gene expression in the pancreatic  $\beta$  cell line, INS-1E. *Endocr. J.* 60. 473-482.

Ishii S., Iizuka K., Miller B.C., and Uyeda K. (2004) Carbohydrate response element binding protein directly promotes lipogenic enzyme gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 15597-15602.

Kabashima T., Kawaguchi T., Wadzinski B.E., and Uyeda K. (2003) Xylulose 5-phosphate mediates glucose-induced lipogenesis by xylulose 5-phosphate-activated protein phosphatase in rat liver. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 5107–5112.

Kasper D., Braunwald E., Fauci A., Hauser S., Longo D., Jameson J.L. editores (2005) Harrison's principles of internal medicine. Mc Graw Hill. P 2286-2298.

Kawaguchi T., Osatomi K., Yamashita H., Kabashima T., and Uyeda K. (2002) Mechanism for fatty acid "sparring" effect on glucose-induced transcription:

Regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 277, 3829-3835.

Kawaguchi T., Takenoshita M., Kabashima T., and Uyeda K. (2001) Glucose and cAMP regulate the L-type pyruvate kinase gene by phosphorylation/dephosphorylation of the carbohydrate response element binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 13710–13715.

Knowles, J.R. (1989) The mechanism of biotin-dependent enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 58, 195-221.

Koutsikos D., Fourtounas C., Kapetanaki A., Agroyannis B., Tzanatos H., Rammos G., Kopelias I., Bosiolis B., Bovoleti O., Darema M., and Sallum G. (1996) Oral glucose tolerance test after high-dose i.v. biotin administration in normoglycemic hemodialysis patients. *Ren. Fail.* 18, 131-137.

Larrieta E., Velasco F., Vital P., López-Aceves T., Lazo-de-la-Vega-Monroy M.L., Rojas A., and Fernández-Mejía Cristina. (2010) Pharmacological concentrations of biotin reduce serum triglycerides and the expression of lipogenic genes. *Eur. J. Pharmacol.* 644, 263-268.

Lazo de la Vega-Monroy M.L., Larrieta E., German M.S., Baez-Saldana A. and Fernandez-Mejia C. (2013) Effects of biotin supplementation in the diet on insulin secretion, islet gene expression, glucose homeostasis and beta-cell proportion. *J Nutr Biochem* 24(1), 169-177.

Li M.V, Chang B., Imamura M., Pongvarin N., and Chan L. (2006) Glucose-dependent transcriptional regulatory by an evolutionarily conserved glucose-sensing module. *Diabetes* 55, 1179-1189.

Li M.V., Chen W., Pongvarin N., Imamura M. and Chan L. (2008) Glucose-mediated transactivation of carbohydrate response element-binding protein requires cooperative actions from Mondo conserved regions and essential trans-acting factor 14-3-3. *Mol. Endocrinol.* 22, 1658-1672.

Li M.V., Chen W., Harmancey R.N., Nuotio-Antar A.M., Imamura M. et al (2010) Glucose-6-phosphate mediates activation of carbohydrate responsive binding protein (ChREBP). *Biochem Biophys. Res. Commun.* 395, 395-400.

Livak Kenneth J. and Schmittgen Thomas D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ . *Methods.* 25, 402-408.

Ma L., Tsatsos N.G., and Towle H.C. (2005) Direct role of ChREBP/Mlx in regulating hepatic glucose-responsive genes. *J. Biol. Chem.* 280, 12019-12027.

Ma L., Robinson L.N., and Towle H.C. (2006) ChREBP\**Mlx* is the principal mediator of glucose-induced gene expression in the liver. *J. Biol. Chem.* 281, 28721-28730.

Marshall, M.W., Haubrich, M., Washington, V.A., Chang M.W., Young C.W. and Wheeler M.A. (1976) Biotin status and lipid metabolism in adult obese hypercholesterolemic inbred rats. *Nutr. Metab.* 20, 41-61.

Marshall, M.W., Kliman, P.G., Washington, V.A., Mackin, J.F., and Weinland, B.T. (1980) Effects of biotin on lipids and other constituents of plasma of healthy men and women. *Artery* 7, 330-351.

Marshall M.W., Smith B.P., and Lehmann R.P. (1969) Dietary response of two genetically different lines of inbred rats: lipids in serum and liver. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 131, 1271-1277.

Maebashi, M., Makino, Y., Furukawa, Y., et al. (1993) Therapeutic Evaluation of the Effect of Biotin on Hyperglycemia in Patients with Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 14, 211-218.

McMahon R.J. (2002) Biotin in metabolism and molecular biology. *Annu Rev. Nutr.* 22,221-239.

Mock D.M. and Malik M.I. (1992) Distribution of biotin in human plasma: most of the biotin is not bound to protein. *Am. J. Clin. Nutr.* 56, 427-432.

Mock D.M. (2006) Biotin. In *Modern Nutrition in Health and Disease* (eds. Shils, M.E., Shike, M., Ross, A.C., Caballero, B. and Cousins, R.J.) 498-506 (Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, M.D. USA).

Montgomery M.K., Hallahan N.L., Brown S.H., Liu M., Mitchell T.W., Cooney G.J., and Turner N. (2013) Mouse strain-dependent variation in obesity and glucose homeostasis in response to high-fat feeding. *Diabetologia.* 56(5), 1129-1139.

Pedersen K.B., Zhang P., Doumen C., Charbonnet M., Lu D., Newgard C.B., Haycock J.W., Lange A.J., and Scott D.K. (2007) The promoter for the gene encoding the catalytic subunit of rat glucose-6-phosphatase contains two distinct glucose-responsive regions. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292, E788-801.

Postic, C., Dentin, R., Denechaud, P.D., and Girard, J. (2007) ChREBP, a transcriptional regulator of glucose and lipid metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 27, 179-192.

Proctor, G., Jiang T., Iwahashi M., Wang Z., Li J., and Levi M. (2006) Regulation of renal fatty acid and cholesterol metabolism, inflammation, and fibrosis in Akita and OVE26 mice with type 1 diabetes. *Diabetes* 55, 2502-2509.

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

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

Rodriguez-Melendez R. and Zempleni J. (2003) Regulation of genes expression by biotin (review). *J. Nutr. Biochem.* 14, 680-690.

Romero-Navarro, G., Cabrera-Valladares, G., German, M.S., Matschinsky F.M., Velazquez A., Wang J., and Fernandez-Mejia C. (1999) Biotin regulation of pancreatic glucokinase and insulin in primary cultured rat islets and in biotin-deficient rats. *Endocrinology.* 140, 4595-4600.

Sahin Kazim, Tuzcu Mehmet, Orhan Cemal, Sahin Nurhan, Kucuk Osman, Ozeran Ibrahim H., Juturu Vijaya and Komorowski James R. (2013) Anti-diabetic activity of chromium picolinate and biotin in rats with type 2 diabetes induced by high-fat diet and streptozotocin. *British Journal of Nutrition*, 110(2), 197–205.

Said H.M. (2009) Cell and Molecular Aspects of Human Intestinal Biotin Absorption. *J. Nutr.* 139, 158-162.

Said H.M. (2012) Biotin: Biochemical, Physiological and Clinic Aspects in *Water Soluble Vitamins. Clinical Research and Future Application* (ed. Stanger, O.) 1-20 Springer, London, U.K.

Sakiyama, H., Wynn R.M., Lee W.R., Fukasawa M., Mizuguchi H., Gardner K.H., Repa J.J., and Uyeda K. (2008) Regulation of nuclear import/export of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP): interaction of an alpha-helix of ChREBP with the 14-3-3 proteins and regulation by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 283, 24899-24908.

Schultz J.R., Tu H., Luk A., Repa J.J., Medina J.C., Li L., Schwendner S., Wang S., Thoolen M., Mangelsdorf D.J., Lustig K.D. and Shan B. (2000) Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev.* 14, 2831-2838.

Shih H.M., Liu Z., and Towle H.C. (1995) Two CACGTG motifs with proper spacing dictate the carbohydrate regulation of hepatic gene transcription. *J. Biol. Chem.* 270, 21991-21997.

Shriver B.J., Roman-Shriver C., and Allred J.B. (1993) Depletion and repletion of biotinyl enzymes in liver of biotin-deficient rats: evidence of a biotin storage system. *J. Nutr.* 123: 1140-1149.

Shwarz J.M., Linfoot P., Dare D., and Aghojanian K. (2003) Hepatic de novo lipogenesis in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects consuming high-fat, low-carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate isoenergetic diets. *Am J. Clin. Nutr* 77(1): 43-50.

Simmins P.H. and Brooks P.H. (1983) Supplementary biotin for sows: effect on reproductive characteristics. *Vet. Rec.* 112, 425-429.

Smith B., Andrews K., and West D. (2000) Macronutrient diet selection in thirteen mouse strains. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 278, R797–R805.

Spence, J.T., and Koudelka, A.P. (1984) Effects of biotin upon the intracellular level of cGMP and the activity of glucokinase in cultured rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 259, 6393–6396.

Stoeckman A.K., Ma L., and Towle H.C. (2004) Mlx is the functional heteromeric partner of the carbohydrate response element-binding protein in glucose regulation of lipogenic enzymes genes. *J. Biol. Chem.* 279, 15662-15669.

Stryer L., editor (1988) *Biochemistry*. 3rd ed. New York: WH Freeman and Co.

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

Towle H.C., Kaytor E.N., and Shin H.M. (1997) Regulation of the expression of lipogenic enzymes genes by carbohydrate. *Annu. Rev. Nutr.* 17,405-433.

Tsatsos N., Davies M.N., O'Callaghan B.J., and Towle H.C. (2008) Identification and function of phosphorylation in the glucose-regulated transcription factor ChREBP. *Biochem. J.* 411, 261-270.

Vilches-Flores, A., and Fernandez-Mejia, C. (2005) Efecto de la biotina sobre la expresión genética y el metabolismo. *Rev. Inv. Clin.* 57, 716-724.

Vilches-Flores, A., Tovar, A.R., Marin-Hernandez, A., Rojas-Ochoa, A., and Fernandez-Mejia, C. (2010) Biotin increases glucokinase expression via soluble guanylate cyclase/protein kinaseG, adenosine triphosphate production and autocrine action of insulin in pancreatic rat islets. *J. Nut. Biochem.* 21, 606-612.

Watanabe T. (1996) Morphological and biochemical effects of excessive amounts of biotin on embryonic development in mice. *Experientia* 52, 149-154.

Willy P.J., Umesono K., Ong E.S., Evans R.M., Heyman R.A. and Mangelsdorf D.J. (1995) LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev.* 9, 1033-1045.

Yamashita H., Takenoshita M., Sakurai M., Bruick R.K., Henzel W.J., Shillinglaw W., Arnot D., and Uyeda K. (2001) A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrates metabolism in the liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 9116-9121.

Zempleni J., Wijeratne S.S.K., and Hassan Y.I. (2009) Biotin. *Int. Union of Biochem. and Mol. Biol.* 35(1) 36-46.

Zempleni J. (2005) Uptake, localization, and noncarboxylase roles of biotin. *Annu Rev. Nutr.* 25, 175-196.

Zhang, H., Osada, K., Maebashi, M., Ito M., Komai M. and Furukawa Y. (1996) 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.* 42, 517-526.

Zhang, H., Osada, K., Sone, H., and Furukawa Y. (1997) Biotin administration improves the impaired glucose tolerance of streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 43, 271-280.