



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EFFECTO DE DOSIS FARMACOLÓGICAS DE BIOTINA EN EL METABOLISMO
DE GLUCÓGENO HEPÁTICO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:
ILEANA RAQUEL HERNÁNDEZ ARAIZA

TUTOR PRINCIPAL: DRA. CRISTINA FERNANDEZ MEJIA
Instituto de Investigaciones Biomédicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. ROCIO SALCEDA SACANELLES
Instituto de Fisiología Celular

DR. ROLANDO HERNANDEZ
Instituto de Fisiología Celular

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX agosto, 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/Instituto Nacional de Pediatría
UNAM

Y con la asesoría de:

Dra. Rocío Salceda Sacanelles

Departamento de Neurodesarrollo y Fisiología
Instituto de Fisiología Celular
UNAM

Dr. Rolando Hernández

Departamento de Biología Celular y del Desarrollo
Instituto de Fisiología Celular
UNAM

Jurado de Examen de Grado

PRESIDENTE

Dra. Verónica Guarmer Lans

Instituto Nacional de Cardiología

VOCAL

Dr. Rudolf Buijs

Instituto de Investigaciones Biomédicas

VOCAL

Dra. Victoria Chagoya de Sánchez

Instituto de Fisiología Celular

VOCAL

Dra. Nimbe Torres y Torres

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

SECRETARIO

Dra. Ileana Patricia Canto Cetina

Facultad de Medicina

El presente trabajo fue realizado en la Unidad de Genética de la Nutrición del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM/**Instituto Nacional de Pediatría**, bajo la tutoría de la **Dra. Cristina Fernández Mejía** y el comité tutorial integrado por la **Dra. Rocío Salceda Sacanelles** y el **Dr. Rolando Hernández Muñoz**. Durante los estudios de maestría, la autora de la tesis obtuvo apoyo del programa de **Posgrado en Ciencias Bioquímicas, UNAM**, y de los donativos de CONACyT 219787 y Fondos Federales 074/2013. La autora contó con una beca CONACyT para estudios de posgrado, CVU 549758.

Índice

Abreviaturas	2
Índice de figuras y tablas	3
I. Resumen.....	4
II. Introducción.....	6
1. Homeostasis de la glucosa.....	6
2. Transporte y metabolismo de la glucosa.....	8
2. 1. Transporte de glucosa.	8
2. 2. Metabolismo de la glucosa	9
3. El glucógeno.....	14
3.1. Estructura del glucógeno	14
3.2. Síntesis de glucógeno.	15
3. 3. Degradación del glucógeno.....	18
3.4. Regulación del metabolismo de glucógeno.	19
4. Glucagon.....	21
6. Biotina	22
6.1. Estructura y metabolismo.....	22
6.2. La biotina como cofactor de carboxilasas.....	23
6.3. La biotina en dosis farmacológicas.....	24
6.3.1. Efecto de dosis farmacológicas de biotina en la expresión de genes del metabolismo de glucosa y de lípidos	25
6.4. Efecto de dosis agudas de biotina en el contenido de glucógeno	26
III. Justificación	28
IV. Hipótesis.....	29
V. Objetivos	30
VI. Materiales y métodos	31
a) Modelo animal.....	31
b) Metodología	33
VII. Resultados	38
a) Control de crecimiento de los animales durante las ocho semanas del tratamiento.....	38
b) Registro del consumo de alimento durante las ocho semanas del tratamiento.....	39
c) Determinación de glucosa en sangre en ayuno.	40

d) Cuantificación del contenido de glucógeno hepático en ayuno.....	40
e) Cuantificación de la glucosa en sangre en respuesta a la administración de glucosa.	41
g) Análisis histológico del contenido de glucógeno hepático después de la administración de glucosa.....	43
h) Determinación de glucosa en sangre en respuesta a glucagon.....	45
j) Cuantificación del glucógeno hepático en respuesta a glucagon.	47
k) Concentración de glucosa-6-fosfato después de la administración de glucosa.	48
l) Cuantificación de glucógeno muscular en ayuno.	49
VIII. Discusión	50
IX. Conclusiones.....	54
X. Bibliografía.....	55

Abreviaturas

ACC	Acetil-CoA carboxilasa
ADG	Alta dosis de glucosa
AMPc	Adenosil monofosfato cíclico
ATP	Adenosil trifosfato
G1P	Glucosa-1-fosfato
G6P	Glucosa-6-fosfato
G6Pasa	Glucosa-6 fosfatasa
GK	Glucocinasa
GLUT	Transportador de glucosa
GS	Glucógeno sintasa
GP	Glucógeno fosforilasa
HK	Hexocinasa
MCC	β -metilcrotonil-CoA carboxilasa
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
PC	Piruvato carboxilasa
PCC	Propionil-CoA carboxilasa
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxicinasa
PFK1	Fosofruccinasa 1
PK	Piruvato cinasa
PKA	Protein cinasa dependiente de ATP
SGLT	Transportador de glucosa dependiente de sodio
UDP-glucosa	Uridina difosfato glucosa

Índice de figuras y tablas

Fig. 1. Se indican las cinco etapas de la homeostasis de glucosa.....	7
Fig. 2. Metabolismo hepático.....	14
Fig. 3. Representación de un corte transversal de una molécula de glucógeno con un dímero de glucogenina al centro.....	16
Fig. 4. Síntesis de glucógeno y estructura mostrando los enlaces α (1-4) y α (1-6).....	17
Fig. 5. Regulación por glucagon y epinefrina de la glucógeno sintasa y glucógeno fosforilasa.....	20
Fig. 6. El receptor a glucagon.	21
Fig. 7. Ubicación en la célula de las cuatro carboxilasas que usan biotina como cofactor...24	
Tabla 1. Las cinco fases de la glucosa descritas en la figura 1, de acuerdo a la fuente de glucosa y los tejidos que la usan principalmente.....	8

I. RESUMEN

La biotina es una vitamina hidrosoluble que forma parte del complejo B. Su papel clásico es como cofactor de carboxilasas, enzimas que participan en el metabolismo de carbohidratos y lípidos. Independientemente de su acción como cofactor de las carboxilasas, se ha encontrado que en concentraciones de 30 a 650 veces los requerimientos diarios (30 µg), la biotina favorece el uso de la glucosa mediante efectos sobre la expresión y actividad de enzimas que regulan su metabolismo.

Una molécula importante para mantener la glucemia en rangos normales es el glucógeno hepático, sin embargo no se ha estudiado el efecto de dosis farmacológicas de biotina en el metabolismo de este compuesto. Para este fin usamos ratones machos de la cepa BALB/c destetados a los 21 días de edad, a partir de ese momento y durante ocho semanas se le administró a el grupo control una dieta estándar de bioferio que contiene 1.76 mg biotina/kg de alimento, y al grupo experimental una dieta suplementada con 97.7 mg biotina/kg de alimento (56 veces más). Al finalizar las ocho semanas se determinó a) el contenido de glucógeno hepático en condiciones de ayuno, b) el curso temporal de la concentración de glucógeno a diferentes tiempos en respuesta a la administración de glucosa, c) la degradación de glucógeno hepático en respuesta al glucagon, una de las hormonas encargadas de la degradación de glucógeno. Además, se midieron las concentraciones de glucosa sanguínea en ayuno y después de la administración de glucosa, así como en respuesta a glucagon. También, se cuantificó el aumento en AMPc en respuesta a glucagon al ser este el principal efector de las acciones del glucagon en el metabolismo del glucógeno en hígado.

Los resultados de este estudio muestran una leve disminución en el contenido de glucógeno hepático en los animales que recibieron la suplementación con biotina, tanto en los estudios espectrofotométricos como en los histológicos, sin ser esta significativa. Ambos grupos presentaron los mismos niveles de glucemia en ayuno y esta varía del mismo modo en respuesta al glucagon. En resumen, en nuestro modelo no se observan diferencias significativas ni en el metabolismo del glucógeno

hepático ni en los niveles de glucosa en sangre entre ambos grupos. Al final de la tesis se contextualizan estos resultados en el marco de experimentos afines y se proponen otras vías para su estudio.

II. INTRODUCCIÓN.

1. Homeostasis de la glucosa.

La glucosa es la principal fuente de energía de la célula, además de ser un precursor en la síntesis de diversas biomoléculas [1]. Debido a esto, se requiere mantener un suministro constante de glucosa a todos los tejidos. Actualmente tanto la Asociación Americana de Diabetes (ADA por sus siglas en inglés), como la Norma Oficial Mexicana *NOM-015-SSA2-2010-Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus*, consideran que las concentraciones de glucosa sanguínea en ayuno indicativas de salud son entre 80 y 100 mg/dl (entre 4.4 mM y 5.5 mM) [2]. Valores por debajo de 80 mg/dl se consideran hipoglucémicos y en caso de estar por debajo de los 60mg/dl se puede presentar sudoración, temblor, palpitaciones y ansiedad y en caso de seguir disminuyendo, pueden llegar a producirse convulsiones, estupor y pérdida de la conciencia. Por otro lado, concentraciones mayores a 100 mg/dl en ayuno se consideran hiperglucémicas [3]. La diabetes mellitus es un conjunto de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia. La hiperglucemia sostenida es causa de las complicaciones diabéticas que incluyen ceguera [4, 5], nefropatía [6, 7], neuropatía [8] y amputaciones [8-10]. Esto nos indica la importancia no solo de mantener un suministro constante de glucosa si no de mantener la glucemia en un rango controlado, lo que se logra principalmente por la acción de dos hormonas que se contrarrestan una a la otra: la insulina y el glucagon.

Las concentraciones de glucosa sanguíneas se mantienen normalmente dentro de rangos constantes y, de acuerdo al origen y uso de glucosa por diferentes tejidos, se pueden distinguir cinco fases en la homeostasis de la glucosa, que se señalan en la figura 1 [11].

Fase I. Postabsortiva, ocurre inmediatamente después de la ingesta de carbohidratos, la glucosa se absorbe en el intestino y pasa a la sangre con lo que aumenta su concentración. En respuesta a esto, el páncreas libera insulina

que promueve la entrada de glucosa a los diferentes tejidos, con lo que las células cubren sus requerimientos energéticos. En hígado y músculo además de ser usada como fuente de energía, la glucosa se almacena como glucógeno o se usa en la síntesis de triglicéridos que se almacenan en tejido adiposo.

Fase II y III. Cuando la glucosa sanguínea comienza a disminuir, la principal fuente de glucosa es el hígado a partir de sus reservas de glucógeno y por gluconeogénesis. A partir de estas etapas el hígado y el músculo comienzan a obtener su energía de los ácidos grasos, con el fin de preservar los niveles de glucosa en sangre y su uso principalmente por el cerebro. El glucógeno hepático es la principal fuente de glucosa sanguínea alrededor de las 4 horas después de la ingesta de carbohidratos y su aporte va disminuyendo linealmente hasta que se terminan las reservas, lo que toma de 36 a 48 horas. Al ir disminuyendo el glucógeno hepático, la gluconeogénesis en el hígado cobra mayor importancia.

Fase IV y V. Al terminarse las reservas de glucógeno en hígado, este sigue produciendo glucosa por gluconeogénesis a partir de lactato y alanina. En caso de ayunos muy prolongados (de días), el riñón también puede participar en el mantenimiento de la glucemia por gluconeogénesis.

Las cinco fases de la homeostasis de la glucosa

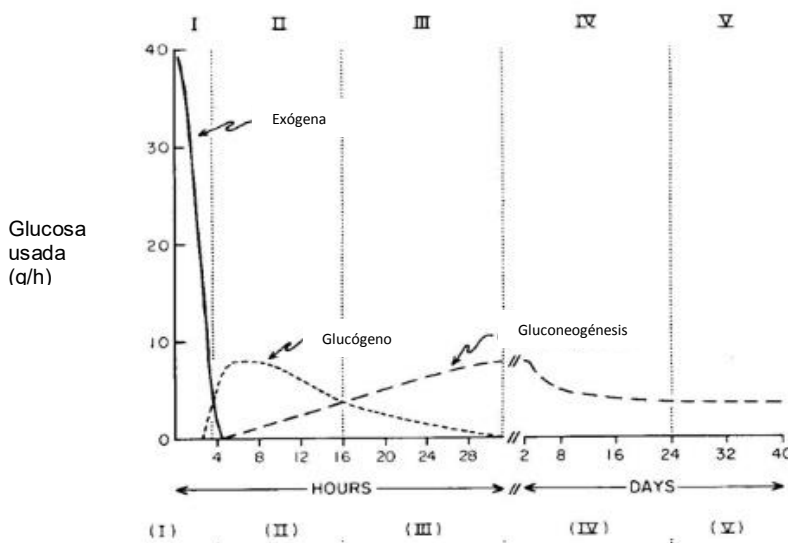


Fig. 1. Se indican las cinco etapas de la homeostasis de glucosa, indicando el origen de la glucosa desde el consumo de alimento hasta el ayuno prolongado. Se detalla en la tabla 1 (Imagen modificada de Joslin's Diabetes Mellitus).

Fase	I	II	III	IV	V
Origen de la glucosa	Exógeno	1. Glucógeno 2. Gluconeogénesis hepática	1. Gluconeogénesis hepática 2. Glucógeno	Gluconeogénesis hepática y renal	Gluconeogénesis hepática y renal
Tejidos usando glucosa	Todos	Todos excepto hígado. Músculo y tejido adiposo en menor medida.	Todos excepto hígado. Músculo y tejido adiposo en menor medida	Cerebro, médula renal, eritrocitos. Mmúsculo en menor medida.	Cerebro.
Principal combustible usado por el cerebro	Glucosa	Glucosa	Glucosa	1. Glucosa 2. Cuerpos cetónicos	1. Cuerpos cetónicos 2. Glucosa

Tabla 1. Las cinco fases de la glucosa descritas en la figura 1, de acuerdo a la fuente de glucosa y los tejidos que la usan principalmente (modificado de Joslin's Diabetes Mellitus).

2. Transporte y metabolismo de la glucosa.

2. 1. Transporte de glucosa.

La glucosa entra a las células mediante dos tipos de transportadores, los dependientes de sodio (SGLT, por sus siglas en inglés *sodium dependent glucose transporter*) y los que permiten el paso por difusión facilitada, llamados GLUT (por *glucose transporter*). La glucosa que proviene de la dieta es absorbida en el intestino por el SGLT1 en la membrana apical del epitelio intestinal y es liberada a la circulación sanguínea a través del GLUT2 en la membrana basolateral, de este modo queda disponible en la sangre para su absorción por todos los tejidos [12, 13].

Existen varios tipos de GLUT con diferentes afinidades por la glucosa y se regulan de diferente manera. Su expresión diferencial en los tejidos permite un control fino de la absorción de glucosa de acuerdo a los requerimientos de cada tejido y la disponibilidad de glucosa en sangre. Se describen a continuación dos tipos de GLUT involucrados en el mantenimiento de la glucemia.

GLUT2. Se expresa en hígado, células β pancreáticas, riñón y en la membrana basolateral del intestino delgado y es capaz de transportar glucosa bidireccionalmente. En estas células el paso limitante en el uso de la glucosa es su

fosforilación por la glucocinasa a glucosa-6-fosfato. El GLUT2 tiene baja afinidad por la glucosa (K_m de aproximadamente 17mM), por lo que no es saturable en condiciones fisiológicas. Esto tiene dos consecuencias, por un lado los tejidos que usan GLUT2 como transportador no compiten por el uso de glucosa con tejidos que solo usan glucosa como fuente de energía. Además él GLUT2 permite equilibrar rápidamente la concentración de glucosa en sangre con la concentración de glucosa en los hepatocitos lo que le permite al hígado actuar como un sensor de la concentración de glucosa en sangre. GLUT2 participa de manera importante en la absorción de glucosa desde el intestino, en la secreción de insulina dependiente de glucosa, en la entrada y almacenamiento de glucosa en el hígado y en la reabsorción de glucosa en los riñones [13, 14].

GLUT4. Tiene alta afinidad por la glucosa y es regulado por la insulina. Se expresa en corazón, músculo y tejido adiposo donde la insulina induce la translocación de GLUT4 de vesículas citoplásmicas hacia la membrana aumentando así la entrada de glucosa a la célula. Debido a su distribución en el organismo el músculo es el tejido que incorpora la mayor cantidad de glucosa en el estado posprandial, en respuesta a insulina, [15] por lo que defectos en el transporte tienen repercusiones en la homeostasis de la glucosa. Aun cuando se conoce sólo parcialmente el mecanismo por el cual la insulina induce la movilización de GLUT4, defectos en esta respuesta han sido relacionados con un mayor riesgo de desarrollar diabetes. En un modelo de ratón donde se eliminó selectivamente GLUT4 de músculo se observó resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa y falla en suprimir la producción hepática de glucosa lo que sugiere un papel de este transportador en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa [16].

2. 2. Metabolismo de la glucosa

Una vez dentro de la célula la glucosa es fosforilada a glucosa-6-fosfato, la carga negativa del fosfato le impide pasar de nuevo por el transportador, por lo que permanece dentro de la célula. La glucosa-6-fosfato es posteriormente canalizada

a diferentes vías metabólicas de acuerdo a los requerimientos celulares. Entre estas vías destacan la glucólisis para la producción de ATP y la vía de las pentosas fosfato para formar NADH y precursores de nucleótidos, mientras que el exceso de glucosa se almacena como glucógeno mediante la glucogenogénesis o como ácidos grasos mediante la lipogénesis *de novo*. Además existen dos vías que producen glucosa-6-fosfato, la glucogenólisis por degradación del glucógeno y la gluconeogénesis a partir de piruvato y algunos aminoácidos como la alanina. Estas vías se describen brevemente a continuación.

a) Glucólisis. La glucólisis consta de diez pasos en dos fases y produce una ganancia neta de dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa. En la primera fase, o fase preparatoria, se invierten dos moléculas de ATP para fosforilar cada molécula de glucosa y se obtienen dos moléculas de gliceraldehído-3-fosfato. En la segunda fase estas dos moléculas se convierten en piruvato al tiempo que se producen cuatro moléculas de ATP [17].

Tres de los diez pasos de la glucólisis son irreversibles y las enzimas que los catalizan están sujetas a diferentes tipos de regulación para responder a los requerimientos energéticos de la célula (ver figura 3).

- El primero paso es la fosforilación de glucosa para formar glucosa-6-fosfato, este paso es catalizado por una hexocinasa. Existen cuatro isoformas de hexocinasa (I a IV) que se expresan diferencialmente en los tejidos. Las hexocinasas I, II y III tienen alta afinidad por la glucosa ($K_m < 0.1 \text{ mM}$) y son inhibidas alostéricamente por glucosa-6-fosfato. La hexocinasa IV, mejor conocida como glucocinasa, se expresa en hígado y en células β del páncreas y es importante en la homeostasis de la glucosa. La glucocinasa tiene menor afinidad por la glucosa (K_m de 10 mM) y no es inhibida por concentraciones fisiológicas de glucosa-6-fosfato [18]. Esto, junto con la gran cantidad de transportadores GLUT2 presentes en el hígado permite que cuando la concentración de glucosa en sangre es elevada, esta se absorba rápidamente por el hígado y sea convertida en glucosa-6-fosfato y

posteriormente almacenada como glucógeno. Además, en células β -pancreáticas la glucocinasa actúa como un sensor de glucosa y participa en la liberación de insulina. La glucocinasa es inhibida por la fructosa-6-fosfato que promueve su unión con una proteína represora GK-RP y la trasloca al núcleo. El aumento en la concentración de glucosa promueve la disociación de la glucocinasa y su regreso al citoplasma [19, 20].

- El segundo punto de regulación es la fosforilación de fructosa-6-fosfato por la fosfofructocinasa-1 (PFK1) para producir fructosa-1,6-bisfosfato. Ya que el paso anterior es reversible (la isomerización de glucosa-6-fosfato a fructosa-6-fosfato), este es el paso que compromete la glucosa a glucólisis. La fosfofructocinasa-1 es inhibida alostéricamente por ATP y citrato, mientras que es activada por AMP, ADP, AMP cíclico y fructosa-2,6-bisfosfato.
- El tercer punto de regulación es el último paso de la glucólisis en el que la piruvato cinasa hidroliza el fosfoenolpiruvato para producir piruvato con la formación de un ATP. La piruvato cinasa es inhibida alostéricamente por acetil-CoA, ATP y alanina, y es activada por AMP y fructosa-1,6-bisfosfato.

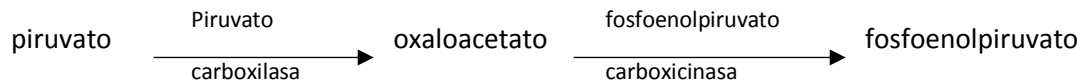
b) Vía de las pentosas fosfato. Esta vía consta de dos etapas, una oxidativa que genera ribulosa-5-fosfato y además NADPH necesario para la síntesis de lípidos y esteroides. Una segunda etapa, no oxidativa, genera ribosa-5-fosfato, fructosa-6-fosfato y gliceraldehído-3-fosfato entre otros intermediarios para diferentes vías como la síntesis de aminoácidos y ácidos nucleicos. Esta vía se regula en el primer paso en el que la glucosa-6-fosfato es convertida en fosfogluconolactona por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa [21].

c) Gluconeogénesis. Es la síntesis de glucosa a partir de precursores no carbohidratos, como piruvato, lactato, glicerol y aminoácidos (excepto lisina y leucina). La mayoría de estos sustratos se convierten a oxaloacetato, excepto el glicerol que entra a la vía al ser convertido en dihidroxiacetona fosfato. La

gluconeogénesis se lleva a cabo en el hígado, y en menor medida en los riñones. Aunque usa enzimas glucolíticas, requiere de enzimas especiales para los tres pasos irreversibles de la glucólisis [22].

- Inicia con la síntesis en dos pasos de fosfoenolpiruvato a partir de piruvato. El primer paso es la carboxilación de piruvato para producir oxaloacetato, reacción catalizada por la piruvato carboxilasa, que es activada alostéricamente por acetil-CoA.

El segundo paso es la descarboxilación y fosforilación del oxaloacetato para producir fosfoenolpiruvato. Este paso es el primero que compromete a la gluconeogénesis y es catalizado por la fosfoenolpiruvato carboxicinas (PEPCK). La PEPCK es regulada a nivel transcripcional, se activa por acción del glucagon, glucocorticoides y hormona tiroidea y se inhibe por la insulina.



- El siguiente paso que no usa enzimas glucolíticas es la conversión de fructosa-1,6-bifosfato a fructosa-6-fosfato por la fructosa-1,6-bifosfatasa. Esta enzima es inhibida por incrementos en fructosa-6-fosfato y activada por glicerol-3-fosfato.
- Finalmente el paso de glucosa-6-fosfato a glucosa. Este paso es de suma importancia en la homeostasis de la glucosa. Solo hay tres tejidos que expresan glucosa-6 fosfatasa, estos son el hígado, el riñón y el intestino delgado. Una vez desfosforilada la glucosa es capaz de pasar de nuevo por el transportador y llegar a la circulación, con lo que queda disponible para los tejidos que la requieran.

d) Glucogenogénesis y glucogenólisis. El proceso por el cual se produce glucógeno es la glucogenogénesis, también llamada glucogénesis y es catalizada principalmente por la glucógeno sintasa. Cuando hay un aumento en la proporción AMP/ATP intracelular que indica que la célula requiere energía en forma de ATP o en respuesta a glucagon, adrenalina y cortisol, se desencadena una cascada de señalización que termina en la degradación del glucógeno, o glucogenólisis, por acción de la glucógeno fosforilasa para liberar glucosa. Estos procesos se revisarán a detalle más adelante.

Como se aprecia en la figura 2, la glucólisis, gluconeogénesis, glucogenogénesis, glucogenólisis y la vía de las pentosas convergen en la glucosa-6-fosfato. Esta molécula no es capaz de salir de la célula lo que permite que una vez en el citosol, la glucosa sea usada para cubrir los requerimientos de la misma. Solo hay tres órganos capaces de liberar glucosa al torrente sanguíneo, el hígado, el riñón y el intestino delgado, ya que estos tres tejidos expresan glucosa-6-fosfatasa, enzima que desfosforila la glucosa-6-fosfato produciendo glucosa que puede cruzar a través del transportador. De estos tres tejidos, como se indicó anteriormente, el hígado es la principal fuente de glucosa debido a la cantidad de glucógeno que puede almacenar por gramo de tejido y por ser el primero en responder a los cambios en la glucosa circulante. El riñón y en mucho menor medida el intestino delgado solo aportan al mantenimiento de la glucemia en caso de ayunos muy prolongados y aún en estos casos, el hígado es capaz de mantener la producción de glucosa por gluconeogénesis[23] [24].

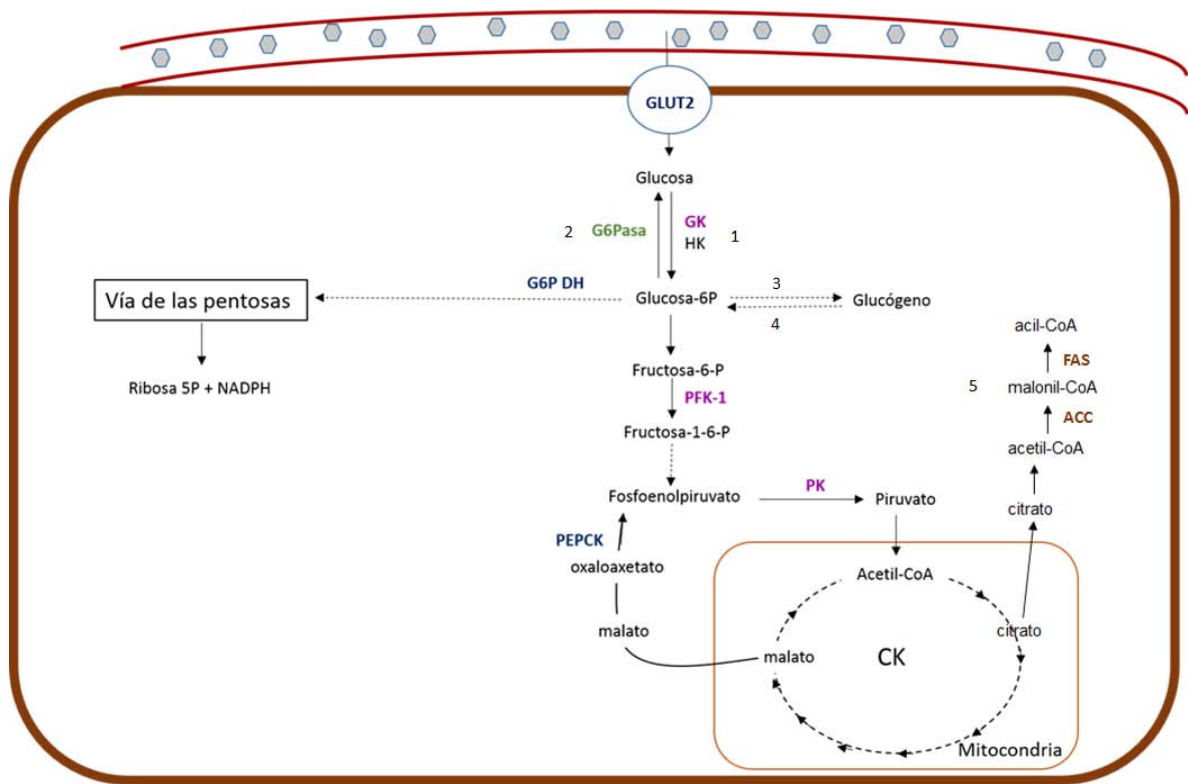


Fig. 2. Metabolismo hepático. Se indican solo las vías que involucran directamente a la glucosa y sus enzimas reguladoras. Las líneas punteadas indican procesos de más de un paso. Desde glucosa hasta piruvato es la glucólisis (1), desde oxaloacetato a glucosa es gluconeogénesis (2). La síntesis de glucógeno es la glucogenogénesis (3) y su degradación es la glucogenólisis (4), estas vías junto con la vía de las pentosas fosfato y la síntesis de ácidos grasos (5) se lleva a cabo en el citosol, mientras que el ciclo de Krebs (CK) se lleva a cabo en la mitocondria. (Glucocinasa (GK), hexocinasa (HK), fosfofructocinasa (PFK1), piruvato cinasasa (PK), fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPCK), acetil-CoA carboxilasa (ACC), ácido graso sintasa (FAS), GLUT2 es el transportador de glucosa presente en hígado).

3. El glucógeno

3.1. Estructura del glucógeno

El glucógeno es un polímero de glucosa ramificado que forma moléculas esféricas llamadas partículas β . Una molécula madura de glucógeno tiene cadenas de glucosa muy ramificadas que forman hélices levóginas con 6.5 residuos de glucosa

por cada vuelta. En promedio cada partícula β tiene un diámetro de 30 nm y contiene hasta 60 000 unidades de glucosa. A su vez, conjuntos de 20 a 40 partículas β se encuentran en el citoplasma asociadas entre sí y con enzimas encargadas de su síntesis, degradación y regulación formando agregados llamados partículas α , o rosetas α [25-27]. La estructura ramificada del glucógeno, junto con la asociación con estas enzimas tiene varias ventajas. Al ser un polímero, el glucógeno permite el almacenamiento de una gran cantidad de glucosa en el citoplasma sin aumentar la presión osmótica de la célula. Además su estructura ramificada proporciona un gran número de sitios de acción para la glucógeno fosforilasa, enzima encargada de su degradación. Finalmente, su asociación con las enzimas encargadas de su metabolismo permiten una rápida respuesta ante los cambios en el requerimiento energético de la célula [28, 29].

Aunque varios tejidos almacenan glucógeno los más importantes para el organismo son el músculo y el hígado. El músculo, por su distribución en el cuerpo es el tejido que más glucosa absorbe en la etapa postprandial, y almacena glucógeno correspondiente del 1 al 2% de su peso. Este glucógeno actúa como reserva para el mismo tejido, cuando hay un incremento tal en la actividad física que la demanda de ATP es mayor que la que se puede obtener de acuerdo a la oxigenación del músculo, el glucógeno actúa como una fuente de glucosa para obtener ATP por oxidación anaerobia. El hígado, por otro lado puede almacenar hasta el 10% de su peso en glucógeno y su importancia radica en la capacidad de este tejido de liberar glucosa a la sangre para mantener un suministro constante para los demás tejidos[25].

3.2. Síntesis de glucógeno.

Para iniciar la síntesis de glucógeno se requiere de un núcleo formado por una proteína llamada glucogenina y alrededor de 10 residuos de glucosa unidos covalentemente. A partir de este precursor la glucógeno sintasa y la enzima ramificadora forman gránulos de glucógeno de peso variable.

a) Glucogenina.

También llamada glucogenina glucosiltransferasa es una enzima auto catalítica que transfiere un residuo de glucosa de la UDP-glucosa a la tirosina 194 de la glucogenina formando glucosilglucogenina. Posteriormente la glucogenina puede agregar residuos de glucosa con enlaces $\alpha(1-4)$ hasta formar una cadena de entre 5 y 10 glucosas que la glucógeno sintasa puede extender [30]. La glucogenina puede existir como un monómero o como un dímero, siendo la glucosilación entre dos subunidades la forma más eficiente de iniciar la síntesis de glucógeno [31, 32].

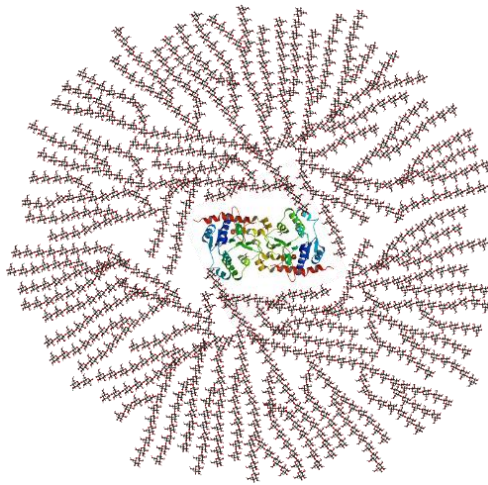


Fig. 3. Representación de un corte transversal de una molécula de glucógeno con un dímero de glucogenina al centro. El glucógeno se almacena como gránulos en el citoplasma. (Imagen de dominio público [33])

Para iniciar la polimerización de la glucosa, la glucosa-6-fosfato (G6P) es convertida a glucosa-1-fosfato (G1P) mediante la fosfoglucomutasa. Después la UDP-glucosil pirofosforilasa forma la uridilglucosa difosfato (UDP-glucosa) usando UTP y la energía libre proveniente de la hidrólisis del pirofosfato (PPi). La UDP-glucosa es el sustrato de la glucógeno sintasa, que forma un enlace glucosídico $\alpha(1-4)$ en el extremo no reductor del glucógeno. Para formar la estructura ramificada se requiere además de una enzima ramificadora, la amilo- $\alpha(1-4, 1-6)$ -glucosil transferasa que crea los enlaces $\alpha(1-6)$ [21].

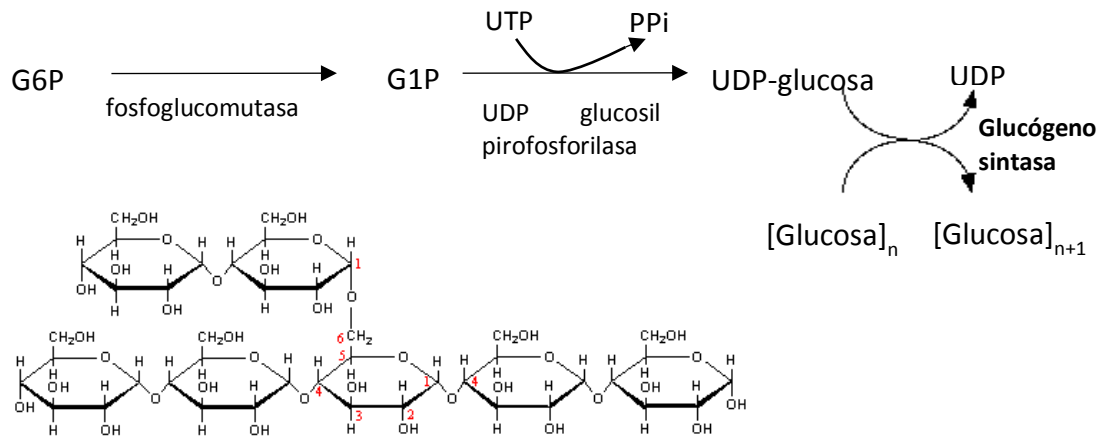


Fig. 4. Síntesis de glucógeno y estructura mostrando los enlaces α (1-4) y α (1-6).

b) Glucógeno sintasa

La glucógeno sintasa es la enzima que alarga las cadenas de glucógeno, es un homodímero y tiene isoformas específicas para diferentes tejidos. Esta enzima se regula a diferentes niveles:

- Es activada alostéricamente por la glucosa-6-fosfato. En hepatocitos, ya que la concentración de glucosa plasmática se equilibra rápidamente con la concentración de glucosa en sangre, la glucosa-6-fosfato es el principal factor que induce la síntesis de glucógeno. En músculo, además de ser un activador alostérico, la glucosa-6-fosfato al unirse a la glucógeno sintasa la hace más susceptible a la desfosforilación aumentando su actividad [34, 35].
- Es regulada por fosforilación. Su forma activa es la no fosforilada, también llamada GSa, mientras que su forma inactiva (fosforilada) se conoce como GSb. La fosforilación se produce en serinas ubicadas tanto en el extremo amino como en el carbonilo terminal y se pueden producir hasta seis fosforilaciones por cada subunidad. La glucógeno sintasa hepática no tiene dos de los sitios de fosforilación que son el blanco principal de la protein cinasa A (PKA) en músculo [27]. La desactivación por fosforilación es producida por la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3) [36].

- La regulación por fosforilación depende a su vez de dos hormonas con efectos opuestos, la insulina y el glucagón. La glucógeno sintasa se activa en respuesta a la insulina, que al unirse a su receptor activa a la glucógeno sintasa cinasa 3, desfosforilado a la glucógeno sintasa b [37]. Por el contrario, el glucagón activa a la proteína cinasa A, enzima que fosforila a la glucógeno sintasa, inhibiendo la síntesis de glucógeno [36].

c) Enzima ramificadora.

La amilo-(1,4-1,6)-transglucosilasa, transfiere cadenas de aproximadamente siete residuos de glucosa al carbono 6 de otro residuo de glucosa, en la misma cadena o en otra. Cada fragmento que es transferido debe venir de una cadena de al menos once glucosas y el nuevo punto de ramificación debe estar al menos a cuatro residuos de otro punto de ramificación.

3. 3. Degradación del glucógeno

La degradación del glucógeno se lleva a cabo por la acción conjunta de la glucógeno fosforilasa y una enzima desramificadora y produce como resultado glucosa-1-fosfato y glucosa libre.

a) Glucógeno fosforilasa.

Es la enzima encargada de romper los enlaces glucosídicos α (1-4), liberando glucosa-1-fosfato que posteriormente es isomerizada a glucosa-6-fosfato. La glucógeno fosforilasa no puede romper los enlaces entre los cuatro primeros residuos de glucosa contado a partir de un sitio de ramificación, por lo que se requiere de una enzima desramificadora. La glucógeno fosforilasa requiere además de piridoxal-5-fosfato (PLP), un derivado de la vitamina B6 como grupo prostético, el cual está unido a la lisina 679 de la fosforilasa y su grupo fosfato participa en el proceso catalítico de esta enzima [38].

Existen tres isoformas de glucógeno fosforilasa específicas para hígado, músculo y cerebro. De manera similar a la glucógeno sintasa, la fosforilasa también está regulada en diferentes niveles.

- Alostéricamente es activada por AMP e inhibida por glucosa-6-fosfato, en particular las isoformas presentes en músculo y cerebro [27].
- Por modificación covalente, las tres isoformas son convertidas de su forma inactiva GP_b a su forma activa GP_a por fosforilación de una serina. Dicha fosforilación es producida por la glucógeno fosforilasa cinasa. El proceso contrario es catalizado por la glucógeno fosforilasa fosfatasa.
- Las regulación por fosforilación a su vez es resultado de señales hormonales. El glucagon y la adrenalina inducen la activación de la glucógeno fosforilasa, mientras que la insulina produce su inactivación.

b) Enzima desramificadora.

Esta enzima tiene dos actividades catalíticas, cada una con su propio sitio activo, que permiten la degradación completa del glucógeno. Por un lado tiene actividad de α (1-4) transglucosilasa, transfiere tres de los cuatro residuos unidos en un punto de ramificación al extremo no reductor de una cadena cercana formando un nuevo enlace α (1-4). Además, por su actividad de α (1-6) glucosidasa es capaz de romper los enlaces α (1-6) produciendo glucosa libre[25].

3.4. Regulación del metabolismo de glucógeno.

Como ha sido descrito anteriormente, aunque hay varias enzimas involucradas en la síntesis y degradación de glucógeno, las dos más importantes son la glucógeno sintasa y la glucógeno fosforilasa. Como ya se mencionó, estas dos enzimas se regulan por alosterismo y por fosforilación

o desfosforilación en respuesta a estímulos hormonales, principalmente insulina y glucagon que responden a variaciones en la concentración de glucosa en sangre. Otras hormonas modifican la cantidad de glucógeno son la adrenalina y el cortisol. La adrenalina es una señal de estrés agudo que al igual que el glucagon activa a la adenilato ciclasa desencadenando una cascada de señalización que induce la degradación de glucógeno [39].

La actividad de la glucógeno sintasa y la glucógeno fosforilasa se encuentran coordinadas de tal manera que las señales que indican un aumento en la demanda energética, como el glucagon, la adrenalina, el cortisol o el incremento intracelular en AMP activan a la glucógeno fosforilasa al tiempo que inhiben a la glucógeno sintasa. Al contrario, cuando hay disponibilidad de glucosa, la insulina y el incremento en glucosa-6-fosfato y ATP intracelular activan a la glucógeno sintasa e inhiben a la fosforilasa con el efecto neto de producir glucógeno (ver figura 5)

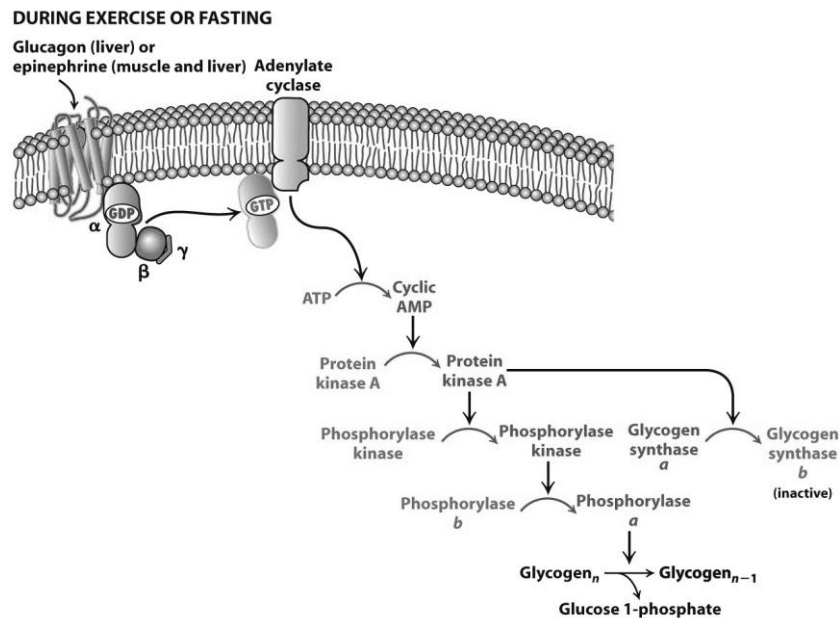


Figure 21.19
Biochemistry, Seventh Edition
© 2012 W. H. Freeman and Company

Fig. 5. Regulación por glucagon o epinefrina de la glucógeno sintasa y glucógeno fosforilasa que resulta en la inducción de la glucogenólisis y la inhibición de la glucogenogénesis [40].

4. Glucagon

El glucagon es una hormona peptídica de 29 aminoácidos sintetizada y excretada por células α de los islotes pancreáticos en respuesta a la hipoglucemia. Actúa sobre un receptor acoplado a proteína G que se encuentra en hígado, cerebro, riñón, intestino y tejido adiposo donde tiene efectos catabólicos. Su papel principal en el organismo es inducir la producción hepática de glucosa para ser liberada al torrente sanguíneo y mantener glucosa disponible para los demás tejidos. Esta glucosa proviene de glucogenólisis y de gluconeogénesis, por lo que el glucagon además estimula la absorción al hígado de aminoácidos gluconeogénicos como alanina, prolina y glicina[36, 41, 42].

Se sabe que el receptor de glucagon está acoplado a dos tipos de proteínas G, que resultan en diferentes cascadas de señalización. Una es la proteína $G_{\alpha s}$ que activa a la adenilato ciclasa produciendo AMPc que activa a la protein cinasa A. La protein cinasa A activa una fosforilasa cinasa que fosforila a la glucógeno fosforilasa en un residuo de serina, activándola y produciendo la degradación de glucógeno. La otra proteína G acoplada al receptor de glucagon es la G_q que activa a la fosfolipasa C, produciendo inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y la liberación de calcio intracelular que inhibe la glucólisis (figura 5)[36].

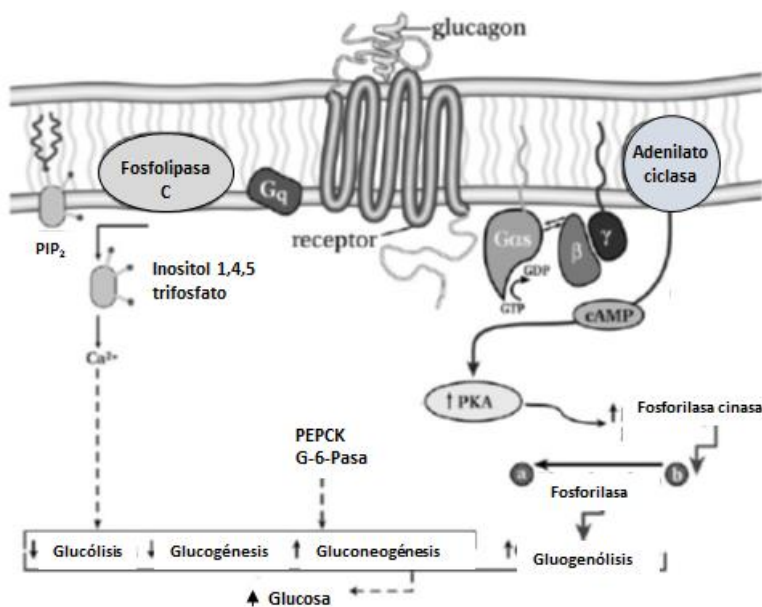


Fig. 6. El receptor a glucagon está acoplado a dos tipos de proteínas G que le permiten inducir glucogenólisis al tiempo que aumenta la gluconeogénesis, e inhibe la glucólisis y gluconeogénesis (imagen modificada de Jiang and Zhang, 2003 [36])

Por medio de estas dos cascadas de señalización, el efecto neto del glucagon es el aumento de la glucogenólisis por activación de la glucógeno fosforilasa, y de la gluconeogénesis por aumento en la actividad de fosfoenolpiruvato carboxicinas y glucógeno-6-fosfatasa. Al mismo tiempo, el glucagon disminuye la glucogenogénesis por inactivación de la glucógeno sintasa, y la glucólisis por disminución de la actividad de fosfofructocinasa-1. El glucagon también afecta la actividad de la piruvato cinasa al inhibirla mediante acción de la protein cinasa dependiente de ATP, además de disminuir la transcripción de su mRNA.

A pesar de que las vías iniciadas por las dos proteínas G convergen, existe evidencia que indica que la liberación de glucosa por el hígado en respuesta a glucagon se debe primero a la activación de la glucógeno fosforilasa vía la protein cinasa dependiente de ATP y después por activación de la protein cinasa C [43].

6. Biotina

6.1. Estructura y metabolismo.

La biotina, también conocida como vitamina H o B8, es una vitamina hidrosoluble que forma parte del complejo B. Su estudio inició en la década de 1930, en 1936 Kogl y Tonnis la cristalizaron por primera vez y en 1940 el grupo de DuVigneaud dilucidó su estructura química, el ácido cis-hexahidro-2-oxo-1H-tienol [3,4] imidazol-4-valerico (Fig. 1), del que solo el estereoisómero (+) tiene actividad biológica de importancia. En las siguientes décadas se estableció su papel como cofactor de carboxilasas involucradas en el metabolismo de carbohidratos [44].

Los animales no sintetizan biotina, sin embargo son capaces de obtenerla de la dieta y de su flora intestinal. En humanos la ingesta diaria recomendada es de 30 µg diarios para un adulto sano [45], requerimiento que se cubre fácilmente ya que la biotina se encuentra ampliamente distribuida en los alimentos, principalmente en hígado, carnes rojas y la mayoría de frutas y vegetales, además de ser producida por las bacterias del intestino, desde donde puede ser absorbida [46]. Debido a esto

los casos de deficiencia de biotina son escasos y generalmente se deben a mutaciones en holocarboxilasa sintetasa y las carboxilasas que usan biotina como cofactor.

La biotina proveniente de la dieta se encuentra en dos formas, como biotina libre o unida a proteínas. Es necesaria la acción de proteinasas para obtener biotina unida a péptidos pequeños, siendo la más común la biocitina (biotin-lisina) que a su vez es procesada por la biotinidasa para obtener biotina libre que puede pasar del intestino a la circulación sanguínea mediante transportadores [47]. Una vez en sangre, al menos en humano, 81% de la biotina se encuentra libre mientras que 12% se encuentra unida a proteínas covalentemente y 7% de manera reversible [48]. La biotina entra a la célula mediante un transportador múltiple de vitaminas dependiente de sodio, siendo absorbida la mayor parte por el hígado, donde prácticamente toda la biotina se encuentra en el citoplasma y en las mitocondrias. La biotina se cataboliza en hígado como biotinsulfóxido o bisnorbiotina y se elimina por la orina[49].

6.2. La biotina como cofactor de carboxilasas.

La biotina en los mamíferos actúa como cofactor de cuatro carboxilasas del metabolismo intermedio que participan en la gluconeogénesis, la síntesis de ácidos grasos y el catabolismo de ácidos grasos. Estas son: la piruvato carboxilasa (PC), la acetil-CoA carboxilasa 1 (citosólica) y la 2 (mitocondrial) (ACC1 y ACC2), la β -metilcrotonil-CoA carboxilasa (MCC), y la propionil-CoA carboxilasa (PCC). En la figura 7 se indican las reacciones catalizadas por estas enzimas, así como su ubicación en la célula.

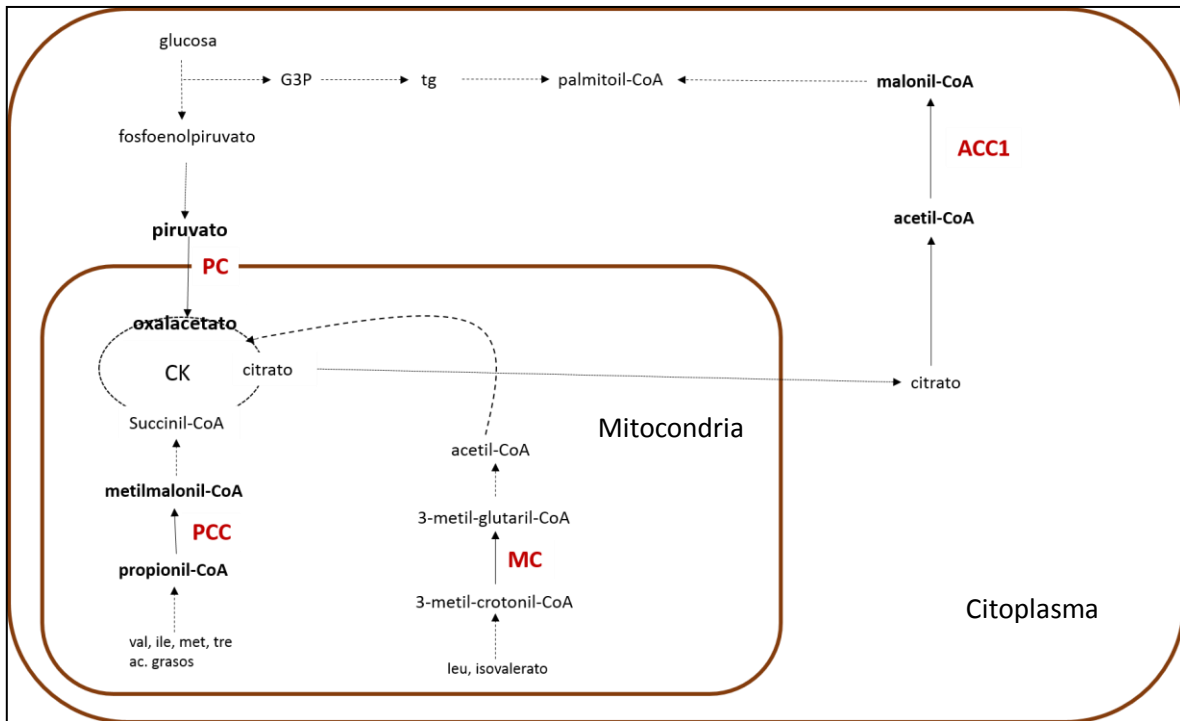


Fig 7. Ubicación en la célula de las cuatro carboxilasas que usan biotina como cofactor. La célula representada es un hepatocito.

Estas cuatro carboxilasas se sintetizan como apoenzimas y requieren de su activación por la holocarboxilasa sintetasa. La holocarboxilasa sintetasa une covalentemente la biotina a una lisina en un sitio altamente conservado en estas enzimas en una reacción de dos pasos dependiente de ATP. Durante el reciclaje de las carboxilasas, la biotina se mantiene unida a un péptido pequeño y se puede reutilizar en la activación de nuevas carboxilasas o metabolizarse en el hígado para su excreción. Este proceso se conoce como ciclo de la biotina [50].

6.3. La biotina en dosis farmacológicas.

El requerimiento diario de biotina para un adulto sano es de 30 μg , sin embargo, en los suplementos vitamínicos se encuentra en el orden de los miligramos. Desde finales de la década de 1960 se ha observado que en estas dosis, que denominamos farmacológicas, la biotina tiene efectos independientes de su papel como cofactor de carboxilasas. Entre estos, se encuentran cambios en la expresión

de genes relacionados con proliferación celular y metabolismo[51, 52] así como efectos en la homeostasis de lípidos y carbohidratos. Estudios en pacientes con diabetes tipo 1 y 2, así como en modelos animales de diabetes, han mostrado una disminución en glucosa postprandial y una mejora en las pruebas de tolerancia a la glucosa [53-55], así como reducción de hiperglucemia [56, 57] e hipertrigliceridemia [58].

6.3.1. Efecto de dosis farmacológicas de biotina en la expresión de genes del metabolismo de glucosa y de lípidos

Se ha identificado que concentraciones farmacológicas de biotina modifican la expresión de genes críticos en la homeostasis de la glucosa tanto en islote pancreático como en hígado. En islotes aislados de rata Wistar tratados con biotina se observó un aumento en la cantidad de mRNA de glucocinasa [59, 60]. En ratones BALB/c a los que se les dio una dieta suplementada con biotina durante 8 semanas se observó aumento en el mRNA de insulina, acetil-CoA carboxilasa y glucocinasa en páncreas respecto a los animales que recibieron una dieta estándar de bioterio. Este aumento se vio acompañado de un aumento en la secreción de insulina y mejora en la tolerancia a la glucosa [61].

En cuanto a los efectos en hígado, en un modelo de ratas con diabetes inducida por estreptozotocina y tratadas con biotina, se encontró disminución en el mRNA de fosfoenolpiruvato carboxilasa y glucosa-6 fosfatasa, además de un aumento en el mRNA de glucocinasa. Estas modificaciones fueron similares a las obtenidas al tratar los animales con insulina [62, 63]. Estudios en ratas sanas a las que se les administró biotina encontraron también un aumento en el mRNA de glucocinasa hepática[52, 64]. También en hígado de ratón se ha observado que el tratamiento con biotina induce disminución del mRNA de fosfofructocinasa-1, piruvato cinasa y acetil-CoA carboxilasa, junto con un aumento en mRNA de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, enzima que cataliza el primer paso en la vía de las pentosas fosfato [65]. Hay que notar que respecto a algunas enzimas existe controversia ya que hay reportes de que dosis agudas de biotina pueden aumentar el mRNA de

piruvato cinasa y fosfofructocinasa-1 [66], por lo que hay que considerar que el efecto de una dosis aguda puede ser diferente al de un tratamiento prolongado.

Estos cambios en la expresión de genes se han visto reflejados como cambios en la actividad de proteínas importantes en el metabolismo de glucosa. Por ejemplo en cuanto a la glucólisis, se ha reportado aumento en la actividad de la glucocinasa en islote pancreático [59] y en hígado [52, 64]. En ratas con diabetes inducida por estreptozotocina y tratadas con biotina se encontró disminución en la actividad de fosfoenolpiruvato carboxicinasas [62], enzima reguladora de la gluconeogénesis. También se ha reportado aumento en la actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en hígado [67].

6.4. Efecto de dosis agudas de biotina en el contenido de glucógeno

Estudios por Paul y Duttagupta [67-70], dirigidos a investigar los efectos de cantidades farmacológicas de biotina sobre el aparato reproductor femenino, encontraron cambios en el contenido de glucógeno en útero y ampliaron sus observaciones al hígado. En un estudio, inyectaron a ratas 5 mg de biotina por cada 100 g de peso (aproximadamente 12.5 mg/ rata) una vez en la mañana y otra en la noche durante el día de diestro, encontrando que en el útero las concentraciones de glucógeno disminuyeron levemente 21 días después del tratamiento con biotina, en tanto que el glucógeno hepático disminuyó aproximadamente a la mitad a los 7 días de la administración de biotina, y a una tercera parte al día 14. La cantidad de glucógeno hepático se encontró prácticamente recuperado en el día 21 posterior a la dosis de biotina [70].

En cuanto a los efectos de dosis agudas de biotina durante la gestación, Paul y Duttagupta investigaron dos etapas: preimplantación [67] y postimplantación [69]. En rata la implantación ocurre alrededor del sexto día [71]. Al realizar la administración de biotina (10 mg/100 g de peso) previo a la implantación encontraron disminución del glucógeno en útero, pero no se observaron cambios en el contenido de glucógeno hepático [67].

Al realizar la administración de 10 mg biotina por cada 100 de peso en los días 14 y 15 de la gestación, se observó disminución en la cantidad de glucógeno uterino y placentario [69] pero no hepático.

III. JUSTIFICACIÓN

Se ha encontrado que la biotina en cantidades farmacológicas modifica la homeostasis de la glucosa. En el hígado, la gluconeogénesis, la síntesis y la degradación del glucógeno tienen un papel significativo en el control de las concentraciones de glucosa en sangre. A pesar de la importancia de glucógeno hepático para mantener la homeostasis de la glucosa existen pocos estudios investigando los efectos farmacológicos de biotina sobre el contenido de éste, siendo la mayor parte de ellos dirigido a investigar su acción en el contenido de este polímero en el útero. En este trabajo se analizará el efecto de la suplementación de biotina en la dieta sobre el contenido de glucógeno hepático en diversas condiciones metabólicas.

IV. HIPÓTESIS

Ya que la biotina en dosis farmacológicas modifica la homeostasis de la glucosa y la expresión de genes del metabolismo de la glucosa y siendo el hígado un órgano central en el control de la glucemia mediante la síntesis y degradación del glucógeno, es probable que la biotina produzca cambios en el almacenamiento de glucógeno hepático.

V. OBJETIVOS

General:

Determinar el efecto de la suplementación de biotina en la dieta sobre el metabolismo del glucógeno hepático.

Particulares:

Determinar el efecto de la suplementación con biotina en la dieta sobre:

- El contenido de glucógeno hepático en condiciones de ayuno.
- El curso temporal de la concentración de glucógeno en respuesta a la administración de glucosa.
- Efecto del glucagon sobre la concentración de glucógeno hepático.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

a) Modelo animal

Como modelo biológico usamos ratones machos BALB/c provenientes del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, los cuales fueron manipulados de acuerdo con los lineamientos del Comité de Ética y Experimentación del mismo instituto. Los ratones fueron destetados a los 21 días de edad y separados en dos grupos. El grupo control recibió una dieta con 1.76 mg de biotina/ kg de alimento (TD-01362, Harlan Teklad), mientras que el grupo suplementado recibió una dieta con 97.7 mg de biotina/kg de alimento (TD-01363, Harlan Teklad); ambas dietas están formuladas como pellets y la dieta suplementada tiene 55.6 veces más veces biotina que la dieta control, proporción comparable a la que aportan los suplementos vitamínicos. Los ratones fueron alimentados con la dieta asignada durante ocho semanas durante las cuales se mantuvieron bajo ciclos de luz-oscuridad de 12h, con libre acceso a agua y alimento. Además, se dio seguimiento semanal al peso corporal y consumo de alimento de los dos grupos. En este mismo modelo nuestro laboratorio ha observado efecto de la biotina sobre el metabolismo [65, 72, 73].

Al finalizar las ocho semanas de tratamiento se determinó la concentración de glucosa en sangre: a) en ayuno, b) después de la administración de glucosa y c) en respuesta a glucagon. Para el estudio del contenido de glucógeno hepático y muscular, así como glucosa-6-fosfato y AMPc en hígado, los animales fueron anestesiados con pentobarbital para permitir la extracción de los tejidos y posteriormente sacrificados por dislocación cervical. Las condiciones de estudio, así como el método de obtención y procesamiento de las muestras se describen con detalle a continuación.

i. Condiciones de estudio:

Una vez completado el tratamiento se analizó el efecto que tuvo la suplementación con biotina en el contenido de glucógeno hepático en tres diferentes condiciones:

- Ayuno de 12 horas: Se retiró el alimento y se colocó aserrín nuevo en las cajas a las 8 pm. El sacrificio de los animales y la obtención de los tejidos de interés se realizó a las 8 am del día siguiente, para un total de 12 horas de ayuno.
- Curso temporal de la síntesis y degradación de glucógeno: Al finalizar 12 horas de ayuno, a los animales se les administró una dosis de glucosa de 6g/kg peso *i.p.* con la finalidad de inducir la síntesis de glucógeno. Las muestras se obtuvieron 1, 1.5, 2, 3, 4 o 6 horas posteriores a la administración de glucosa. Un subgrupo de animales se sacrificó sin administración de glucosa para determinar el contenido de glucógeno en ayuno de 12 horas.
- Análisis de la concentración de glucógeno en respuesta a glucagon: Los ratones se ayunaron durante 12 horas al final de las cuales se les administró 6g glucosa/kg peso *i.p.* Se dejaron transcurrir cuatro horas desde la inyección de glucosa para permitir la repleción de los depósitos de glucógeno, al cabo de las cuales se les administró 16µg glucagon/kg de peso para inducir la glucogenólisis.

ii. Obtención de las muestras

Para la determinación de glucosa en sangre se cortó la punta de la cola del ratón con un bisturí para obtener una gota de sangre. La determinación se hizo con un glucómetro Optium FreeStyle de Abbot y sus correspondientes tiras reactivas.

La obtención de hígado y músculo se hizo previa inducción de anestesia profunda en los ratones. Los animales se inyectaron con una dosis de 0.063 mg/kg de peso de pentobarbital sódico (Sedalpharma) y manteniendo la anestesia por inhalación de sevoflurano (Sevorane, Sedalpharma). Una vez anestesiado el animal, se extrajo hígado y músculo, al finalizar se sacrificó cortando la columna vertebral con tijeras quirúrgicas.

iii. Almacenamiento de los tejidos.

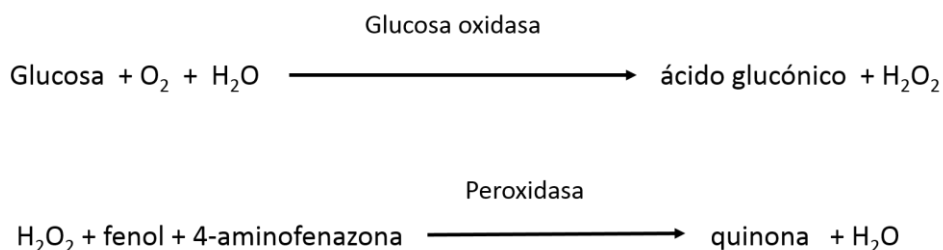
Los tejidos obtenidos se congelaron en nitrógeno líquido en el momento de la obtención y se almacenaron a -70°C hasta el momento de su procesamiento. Las muestras de hígado para determinación de AMPc se colocaron en ácido perclórico 6% en hielo para eliminar proteínas que pudieran degradar el AMPc. Los tejidos destinados a morfología se almacenaron en formalina a temperatura ambiente hasta su procesamiento.

b) Metodología

i. Determinación de glucógeno hepático por un método enzimático.

La determinación de glucógeno se hizo mediante una modificación del método de Trinder [74]. Se partió de un homogenado de 50 a 100 mg de hígado en 400 μl de agua destilada. Al homogenado se le agregó hidróxido de sodio para una concentración final de 0.1M y se incubó a 80°C durante 1 hora para degradar la glucosa existente en la muestra [75]. Una vez degradada la glucosa, el glucógeno se precipitó con etanol absoluto a 4°C y las muestras se almacenaron a -20°C toda la noche. Al día siguiente la muestra se centrifugó a 14000 rpm, durante 15 minutos a 4°C , se eliminó el sobrenadante y se secó el pellet al vacío, durante una hora a 60°C para eliminar todo el etanol. Finalmente, el pellet se resuspendió en 490ul de buffer de acetato de sodio 5 mM, pH 4.5

La degradación enzimática del glucógeno a glucosa se hizo agregando 1.4 unidades de amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* (Roche Applied Science) para un volumen final de 500 μ l, e incubando a 37° C durante una hora [76]. La cuantificación de la glucosa obtenida a partir del glucógeno se hizo mediante un kit (Glucosa GOD-PAP, Spinreact) que usa como principio las siguientes reacciones:



La cantidad de quinona obtenida es directamente proporcional a la cantidad de glucosa obtenida de la degradación de glucógeno. La concentración de glucosa se obtiene por espectrofotometría, leyendo la absorbancia a 505 nm y comparando contra un estándar de glucosa. Ya que se considera que la degradación enzimática del glucógeno es completa, el contenido de glucógeno hepático se reporta como μ g de glucógeno/mg de tejido.

ii: Determinación de glucógeno por un método histológico

También se determinó la cantidad de glucógeno en los tejidos por un método histológico, usando la tinción con ácido peryódico y reactivo de Schiff, como se ha descrito anteriormente [77].

Primero el tejido se fijó en formalina al 6%, se incluyó en parafina y se cortaron rebanadas de 5 μ m. Una vez colocados los cortes en portaobjetos, el tejido se desparafinó sumergiendo la muestra un minuto en cada uno de los siguientes reactivos: xilol, etanol/xilol (1:1), etanol absoluto y etanol 96%. Las muestras se mantuvieron hidratadas en agua destilada hasta la tinción.

Para teñir las muestras, se sumergieron 20 minutos en ácido peryódico al 5%, y se lavaron con agua destilada. Posteriormente se colocaron en reactivo de Schiff 45 minutos, al final de los cuales se lavaron con agua corriente hasta aclarar. Para contrastar la tinción se sumergieron 5 minutos en hematoxilina y se lavaron con agua corriente hasta aclarar.

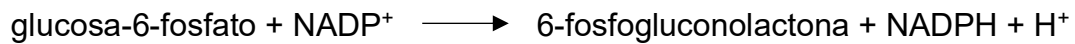
Una vez teñidos los cortes se deshidrataron con la secuencia inversa de etanol y xilol usada para desparafinar. Se montaron con medio de montaje Entellan (Merck Millipore) y se dejaron secar toda la noche. Se observaron en un microscopio Olympus CX31 acoplado a una cámara Canon EOS Rebel T3i y se tomaron fotografías de diferentes campos a 10x y 40x.

iii. Cuantificación de AMPc hepático por inmunoensayo enzimático de competencia.

El AMPc es el principal segundo mensajero del receptor de glucagon, por lo que se determinó su cantidad en hígado en respuesta a la administración de glucagon. Debido a que el AMPc es rápidamente degradado por fosfodiesterasas presentes en el tejido, es necesario deproteinizar la muestra. Para ello, inmediatamente después de la extracción se colocaron en ácido perclórico 6% en hielo y se guardaron a -70°C hasta que se obtuvieron todas las muestras para un ensayo. Una vez homogenado el tejido se centrifugó a 13 000 rpm durante 2 minutos para eliminar restos de tejido. El sobrenadante se neutralizó con hidróxido de potasio 2 M y se centrifugó para precipitar el perclorato de potasio, producto de la reacción de neutralización. El sobrenadante se usó en un inmunoensayo enzimático de competencia (Cyclic AMP XP Assay Kit, Cell Signaling), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

iv. Cuantificación de glucosa-6-fosfato en hígado por un método enzimático.

Ya que la G6P es un modulador alostérico tanto de la glucógeno sintasa como de la glucógeno fosforilasa, se determinó su concentración en hígado. La cuantificación se realizó de acuerdo al método de Hans-Jürgen Hohorst [78] que usa como principio la siguiente reacción, catalizada por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa:



Para ello, 100 mg de hígado fue homogenado en 500 μl de ácido perclórico 6% para desproteinizar la muestra. Una vez homogenado se centrifugó 10 minutos a 3000 g. Se separó el sobrenadante y el sedimento fue resuspendido en 100 μl de ácido perclórico y 100 μl de agua destilada. Se centrifugó 10 minutos en las mismas condiciones, se juntaron los dos sobrenadantes y se llevaron a un volumen final de 800 μl con agua destilada. Se agregaron 2 μl de naranja de metilo como indicador y se agregó carbonato de potasio 5M hasta el viraje del indicador (pH=3.5). Las muestras se dejaron reposar 10 minutos en hielo.

La mezcla de reacción contenía 125 μl del sobrenadante ya neutralizado, 125 μl de buffer de trietanolamina 0.4 M a pH 7.6, 2.5 μl de NADP⁺ 26.8 mM, 2.5 μl de cloruro de magnesio 0.5 M y 2 μl de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente.

Se realizaron dos lecturas, la primera (E_1) con la mezcla de reacción antes de la adición de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la segunda 5 minutos después de agregar la enzima (E_2), la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente. Las lecturas de absorbancias se hicieron a 340 nm. La concentración de glucosa-6-fosfato se calculó con la siguiente fórmula:

$$\frac{(\Delta E)(dil)}{(\epsilon)(d)} = \mu\text{moles de glucosa} - 6 - \text{fosfato por gramo de tejido}$$

Dónde:

ΔE = diferencia de las densidades ópticas = $(E_2 - E_1)$

dil = Factor de dilución total en el ensayo

ϵ = coeficiente de extinción del NADPH ($6.22 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

d = longitud de la celda (1 cm)

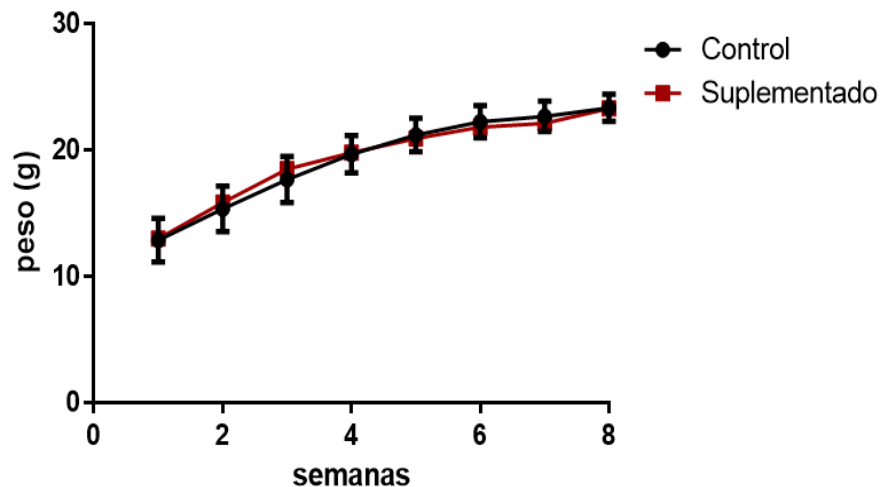
e) Análisis estadístico.

El análisis de los datos se hizo con Prism Graphpad versión 6. En todos los casos los datos se presentan como el promedio \pm el error estándar y se analizaron usando la prueba de t de student para comparar dos grupos o ANOVA de dos vías al comparar más de dos grupos y diferentes condiciones (tiempo). Se consideró una significancia estadística con un valor de p menor a 0.05.

VII. RESULTADOS

a) Control de crecimiento de los animales durante las ocho semanas del tratamiento.

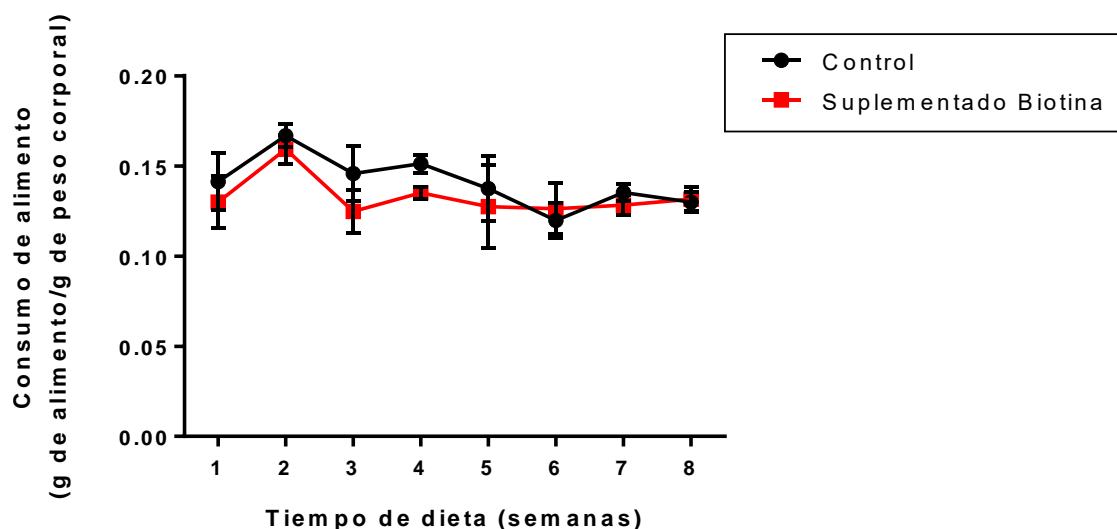
Durante las ocho semanas de tratamiento se monitoreó el crecimiento de los animales. Se observó que en ambos grupos los animales ganaron peso de manera constante y similar, alcanzando el mismo peso final. La gráfica corresponde a uno solo de los lotes utilizados y es representativa de lo observado. En la octava semana de tratamiento el peso promedio en el grupo control (n=20) fue de 23.38 ± 0.24 g, mientras que en el grupo que recibió la dieta suplementada (n=19) fue de 23.33 ± 0.38 g ($p > 0.5$).



Gráfica 1. **Efecto de la ingesta de la dieta suplementada con biotina sobre el peso corporal.** Pesos promedio de los ratones a lo largo de las 8 semanas de tratamiento. n=20 para el grupo control y n=19 para el grupo suplementado. Los datos se representan como la media \pm el error estándar, ($p=0.9852$).

b) Registro del consumo de alimento durante las ocho semanas del tratamiento.

A lo largo del tratamiento se registró una vez por semana la cantidad de alimento consumido y se ajustó al peso corporal con la final de monitorear la cantidad de biotina que recibieron.

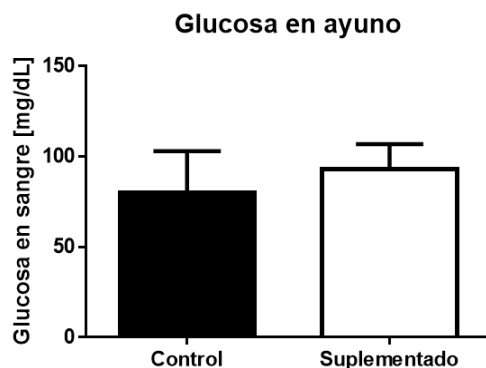


Gráfica 2. **Determinación de la ingesta de alimento durante el tiempo de la experimentación.** Los datos se presentan como la media \pm el error estándar.

Se observó que en ambos grupos la ingesta es muy similar ($p=0.652$), siendo mayor en las primeras tres semanas a partir del destete. Al final de las ocho semanas de tratamiento la ingesta diaria se había estabilizado en 0.14 ± 0.014 g de alimento/g de peso corporal, para el grupo control ($n=42$) y 0.13 ± 0.011 g de alimento por g de peso corporal para el grupo suplementado ($n=43$). Al hacer el cálculo de acuerdo a la cantidad de biotina en cada dieta, el grupo control consume aproximadamente $0.24 \mu\text{g}$ biotina por gramo de peso corporal, mientras que el grupo suplementado recibe $12.7 \mu\text{g}$ de biotina por gramo de peso, lo que representa una ingesta de 53 veces más biotina que el grupo control.

c) Determinación de glucosa en sangre en ayuno.

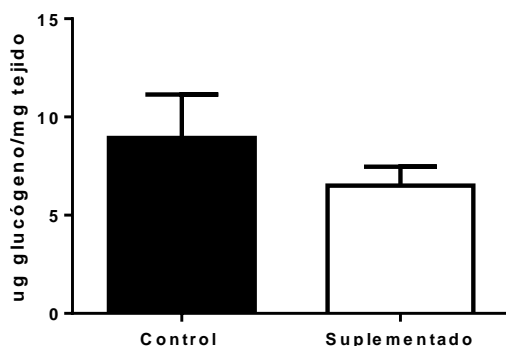
Al finalizar las ocho semanas de tratamiento se determinó la concentración de glucosa en sangre después de un ayuno de 12 horas. Siendo de 80.35 ± 5.08 mg/dL para el grupo control (n=20) y de 93.05 ± 3.17 mg/dL (n=19) para el grupo suplementado. No se observó diferencia significativa entre los grupos ($p > 0.05$).



Gráfica 3. Efecto de la ingesta de la dieta suplementada con biotina sobre la glucosa en sangre en ayuno. Los datos se representan como la media \pm el error estándar

d) Cuantificación del contenido de glucógeno hepático en ayuno.

Se determinó el contenido de glucógeno hepático en ayuno. Se encontró que la concentración en el grupo control fue de 8.92 ± 2.21 en el grupo control (n=14) y de 6.5 ± 0.96 en el grupo suplementado (n=16).



Gráfica 4. Efecto de la ingesta de la dieta suplementada con biotina sobre el glucógeno hepático en ayuno. Los datos se representan como la media \pm el error estándar.

Aparentemente el grupo suplementado almacena menos glucógeno, pero esta diferencia no es estadísticamente significativa ($p > 0.05$), ya que es difícil tener un control preciso del tiempo en que cada ratón ingirió alimento por última vez antes de retirarlo. Con el fin de reducir esta variación se decidió ayunar a los ratones durante 12 horas y posteriormente inducir la síntesis de glucógeno con la administración de glucosa (6g/kg peso, *i.p.*).

e) Cuantificación de la glucosa en sangre en respuesta a la administración de glucosa.

Como control de que la inyección de glucosa *i.p.* se hubiera realizado de manera adecuada, se midieron las concentraciones de glucosa en sangre a los 15 y 30 minutos de la inyección de 6 g de glucosa por kg de peso.

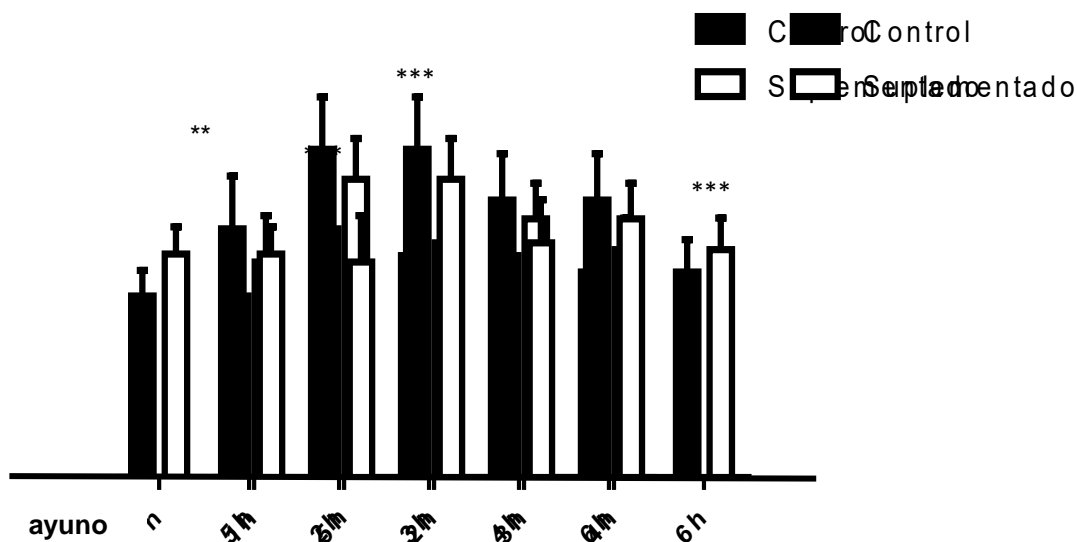
GRUPO CONTROL			GRUPO SUPLEMENTADO		
	Glucosa (mg/dl)			Glucosa (mg/dl)	
Ratón	15 min	30 min	Ratón	15 min	30 min
1	*	*	1	225	387
2	*	*	2	437	442
3	59	63	3	408	429
4	*	499	4	346	376
5	*	446	5	481	320
6	256	268	6	269	*
7	484	450	7	*	*
8	338	495	8	469	*
9	397	500	9	302	406
10	*	*	10	234	161
11	256	303	11	*	*
12	485	*	12	455	*
13	348	470	13	470	*
14	411	*	14	425	468
15	*	*	15	282	477
16	*	*			
Promedio	337.1 ± 14.01	388.2 ± 15.06	Promedio	369.5 ± 7.11	385.1 ± 10.17

Tabla 2. Efecto de la ingesta de la dieta suplementada con biotina en la respuesta a la administración de glucosa 6mg/kg *i.p.* Se muestran los datos de glucosa en sangre a los 15 y 30 minutos de la administración de glucosa. (*) indica una lectura por encima del límite de detección del glucómetro, que es de 500 mg/dl.

Si bien la concentración promedio de glucosa en sangre en ambos tiempos es muy similar entre grupos, es notorio que la frecuencia con que se presentan valores por encima de los 500 mg/dl, el límite de detección del glucómetro, es mayor en el grupo control. Esto podría indicar que el grupo suplementado está mejor preparado para enfrentar el reto metabólico que representa una dosis tan alta de glucosa. Sin embargo al no conocer la concentración de glucosa en sangre alcanzada no podemos ahondar en análisis.

f) Cuantificación del glucógeno hepático después de la administración de glucosa.

Después de ayunar a los animales por 12 horas se sacrificó un grupo (etiquetado en la gráfica como *ayuno*). Al resto se le administró glucosa (6g/kg de peso, *i.p.*) y se sacrificaron animales en los tiempos indicados.



Gráfica 5. Efecto de la ingesta de la dieta suplementada con biotina sobre el glucógeno hepático en ayuno y a diferentes tiempos después de la inyección de glucosa 6g/kg *i.p.* Los datos se presentan como la media ± el error estándar (** p<0.005 respecto a ayuno, ***p<0.0001 respecto al ayuno)

Al cuantificar el glucógeno hepático a diferentes tiempos después de la administración de glucosa obtuvimos información sobre su síntesis y degradación. Observamos que después de la administración de glucosa, el contenido de glucógeno hepático incrementa considerablemente ($p=0.0021$ con respecto al contenido de glucógeno en ayuno) a una hora de la inyección de glucosa y continúa aumentando hasta las dos horas ($p< 0.0001$ con respecto al contenido de glucógeno en ayuno), donde se encuentran los valores máximos del contenido de glucógeno. Tres, cuatro y seis horas después de la inyección de glucosa observamos una disminución del contenido de glucógeno. Dicha disminución no es significativa con respecto al tiempo máximo de almacenamiento, que fue 2 horas, a las 3 ($p=0.0860$, respecto a las 2h) y 4 horas ($p=0.3187$, respecto a las 2h), pero si a las 6 horas ($p=0.0351$, respecto a las 2h). Cabe señalar que aún a las seis horas de la administración de la glucosa, los niveles de glucógeno son mayores significativamente a los observados en ayuno ($p< 0.0001$, con respecto al contenido de glucógeno en ayuno). En estos experimentos no encontramos diferencias significativas entre grupos.

g) Análisis histológico del contenido de glucógeno hepático después de la administración de glucosa.

Además de la cuantificación enzimática de glucógeno, se obtuvieron cortes de hígado en ayuno y a las 2h y 3h después de la administración de glucosa. Mediante la tinción con ácido periódico y reactivo de Schiff se observó la variación en la cantidad de glucógeno entre grupos.

En todos los cortes se observa una morfología típica del hígado, con los hepatocitos ordenados alrededor de las venas centrales. En ayuno se observa muy poco marcaje con la fucsina, lo que indica poca cantidad de glucógeno. En las laminillas representativas de lo ocurrido después de dos horas de haber administrado la glucosa se observa un aumento en la cantidad de glucógeno. A las tres horas esta comienza a disminuir. En todos los casos, la mayor variación en la cantidad de glucógeno se observa cerca de las venas centrales. En los tres tiempos analizados

el grupo suplementado contiene una distribución de glucógeno, menos homogénea y menos coloración en las secciones distales a los vasos sanguíneos.

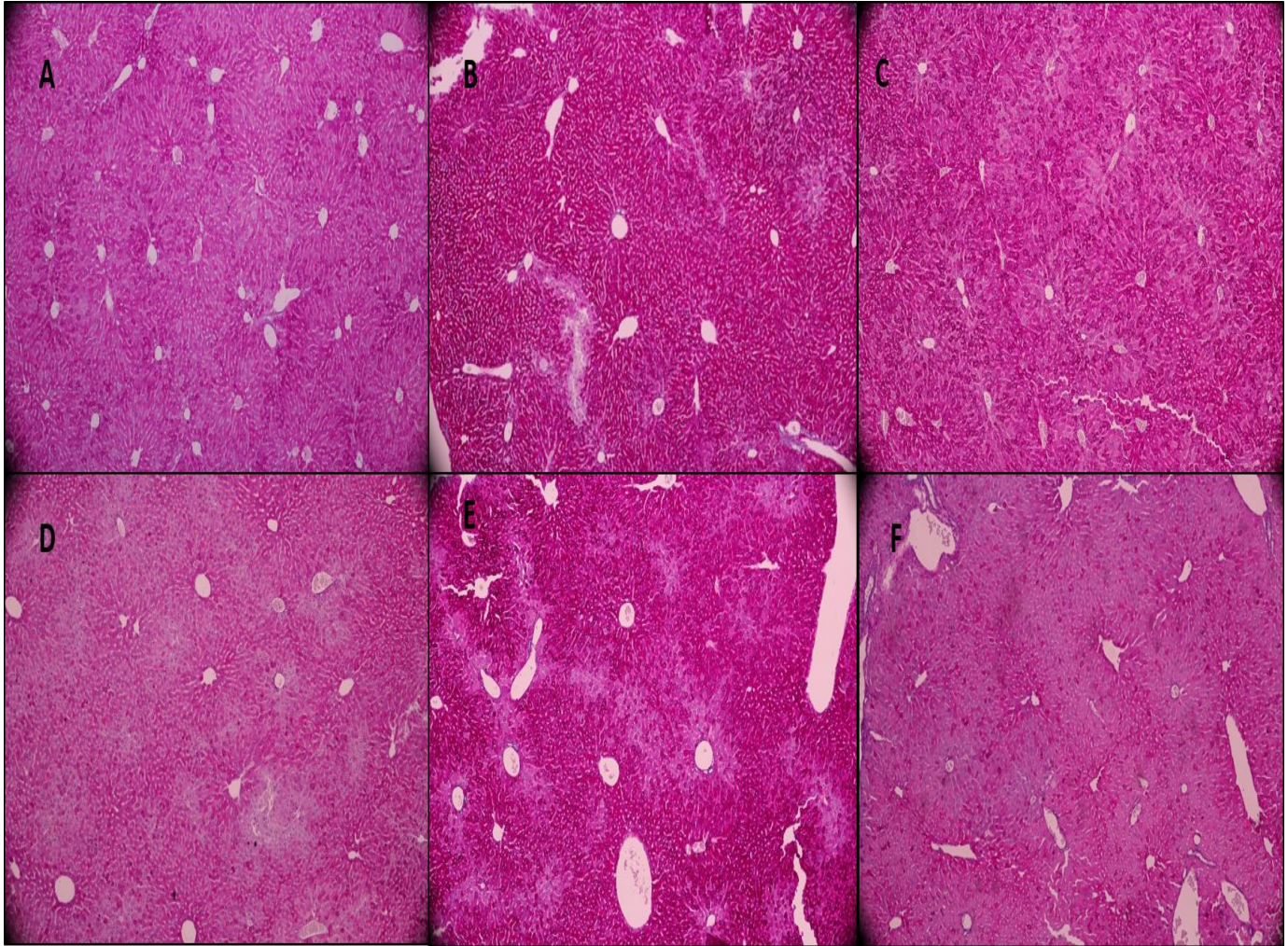
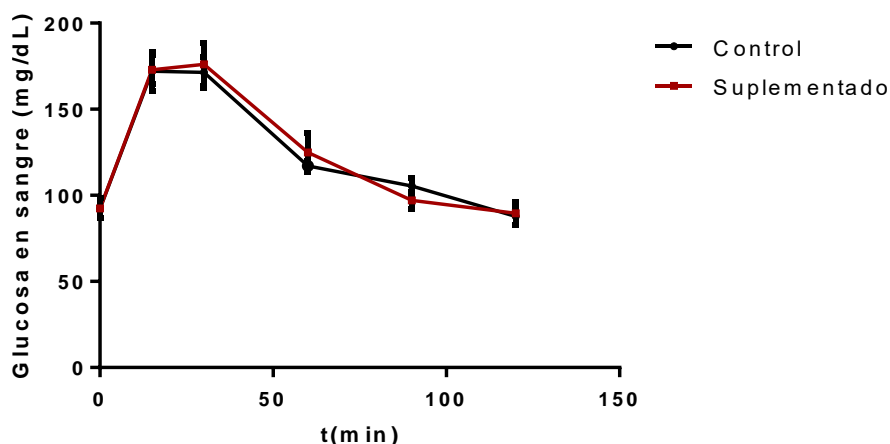


Figura 10. **Efecto de la ingesta de biotina en la dieta sobre el contenido de glucógeno hepático, evidenciado por tinción con ácido peryódico y reactivo de Schiff.** Un color más intenso es indicativo de una mayor cantidad de glucógeno. Los tres paneles superiores representan al grupo control y los tres inferiores al grupo suplementado. Los paneles A y D corresponden a hígado en ayuno de 12 h; B y E corresponden a hígado a las 2 h después de la administración de glucosa; C y F representan el contenido de glucógeno hepático 3 horas después. Los espacios blancos que se observan en los cortes son venas hepáticas. Todas las imágenes fueron tomadas con un aumento de 10x

h) Determinación de glucosa en sangre en respuesta a glucagon

Un estudio previo realizado en nuestro laboratorio, en el mismo modelo experimental (datos no publicados) encontró mayor expresión de mRNA de glucagon en páncreas de los animales que recibieron la dieta suplementada con biotina, acompañada de una mayor concentración de glucagon en plasma y mayor secreción de la hormona *in vitro*, sin embargo esto no modificó los niveles de glucosa sanguínea en ayuno, lo que sugiere una resistencia a los efectos glucogenolíticos y gluconeogénicos del glucagon

Para analizar la lisis del glucógeno en respuesta al glucagon hicimos una modificación a nuestro modelo experimental. Los animales se ayunaron durante 12 horas al final de las cuales se les administró glucosa como se había hecho anteriormente, para inducir la síntesis de glucógeno. Cuatro horas después de la administración de glucosa, se les administró glucagon *i.p.*, (16 ug/kg peso), en estas condiciones se tomaron muestras de sangre de la cola para cuantificar la glucosa sanguínea. En las mismas condiciones, 15 minutos después de la administración de glucagon se obtuvo el hígado para determinar el contenido de glucógeno y del AMPc, segundo mensajero en la señalización del glucagon.

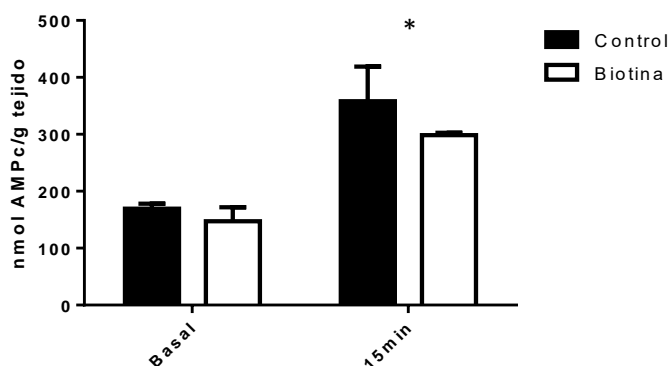


Gráfica 6. Efecto de la ingesta de la dieta suplementada con biotina sobre la glucosa en sangre en respuesta a glucagon. Los datos se representan como la media \pm el error estándar y corresponden a 7 ratones para el grupo control y 8 para el grupo suplementado.

Los resultados obtenidos no encontraron ninguna diferencia entre grupos ni en la glucosa sanguínea en ayuno ni en la respuesta a glucagon, lo que indica que la sensibilidad a esta hormona no se ve afectada por la suplementación con biotina. Para corroborar esto, se realizó la determinación AMPc y de glucógeno hepático 15 minutos después de la administración de glucagon.

i) Concentración de AMPc hepático en respuesta a glucagon.

Se administró glucagon (16 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso, *i.p.*) y 15 minutos después se cuantificó la concentración de AMPc, su principal segundo mensajero.

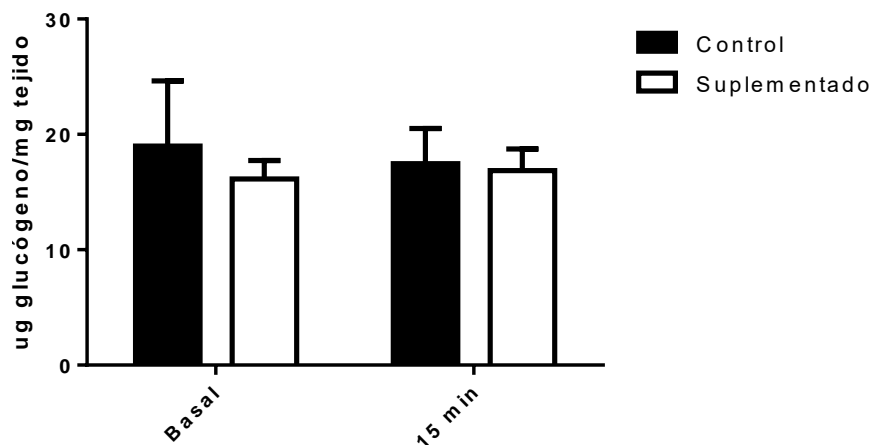


Gráfica 7. **Efecto de la suplementación con biotina en la concentración de AMPc hepático en respuesta a glucagon.** Los datos representan la media \pm error estándar. En condiciones basales $n=3$ para ambos grupos; después de la administración de glucagon la n es de 4 para el grupo control y 3 para el suplementado.

Se observa que en ambos grupos se incrementa significativamente la concentración de AMPc después de la administración de glucagon. En el grupo control pasa de 169.2 ± 8.85 nmol de AMPc por gramo de tejido ($n=3$) a 354.2 ± 60.73 ($n=4$) tras la administración de glucagon. En el grupo que recibió la suplementación con biotina aumentó de 147.37 ± 24.65 nmol de AMPc/g de tejido a 298.7 ± 3.87 nmol de AMPc/g de tejido. El análisis estadístico no muestra diferencias significativas entre los grupos, debido a la desviación observada en los datos del grupo control.

j) Cuantificación del glucógeno hepático en respuesta a glucagon.

Se cuantificó también el glucógeno hepático 15 minutos después de la administración de glucagon.

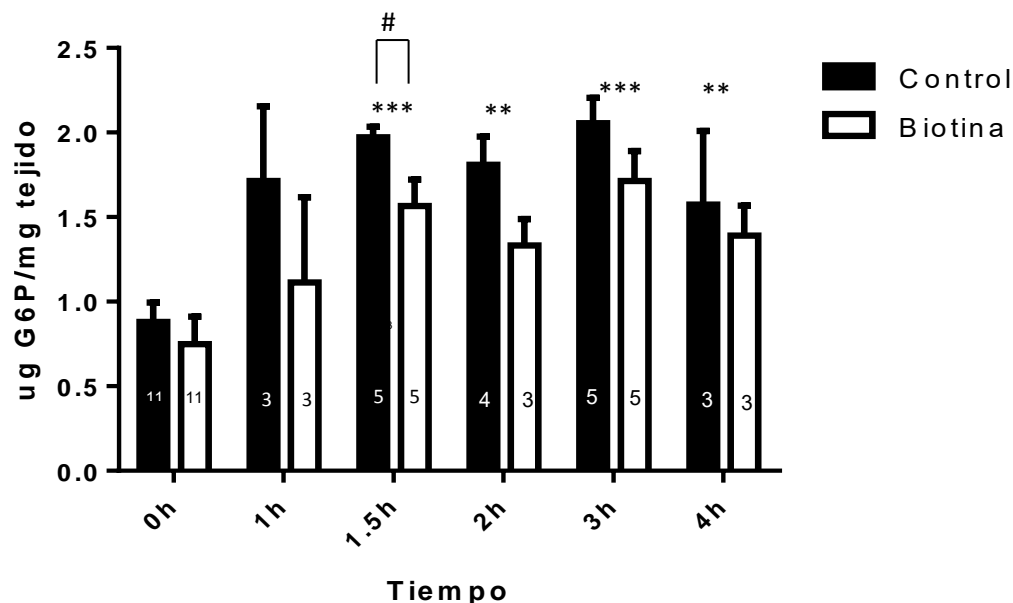


Gráfica 8. **Efecto de la ingesta de la dieta suplementada con biotina sobre el glucógeno hepático antes y después de la administración de glucagon.** Los datos se representan como la media \pm el error estándar. En todos los casos $n=3$, excepto el grupo suplementado antes de la administración de glucagon, que es de 4.

No se observaron diferencias entre grupos y no se observó la respuesta esperada a la administración de glucagon, es decir, disminución en el contenido de glucógeno hepático. El contenido de glucógeno hepático, en ug por gramo de tejido es, en el grupo control de 18.98 ± 5.67 antes de la administración de glucagon y de 17.46 ± 3.05 después. Para el grupo control es de 16.14 ± 1.59 antes de la administración de glucagon y 16.85 ± 1.89 15 minutos después de la inyección.

k) Concentración de glucosa-6-fosfato después de la administración de glucosa.

Otro parámetro que se midió fue la cantidad de glucosa-6-fosfato en hígado a diferentes tiempos posteriores a la administración de glucosa.

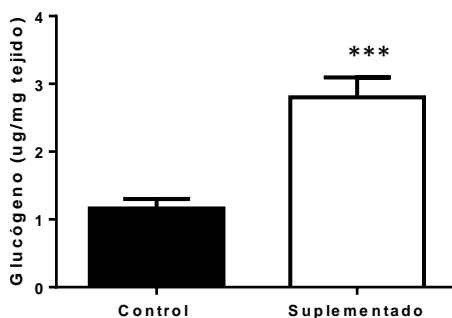


Gráfica 9. Efecto de la ingesta de la dieta suplementada con biotina sobre el contenido de glucosa-6-fosfato en hígado en ayuno (0h) y a diferentes tiempos después de la administración de glucosa 6g/kg peso, *i.p.* (1h a 4h) Los datos se representan como la media \pm el error estándar. Los números en cada barra indican el número de animales en ese grupo. ANOVA de dos vías $p=0.0135$ para el tratamiento y $p<0.0001$ para el tiempo. (** para $p<0.05$ respecto a las 0h; *** para $p<0.0001$ respecto a las 0h; # para $p<0.05$ respecto al grupo control).

Los resultados mostraron que la concentración de glucosa-6-fosfato en hígado aumentó después de la administración de glucosa (ANOVA de dos vías, $p<0.0001$). Al analizar el contenido de glucosa-6-fosfato antes (0h) y a diferentes tiempos después de la administración de glucosa (1h a 4h) observamos un incremento significativo a 1.5 h ($p<0.001$), 2h ($p=0.0044$), 3h ($p<0.0001$) y 4h ($p=0.0242$) después de la administración de glucosa. También se encontraron diferencias entre grupos (ANOVA de dos vías, $p=0.0135$). La comparación entre los grupos reveló que la concentración de glucosa-6-fosfato fue significativamente menor en el grupo

suplementado ($p=0.0421$) respecto al grupo control 1.5 horas después de la administración de glucosa. A pesar de la variación en los datos, consistentemente se observa que la concentración de glucosa-6-fosfato es significativamente menor en el grupo que recibió la suplementación con biotina.

I) Cuantificación de glucógeno muscular en ayuno.



Gráfica 11. Efecto de la ingesta de la dieta suplementada con biotina sobre el contenido de glucógeno en músculo después de un ayuno de 12 horas. Los datos se presentan como la media \pm el error estándar ($n=10$ para el grupo control y $n=6$ para el grupo suplementado), $p = 0.0014$.

A diferencia del efecto de la suplementación con biotina sobre las concentraciones de glucógeno en el hígado, en el músculo se observa una cantidad significativamente mayor de glucógeno en los animales que recibieron la suplementación con biotina ($p<0.001$).

VIII. DISCUSIÓN

Los resultados de estos estudios mostraron que la suplementación con biotina no repercutió en la tasa de crecimiento ni en el peso de los animales adultos. La dosis farmacológica de biotina tampoco afectó las concentraciones de glucosa en sangre en condiciones de ayuno y no produjo hipoglucemia en animales normoglucémicos, lo que concuerda con reportes previos en el mismo modelo [61]. Cabe señalar que en personas no diabéticas [79] tampoco se encuentran cambios en la glucemia en ayuno .

El efecto de dosis farmacológicas de biotina sobre el contenido de glucógeno hepático se analizó en diferentes condiciones: a) después de 12 horas de ayuno; b) en respuesta a la administración de glucosa; y c) en respuesta a glucagon.

Al analizar el contenido de glucógeno hepático en ayuno observamos que en el grupo suplementado este mostró una tendencia a ser menor, sin embargo la variación en los datos, en particular del grupo control, hizo que esta diferencia no resultara estadísticamente significativa. En el análisis histológico también se observó menor intensidad de la coloración debida al glucógeno. Debido a que es difícil saber el tiempo preciso en que cada ratón ingirió alimento por última vez antes de retirarlo y con el fin de disminuir la variación observada en los datos, se administró glucosa (6g/kg de peso, *i.p.*) para inducir la glucogenogénesis. La administración de glucosa nos permitió observar el curso de la síntesis y degradación del glucógeno hepático, observándose la mayor concentración de glucógeno a las 2 horas en ambos grupos. En los tiempos analizados no se observó diferencia significativa entre los grupos. Resulta interesante señalar que en los datos histológicos se observa menos glucógeno, sin embargo al ser esta prueba de naturaleza cualitativa, no es posible obtener conclusiones.

Además de la determinación de glucógeno hepático se midió la glucosa en sangre a los 15 y 30 minutos después de la inyección de glucosa. Se encontró que una menor proporción de animales que recibieron la suplementación con biotina presentó valores de glucosa en sangre por encima de los 500 mg/dL en

comparación con los animales que recibieron una dieta estándar. Estos resultados pueden ser indicativos de que los animales que recibieron la suplementación con biotina están mejor preparados para enfrentar retos metabólicos. Para comprobar esta conjetura es necesario repetir esta la determinación de glucosa en sangre con un método con un límite de detección más alto, o bien diluir la muestra de sangre y determinarla con el mismo glucómetro. De resultar cierto nuestro supuesto, sería interesante probar nuestro modelo de suplementación con biotina durante ocho semanas en ratones hiperglucémicos. Esto además nos permitiría comparar el efecto de la biotina en nuestro modelo con el efecto observado en modelos animales de diabetes donde dosis de biotina diferentes a la administrada en nuestro modelo resultan en una mejoría en las pruebas de tolerancia a la glucosa [53, 54].

Un estudio previo realizado en nuestro laboratorio, en el mismo modelo experimental (datos no publicados), encontró una mayor expresión de mRNA de glucagon en páncreas de los animales que recibieron la dieta suplementada con biotina, acompañada de una mayor concentración de glucagon en plasma y mayor secreción de la hormona *in vitro*, sin embargo esto no modificó los niveles de glucosa sanguínea en ayuno ni la tolerancia a la glucosa, lo que sugiere la existencia de resistencia al glucagon. Con el fin de abordar esta posibilidad implementamos un modelo exacerbando la degradación de glucógeno mediante la inducción de su degradación en respuesta a esta hormona.

Para probar esta propuesta primero se administró glucosa para inducir la síntesis de glucógeno y posteriormente se inyectó glucagon esperando inducir la glucogenólisis y la liberación de glucosa a la sangre de acuerdo a lo descrito anteriormente [36]. Se observó que la acción hiperglucemiante del glucagon es similar en los ambos grupos, aumentando hasta alrededor de 170mg/dL a los 15 minutos y regresando a valores basales de aproximadamente 90mg/dL 120 minutos después de la inyección.

Al analizar la concentración de AMPc en hígado en respuesta a la inyección de glucagon se observa un incremento tanto en el grupo control como en el suplementado. Aunque el incremento aparentemente difiere entre los grupos,

siendo menor en el grupo suplementado, la variabilidad en los datos y la cantidad de animales en cada grupo (n=3 y 4) hace que este no sea significativo por lo que se requiere aumentar el número de casos para poder concluir al respecto.

A pesar de que se observó un incremento en la glucosa sanguínea (Gráfica 6) y en el AMPc (gráfica 7) en hígado en respuesta a la inyección de glucagon, esto no se vio reflejado en disminución en el contenido de glucógeno hepático (Gráfica 8). Una interpretación es que en nuestro modelo, 15 minutos no sean el tiempo óptimo para ver el efecto del glucagon sobre el glucógeno, la lenta disminución del contenido de glucógeno en los experimentos de curso temporal sustentan esta posibilidad. Existen estudios previos por otros grupos en los que analizaron el efecto de la administración de glucagon en la concentración de AMPc hepático [80-83]. Para ello usaron cultivos de hepatocitos [80, 81] o muestras de hígado tomadas del mismo animal (rata y conejo) a diferentes tiempos, bajo anestesia [82, 83]. En estos estudios observaron aumentos de 2 a 8 veces la concentración inicial de cAMP entre 2 y 20 minutos después de la administración de glucagon, sin embargo, solo dos de los estudios determinaron también la cantidad de glucosa liberada y ninguno estudió la variación en la cantidad de glucógeno. Sería entonces interesante hacer la determinación conjunta de los cambios en las concentraciones de AMPc y glucógeno hepático y de glucosa sanguínea a diferentes tiempos después de la administración de glucagon.

En cuanto a la determinación de glucosa-6-fosfato en hígado, se encontró que su concentración aumenta después de la administración *i.p.* de glucosa. Además, la cantidad de glucosa-6-fosfato es significativamente menor en el grupo suplementado respecto al control 1.5 h después de la inyección de glucosa. La investigación realizada en este trabajo no permite proponer un mecanismo por el cual se produzca esta disminución en la cantidad de glucosa-6-fosfato. Sin embargo, este dato en conjunto con la evidencia previa de que la biotina en dosis farmacológicas aumenta la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa [65] podría indicar un uso más activo de la glucosa incorporada al hígado en la vía de las pentosa fosfato. Son necesarias más pruebas para comprobar esta hipótesis midiendo, por ejemplo,

la cantidad de NADPH, o de ribosa-5-fosfato en hígado, en los mismos tiempos en los que se determinó la cantidad de glucógeno y de G6P.

Resultan sumamente interesantes los resultados obtenidos en músculo, ya que la concentración de glucógeno en músculo en ayuno es significativamente más alta en el grupo suplementado que en el control. Ya que existe evidencia de que la biotina aumenta la abundancia del transportador GLUT4 en la membrana celular en ratas OLEFT, un modelo de diabetes tipo II [84], es posible que esto también suceda en nuestros ratones y resulte en un mayor acumulo de glucógeno en músculo en los animales suplementados con biotina. Además, ya que en el músculo no hay actividad de glucosa-6-fosfatasa, ni receptor a glucagon, podría explicar que el contenido de glucógeno en el ayuno de 12 horas sea menos variable en el músculo que en el hígado. Sería de interés ahondar en los efectos de la suplementación con biotina en la síntesis de glucógeno en respuesta a una carga de glucosa y a la insulina, hormona que favorece la entrada de glucosa al músculo. Esto puede darnos una nueva perspectiva en el papel de la biotina en el metabolismo de glucógeno en este tejido.

***glucógeno en el ejercicio

Si bien nuestro estudio no mostró diferencias significativas en el metabolismo de glucógeno en el hígado después de la suplementación con biotina, sería interesante investigar este efecto en animales diabéticos, ya que en la literatura la mayoría de los efectos reportados de la biotina sobre la homeostasis de la glucosa se han encontrado en pacientes y en modelos diabéticos de rata y ratón [53, 56-58, 62, 63].

IX. CONCLUSIONES

La administración de dosis farmacológicas de biotina durante ocho semanas en animales sanos no modifica significativamente las concentraciones de glucógeno a) después de 12 horas de ayuno; b) en respuesta a la administración de glucosa; y c) en respuesta a glucagon.

Como ha sido observado en otros estudios, la administración de biotina durante ocho semanas no afecta el crecimiento de los ratones, ni modifica la glucemia en ayuno.

Nuestros resultados preliminares muestran que la suplementación con biotina durante ocho semanas aumenta el almacenamiento de glucógeno en músculo. Son necesarios más estudios para determinar el mecanismo por el que esto sucede así como la respuesta del músculo ante otras situaciones como la administración de glucosa.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Oosterveer, M.H. and K. Schoonjans, *Hepatic glucose sensing and integrative pathways in the liver*. Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(8): p. 1453-67.
2. *Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus*, in NOM-015-SSA2-2010. 23 de noviembre 2010, Diario Oficial de la Federación.
3. Tintinalli, *Medicina de urgencias*. 7a ed. Vol. 2. 2013: McGraw-Hill.
4. Mrugacz, M., A. Bryl, and A. Bossowski, *Neuroretinal apoptosis as a vascular dysfunction in diabetic patients*. Curr Neuropharmacol, 2016.
5. Wong, T.Y., et al., *Diabetic retinopathy*. Nat Rev Dis Primers, 2016. **2**: p. 16012.
6. Kawanami, D., K. Matoba, and K. Utsunomiya, *Signaling pathways in diabetic nephropathy*. Histol Histopathol, 2016: p. 11777.
7. Gnudi, L., *Angiopoietins and diabetic nephropathy*. Diabetologia, 2016.
8. Juster-Switlyk, K. and A.G. Smith, *Updates in diabetic peripheral neuropathy*. F1000Res, 2016. **5**.
9. Amin, N. and J. Doupis, *Diabetic foot disease: From the evaluation of the "foot at risk" to the novel diabetic ulcer treatment modalities*. World J Diabetes, 2016. **7**(7): p. 153-64.
10. Bartus, C.L. and D.J. Margolis, *Reducing the incidence of foot ulceration and amputation in diabetes*. Curr Diab Rep, 2004. **4**(6): p. 413-8.
11. Ruderman, N.B., et. al. , *Hormone-fuel interrelationships: fed state, starvation and diabetes mellitus.*, in *Joslin's Diabetes Mellitus*, R.e.a. Kahn, Editor. 2005, Lippincott Williams and Wilkins: U.S. . p. 129-135.
12. Scheepers, A., Hans-George, J., Schurmann, A., *The glucose transporter families SGLT and GLUT: Molecular basis of normal and abnormal function*. J Parenter Enteral Nutr, 2004. **28**(5): p. 364-71.
13. Thorens, B. and M. Mueckler, *Glucose transporters in the 21st Century*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010. **298**(2): p. E141-5.
14. Leturque, A., et al., *The role of GLUT2 in dietary sugar handling*. J Physiol Biochem, 2005. **61**(4): p. 529-37.
15. DeFronzo, R., *The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization*. 1981.
16. Zisman A, P.O., Abel ED, *Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance*. Nat Med, 2000. **6**: p. 924-28.
17. Voet, *The glycolytic pathway*, in *Biochemistry*. 2011, John Wiley & Sons, Inc.: USA. p. 595-600, 662-664.
18. Cardenas, M.L., E. Rabajille, and H. Niemeyer, Eur J Pharmacol, 1984. **145**(163-171).
19. Devlin, T., *Carbohydrate metabolism I: Major metabolic pathways and their control*, in *Textbook of biochemistry with clinical correlations*. 2010, John Wiley & Sons, Inc.: USA. p. 606-608.
20. de la Iglesia, N., *The Role of the Regulatory Protein of Glucokinase in the Glucose Sensory Mechanism of the Hepatocyte*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(14): p. 10597-10603.
21. McKee, *Metabolismo de los hidratos de carbono*, in *Bioquímica: La base molecular de la vida*. 2003, McGraw Hill Interamericana: España. p. 234-271.
22. Voet, *Gluconeogenesis*, in *Biochemistry*. 2004, John Wiley and Sons: USA. p. 843-850.

23. Mutel, E., et al., *Control of blood glucose in the absence of hepatic glucose production during prolonged fasting in mice: induction of renal and intestinal gluconeogenesis by glucagon*. *Diabetes*, 2011. **60**(12): p. 3121-31.
24. Wahren, J. and K. Ekberg, *Splanchnic regulation of glucose production*. *Annu Rev Nutr*, 2007. **27**: p. 329-45.
25. Voet, *Glycogen metabolism*, in *Biochemistry*. 2004, John Wiley & Sons, Inc: USA. p. 626-650.
26. Geddes, R., J.D. Harvey, and P.R. Wills, *The molecular size and shape of liver glycogen*. *Biochem J*, 1977. **163**(2): p. 201-9.
27. Bollen, M., *Specific features of glycogen metabolism in the liver*. *Biochem J*, 1998. **336**: p. 19-31.
28. Skurat, A., Dietrich, A, Roach, PJ, *Interaction between glycogenin and glycogen synthase*. *Arch Biochem Biophys*, 2006. **456**(1): p. 93–97.
29. Melendez-Hevia, E., T.G. Waddell, and E.D. Shelton, *Optimization of molecular design in the evolution of metabolism: the glycogen molecule*. *Biochem J*, 1993. **295 (Pt 2)**: p. 477-83.
30. <PAS Glycogen_Staining.pdf>.
31. Issoglio, F.M., et al., *Mechanisms of monomeric and dimeric glycogenin autoglucosylation*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(3): p. 1955-61.
32. Gibbons, B.J., P.J. Roach, and T.D. Hurley, *Crystal structure of the autocatalytic initiator of glycogen biosynthesis, glycogenin*. *J Mol Biol*, 2002. **319**(2): p. 463-77.
33. Häggström, M., G. structure, Editor. 2009, Wikiversity Journal of Medicine: "Medical gallery of Mikael Häggström 2014.
34. Villar-Palasi, C., Guinovart, J., *The role of glucose 6-phosphate in the control of glycogen synthase*. *FASEB*, 1997. **11**(7): p. 544-48.
35. Bouskila, M., *Allosteric regulation of glycogen synthase controls glycogen synthesis in muscle*. *Cell Metab*, 2010. **12**(5): p. 456-466.
36. Jiang, G. and B.B. Zhang, *Glucagon and regulation of glucose metabolism*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003. **284**(4): p. E671-8.
37. Rayasam, G.V., et al., *Glycogen synthase kinase 3: more than a namesake*. *Br J Pharmacol*, 2009. **156**(6): p. 885-98.
38. Livanova, N.B., et al., *Pyridoxal 5'-phosphate as a catalytic and conformational cofactor of muscle glycogen phosphorylase B*. *Biochemistry (Mosc)*, 2002. **67**(10): p. 1089-98.
39. Fraeyman, N., et al., *Effect of maturation and aging on beta-adrenergic signal transduction in rat kidney and liver*. *Biochem Pharmacol*, 2000. **60**(12): p. 1787-95.
40. Nelson, D.L., Cox, M.M, *Lehninger principles of biochemistry*. 7th ed. 2012, USA: W. H. Freeman and company.
41. Jiang, G., *Glucagon and regulation of glucose metabolism*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003. **284**: p. E671-E678.
42. Quesada, I., et al., *Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes*. *J Endocrinol*, 2008. **199**(1): p. 5-19.
43. Ramnanan, C.J., et al., *Physiologic action of glucagon on liver glucose metabolism*. *Diabetes Obes Metab*, 2011. **13 Suppl 1**: p. 118-25.
44. Dakshinamurti, K. and J. Chauhan, *Biotin*. *Vitamins and Hormones*, 1989. **45**: p. 337-384.
45. Medicine, I.o., *Biotin in dietary reference*. In *Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, panthotenic acid and choline*. Natl Acad. Press., 2000.
46. McMahan, R.J., *Biotin in metabolism and molecular biology*. *Annu Rev Nutr*, 2002. **22**: p. 221-39.

47. Said, H., *Cellular uptake of biotin: mechanisms and regulation*. J. Nutr., 1999. **129**: p. 490S-493S.
48. Mock, D., *Distribution of biotin in human plasma: most of the biotin is not bound to protein*. Am J Clin Nutr, 1992. **56**: p. 427-32.
49. Said, H., *Biotin: Biochemical physiological and clinical aspects*, in *Water soluble vitamins. Clinical research and future applications*. , O. Stanger, Editor. 2012, Springer: London, UK. p. 1-20.
50. Pacheco-Alvarez, D.e.a., *Biotin in metabolism and its relationship to human disease*. Archives of Medical Research, 2002. **33**: p. 439-447.
51. Wiedmann, S., et al., *Clusters of biotin-responsive genes in human peripheral blood mononuclear cells*. J Nutr Biochem, 2004. **15**(7): p. 433-9.
52. Dakshinamurti, K., *Biotin--a regulator of gene expression*. J Nutr Biochem, 2005. **16**(7): p. 419-23.
53. Reddi, A., et al., *Biotin supplementation improves glucose and insulin tolerances in genetically diabetic KK mice*. Life Sci, 1988. **42**(13): p. 1323-30.
54. Zhang, H., et al., *A high biotin diet improves the impaired glucose tolerance of long-term spontaneously hyperglycemic rats with non-insulin-dependent diabetes mellitus*. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 1996. **42**(6): p. 517-26.
55. Koutsikos, D., et al., *Oral glucose tolerance test after high-dose i.v. biotin administration in normoglycemic hemodialysis patients*. Ren Fail, 1996. **18**(1): p. 131-7.
56. Maebashi, M., *Therapeutic evaluation of the effect of biotin on hyperglycemia in patients with non-insulin dependent diabetes melitus*. J. Clin. Biochem. Nutr., 1993. **14**: p. 211-218.
57. Coggeshall, J., *Biotin status and plasma glucose in diabetics*. Ann NY Acad Sci, 1985. **447**(1): p. 389-392.
58. Hemmati, M., *Survey of the Effect of Biotin on Glycemic Control and Plasma Lipid Concentrations in Type 1 Diabetic Patients in Kermanshah in Iran (2008-2009)*. Oman Medical Journal, 2013. **28**(3): p. 195-198.
59. Romero-Navarro, G., *Biotin Regulation of Pancreatic Glucokinase and Insulin in Primary Cultured Rat Islets and in Biotin-Deficient Rats*. Endocrinology, 1999. **140**(10): p. 4595-4600.
60. Vilches-Flores, A., et al., *Biotin increases glucokinase expression via soluble guanylate cyclase/protein kinase G, adenosine triphosphate production and autocrine action of insulin in pancreatic rat islets*. J Nutr Biochem, 2010. **21**(7): p. 606-12.
61. Lazo de la Vega-Monroy, M.L., et al., *Effects of biotin supplementation in the diet on insulin secretion, islet gene expression, glucose homeostasis and beta-cell proportion*. J Nutr Biochem, 2013. **24**(1): p. 169-77.
62. Dakshinamurti, K., *Transcriptional regulation of liver phosphoenol pyruvate carboxykinase by biotin in diabetic rats*. Mol Cell Endocrinol, 1994.
63. Sugita, Y., et al., *Effect of biotin treatment on hepatic gene expression in streptozotocin-induced diabetic rats*. Biosci Biotechnol Biochem, 2008. **72**(5): p. 1290-8.
64. Chauhan, J., *Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats*. J Biol Chem, 1991. **266**(16): p. 10035.
65. Larrieta, E., et al., *Pharmacological concentrations of biotin reduce serum triglycerides and the expression of lipogenic genes*. Eur J Pharmacol, 2010. **644**(1-3): p. 263-8.
66. Dakshinamurti, K., *Biotin and Protein Synthesis in Rat Liver*. The Journal of Biological Chemistry, 1970. **245**: p. 5600-55605.
67. Paul, P.K. and P.N. Duttagupta, *The effect of an acute dose of biotin at the pre-implantation stage and its relation with female sex steroids in the rat*. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 1975. **21**(2): p. 89-101.

68. Paul, P.K., *Dynamics of hepatic glycogen: oestrogen and pregnancy*. Acta Endocrinol (Copenh), 1972. **71**(2): p. 385-92.
69. Paul, P.K. and P.N. Dutttagupta, *The effect of an acute dose of biotin at a post-implantation stage and its relation with female sex steroids in the rat*. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 1976. **22**(3): p. 181-6.
70. Paul, P.K., P.N. Dutttagupta, and H.C. Agarwal, *Effects of an acute dose of biotin on the reproductive organs of the female rat*. Curr Sci, 1973. **42**(6): p. 206-8.
71. Huber, G.C., *The development of the albino rat, Mus norvegicus albinus*. 1915, Philadelphia, Pa.
72. Baez-Saldana, A., et al., *Biotin deficiency and biotin excess: effects on the female reproductive system*. Steroids, 2009. **74**(10-11): p. 863-9.
73. Aguilera-Mendez, A. and C. Fernandez-Mejia, *The hypotriglyceridemic effect of biotin supplementation involves increased levels of cGMP and AMPK activation*. Biofactors, 2012. **38**(5): p. 387-94.
74. Trinder, P., *Determination of Glucose in Blood Using Glucose Oxidase with an Alternative Oxygen Acceptor*. Annals of Clinical Biochemistry: An international journal of biochemistry and laboratory medicine, 1969. **6**(1): p. 24-27.
75. Yang, B.Y. and R. Montgomery, *Alkaline degradation of glucose: effects of initial concentrations of reactants*. Carbohydrate Research, 1996. **280**: p. 27-45.
76. Dringen, R. and B. Hamprecht, *Glucose, insulin, and insulin-like growth factor I regulate the glycogen content of astroglia-rich primary cultures*. J Neurochem, 1992. **58**(2): p. 511-7.
77. Sanchez-Chavez, G., et al., *Effect of diabetes on glycogen metabolism in rat retina*. Neurochem Res, 2008. **33**(7): p. 1301-8.
78. Hans-Jürgen, H., *D-glucose-phosphate and D-fructose-phosphate*, in *Methods of enzymatic analysis*, B. Hans-Ulrich, Editor. 1963, Verlag Chemie GmbH: Germany. p. 134-138.
79. Baez-Saldana, A., *Effects of biotin on pyruvate carboxylase, acetyl-CoA carboxylase, propionyl-CoA carboxylase, and markers for glucose and lipid homeostasis in type 2 diabetic patients and nondiabetic subjects*. Am J Clin Nutr, 2004. **79**: p. 238-43.
80. Clark, M., *Responsiveness to Glucagon by Isolated Rat Hepatocytes Controlled by the Redox State of the Cytosolic Nicotinamide-Adenine Dinucleotide Couple Acting on Adenosine 3': 5'-Cyclic Monophosphate Phosphodiesterase*. Biochem J, 1978. **176**: p. 805-816.
81. Siddle, K., *The Effects of Glucagon and Insulin on Adenosine 3': 5'-Cyclic Monophosphate Concentrations in an Organ Culture of Mature Rat Liver*. Biochem J, 1973. **132**: p. 765-773.
82. Jerums, G., *The cyclic AMP response to glucagon. Comparison of tissue and plasma cyclic AMP levels in the rabbit*. Diabetes, 1977. **26**(2): p. 81-88.
83. Gardner, L.B., E.B. Spannhake, and S. Reisher, *Rat strain differences in cyclic-AMP levels in liver and epididymal fat pad tissue as influenced by glucagon*. J Nutr, 1976. **106**(8): p. 1102-7.
84. Sasaki, Y., et al., *Administration of biotin prevents the development of insulin resistance in the skeletal muscles of Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats*. Food Funct, 2012. **3**(4): p. 414-9.