



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**“EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON BIOTINA SOBRE DIVERSAS VÍAS
DEL METABOLISMO DE LOS LÍPIDOS EN ADIPOCITOS 3T3-L1”**

TESIS

QUE PARA OPTAR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA

M en C. ERICKA GUADALUPE MORENO MÉNDEZ

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

COMITÉ TUTORAL:

DRA. YAZMÍN MACOTELA GUZMÁN
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM CAMPUS JURQUILLA QRO.
DR. ROBERTO ARMANDO TOVAR PALACIO
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

CDMX. ABRIL, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	7
AGRADECIMIENTOS ESPECIALES	8
DEDICATORIA	9
ABREVIATURAS.....	10
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABLAS	13
RESUMEN	14
ABSTRACT.....	16
1. MARCO TEÓRICO	18
1.1 Tejido adiposo.....	18
1.1.2 Actividad endocrina del tejido adiposo.....	18
1.2 Desórdenes asociados al tejido adiposo	20
1.3 Vías metabólicas del metabolismo de los lípidos.....	21
1.3.1 Lipogénesis <i>de novo</i>	21
1.3.2 Incorporación de ácidos grasos libres y síntesis de triglicéridos	23
1.3.3 Lipólisis	25
1.3.4. Oxidación de ácidos grasos.....	26
1.4 Regulación del metabolismo de los lípidos a través de enzimas y metabolitos.....	29
1.4.1 Lipogénesis <i>de novo</i>	29
1.4.2 Oxidación de ácidos grasos.....	29
1.4.3 Lipólisis	30
1.4.4 Incorporación y esterificación de ácidos grasos	30
1.5 Regulación del metabolismo de los lípidos por vías de señalización.	31
1.5.1 Regulación por insulina vía proteína cinasa B (PKB/AKT)	31

1.5.2 Regulación por la proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK).....	32
1.5.3 Regulación por la vía guanilato ciclasa, GMPc y proteína cinasa G (GC/GMPc/PKG)	34
1.6 Regulación del metabolismo de los lípidos por factores de transcripción	35
1.6.1 Proteínas de unión al elemento regulador de esteroides (SREPB's).....	35
1.6.2 Receptores nucleares activados por la proliferación de peroxisomas (PPAR's).....	36
1.7 Desregulación del metabolismo de los lípidos en el síndrome metabólico	36
1.8 Agentes terapéuticos en el tratamiento del síndrome metabólico y sus desórdenes asociados	39
1.8.1 Tiazolidinedionas	40
1.8.2 Metformina.....	41
1.8.3. Vitaminas	42
1.9 Biotina	42
1.9.1 Generalidades	42
1.9.2 Efectos de concentraciones farmacológicas de biotina sobre la expresión de genes.....	46
1.9.3 Mecanismos moleculares propuestos por los que la suplementación con biotina modifica la expresión de genes.....	47
1.9.4 Efectos de la suplementación con biotina sobre el metabolismo de la glucosa y de los lípidos	50
1.10 Modelos de estudio del tejido adiposo.....	53
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	54
3. HIPÓTESIS	54
4. OBJETIVO GENERAL.....	55
5. OBJETIVOS PARTICULARES	55
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	57
6.1 Cultivos celulares.....	57
6.2 Cuantificación de biotina en el medio	57

6.3 Extracción y cuantificación de proteína	58
6.4 Análisis por Western blot.....	58
6.4.1 Electroforesis en condiciones desnaturizantes SDS-PAGE	58
6.4.2. Electrotransferencia en cámara húmeda.....	59
6.4.3 Inmunodetección.....	59
6.5 Análisis de la expresión de mRNA	60
6.6 Radio-ensayos de la tasa de síntesis de ácidos grasos a partir de la incorporación de ¹⁴ C-acetato a lípidos totales	62
6.7 Radio-ensayos de la tasa de oxidación de ácidos grasos a partir de la oxidación de ¹⁴ C-palmitato	63
6.8 Radio-ensayos de la incorporación de ácidos grasos libres a través de la incorporación de ¹⁴ C-palmitato a la fracción lipídica	64
6.9 Cuantificación del contenido de grasa	64
6.9.1 Cuantificación de triglicéridos por un método enzimático	64
6.9.2 Tinción y extracción de Rojo Oleoso O.....	65
6.10 Análisis morfométrico	65
6.11 Inhibición de AMPK y PKG	65
6.12 Cuantificación del contenido de GMPc	66
6.13 Análisis estadístico	66
7. RESULTADOS.....	67
7.1 Efecto dosis-dependiente de biotina en la activación la proteína AMPK.....	67
7.2 Efecto de la suplementación con biotina sobre la lipogénesis de novo y proteínas reguladoras de este proceso: acetil-CoA carboxilasa-1 y ácido graso sintasa	69
7.2.1 Efecto de la suplementación con biotina sobre la acetil-CoA carboxilasa-1	69
7.2.2 Efecto de la suplementación con biotina sobre la ácido graso sintasa.....	69
7.2.3 Efecto de la suplementación con biotina sobre la biosíntesis de lípidos	70
7.3 Efecto de la suplementación con biotina en la oxidación de ácidos grasos y proteínas reguladoras de este proceso: acetil-CoA carboxilasa-2, carnitina	

palmitoiltransferasa-1 y el receptor nuclear activado por la proliferación de peroxisomas alfa (PPAR α).....	72
7.3.1 Efecto de la suplementación con biotina sobre la acetil-CoA carboxilasa-2	72
7.3.2 Efecto de la suplementación con biotina sobre la carnitina palmitoiltransferasa-1	72
7.3.3 Efecto de la suplementación con biotina sobre el receptor activado por la proliferación de peroxisomas (PPAR α)	73
7.3.4 Efecto de la suplementación con biotina sobre la oxidación de ácidos grasos..	73
7.4 Efecto de la suplementación con biotina sobre la incorporación y transporte de ácidos grasos.....	74
7.4.1 Efecto de la suplementación con biotina sobre la incorporación de ácidos grasos libres	74
7.4.2 Efecto de la suplementación con biotina sobre los transportadores de ácidos grasos.....	76
7.5 Efecto de la suplementación con biotina sobre el contenido de triglicéridos y distribución de las gotas de grasa	78
7.5.1 Efecto de la suplementación con biotina sobre la acumulación de triglicéridos.	78
7.5.2 Efecto de la suplementación con biotina sobre el número y tamaño de las gotas de grasa.....	78
7.6 Efecto de la inhibición de AMPK sobre la acumulación de triglicéridos.....	81
7.7 Efecto de la suplementación con biotina sobre la glicerol-3 fosfato aciltransferasa-3	83
7.8 Efecto de la suplementación con biotina sobre la vía de señalización del GMPc	85
7.8.1 Efecto de la suplementación con biotina sobre el contenido de guanosín monofosfato cíclico (GMPc)	85
7.8.2 Efecto de la inhibición de la proteína cinasa G (PKG) sobre el contenido de triglicéridos	85
7.8.3 Efecto de la suplementación con biotina sobre la activación de la óxido nítrico sintasa	86
8. DISCUSIÓN.....	88
9. CONCLUSIONES	98

10.- PERSPECTIVAS	100
11. REFERENCIAS.....	101
12. ANEXOS.....	123

AGRADECIMIENTOS

Al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM, por otorgarme las facilidades para la realización del posgrado, así como a todas las instituciones representantes.

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

El trabajo realizado fue posible gracias al donativo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT Ciencia Básica 219787 y Fondos Federales 074/2013.

M. en C. Ericka Moreno-Méndez es estudiante del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

CVU/Becario: 383325/255765 y Becario: 27664 por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México.

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

Quiero agradecer a la Dra. Cesárea Bermúdez López y al Dr. José Antonio Velázquez Aragón del laboratorio de Biología Molecular, departamento de Genética Humana del Instituto Nacional de Pediatría por su apoyo y asesoría en la utilización de los equipos requeridos para este estudio.

Al Dr. Miguel Tapia Rodríguez de la Unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México por su apoyo en la manipulación del microscopio y la obtención de imágenes.

Así mismo quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio: Juan Rosendo Contreras Ramos, Gustavo Adolfo Rojas Olave, Carlos Gudiño Hernández, Itzani Jiménez Ramos, Sofía Enciso Pinto y José Juan Jesús Vargas Domínguez por su asistencia técnica en la realización de este trabajo.

Agradezco el apoyo técnico del M en C. Alain de Jesús Hernández Vázquez para la realización de esta tesis.

DEDICATORIA

A mi familia.....

ABREVIATURAS

ACSL-1	Long-chain acil-CoA sintasa-1
ACT B	Actina beta
AMP	Adenosin monofosfato
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
AMPK	Proteína cinasa dependiente de AMP
ANOVA	Análisis de varianza
ATCC	Colección de cultivos de América
ATGL	Lipasa de triglicéridos
BMP7	Proteína morfogenética de hueso-7
BSA	Albúmina sérica bovina
CABI	Análogo cloroacetilado de biotina
CD36	Translocasa de ácidos grasos
cDNA	Ácido desoxirribonucleico de cadena complementaria
CO	Monóxido de carbono
CO ₂	Dióxido de carbono
CT	Ciclo umbral
DEX	Dexametasona
dFBS	Suero fetal bovino dializado
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido etilenglicol-bis (aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético
ELISA	Ensayo Inmunoenzimático
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
FABP _{pm}	Proteína membranal de unión al ácido graso
FADH ₂	Flavina dinucleótido reducido
FAS	Ácido graso sintasa
FATP-1	Long-chain fatty acid transporter-1
FATP-4	Long-chain fatty acid transporter-4
FATP'S	Long-chain fatty acid transporters
FBS	Suero fetal de bovino
FDE's	Fosfodiesterasas
GC	Guanilato ciclasa
GCp	Guanilato ciclasa particulada
GMPc	Guanidina monofosfato cíclico
GPAT-3	Glicerol-3-fosfato aciltransferasa-3
GPAT's	Glicerol-3-fosfato aciltransferasas
HCSL	Holocarboxilasa sintetasa

HEPES	Ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etanosulfónico
HRP	Peroxidasa del rábano
HSL	Lipasa sensible a hormonas
IBMX	1-metil-3-Isobutil xantina
IL-2	Interleucina-2
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
MCP-1	Factor reclutador de macrófagos y monocitos-1
M-MVL	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
NaCl	Cloruro de Sodio
NADH + H	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida)
NF-κB	factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
PBS	Amortiguador de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGC-1α	Coactivador 1 de PPARgamma
PKA	Proteína cinasa dependiente de AMP cíclico
PKB/AKT	Proteína cinasa B
PKG	Proteína cinasa dependiente de GMP cíclico
PPARα	Receptor nuclear activado por la proliferación de peroxisomas alfa
PPARγ	Receptor nuclear activado por la proliferación de peroxisomas gamma
RNA ^m	Ácido ribonucleico mensajero
RP-8-CPT-cGMPS	8-(4-Chlorophenylthio)-guanosine 3',5'-cyclic monophosphorothioate, Rp Isomer triethylammonium salt
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida
SE	Error estándar
SERCA-3	Bomba de calcio del retículo endoplásmico con actividad ATPasa
SLC27A1	Long-chain fatty acid transporter-1
SLC27A4	Long-chain fatty acid transporter-1
SMVT	Transportador múltiple de vitaminas dependiente de sodio
SREBP-1C	Proteína de unión al elemento regulador de esteroides
SREBP'S	Proteína de unión al elemento regulador de esteroides-1c
STAT-1	Signal transducer and activator of transcription-1
STAT-5	Signal transducer and activator of transcription-5
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
TRIS-BASE	Tris (hidroximetil) aminometano
TZD	Tiazolidinedionas
UCP-1	Proteína desacoplante-1
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Lipogénesis *de novo* en el adipocito

Figura 2. Incorporación y esterificación de ácidos grasos

Figura 3. Lipólisis

Figura 4. Oxidación de ácidos grasos

Figura 5. Estructura química de la biotina

Figura 6. Reacciones catalizadas por las carboxilasas dependientes de biotina

Figura 7. Ciclo de la biotina y su participación en diversas vías del metabolismo central

Figura 8. Mecanismo de acción de la biotina a través de la vía de señalización GC/GMPc/PKG

Figura 9. Efecto dosis-dependiente de biotina sobre la abundancia de la forma activa de AMPK

Figura 10. Efecto de la suplementación con biotina sobre la síntesis de ácidos grasos y las proteínas reguladoras de la vía: ^{S79}acetil-CoA carboxilasa-1 y ácido graso sintasa

Figura 11. Efecto de la suplementación con biotina sobre proteínas reguladoras y la tasa de oxidación de ácidos grasos

Figura 12. Efecto de la suplementación con biotina sobre la incorporación de ácidos grasos libres y expresión de mRNA's asociados a su transporte

Figura 13. Efecto de la suplementación con biotina sobre la morfología, contenido y distribución de las gotas de grasa

Figura 14. Efecto de la inhibición de AMPK en el contenido de triglicéridos

Figura 15. Efecto de la suplementación con biotina sobre los niveles de expresión de la proteína glicerol-3 fosfato aciltransferasa-3

Figura 16. Efecto de la suplementación con biotina sobre la vía de señalización del GMPc

Figura 17. Modelo propuesto de las vías de señalización del metabolismo de los lípidos en los que la biotina se encuentra participando

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Moléculas sintetizadas por el tejido adiposo

Tabla 2. Lista de primers utilizados para la determinación de la expresión de mRNA's en adipocitos 3T3-L1 por medio de qRT-PCR en tiempo real.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: Diversos estudios han demostrado que concentraciones farmacológicas de la vitamina biotina disminuyen la concentración plasmática de lípidos así como la expresión de genes lipogénicos. Estudios previos en ratones que fueron suplementados con concentraciones farmacológicas de biotina durante 8 semanas demostraron un incremento de la proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK) en su forma activa, así como un incremento de las formas inactivas de la acetil-CoA carboxilasa-1 y -2. Estos animales también mostraron una disminución de la concentración de ácidos grasos libres, sin embargo, no se encontró modificada la lipólisis. Estos datos en conjunto sugieren que la suplementación con biotina podría estar modificando otras vías del metabolismo de los ácidos grasos. En el presente trabajo nosotros investigamos los efectos de la suplementación con biotina sobre la síntesis, oxidación e incorporación de ácidos grasos en adipocitos maduros de la línea celular 3T3-L1.

RESULTADOS: Al igual que en estudios previos en ratones, en esta investigación encontramos que la suplementación con biotina en adipocitos 3T3-L1 incrementó la abundancia proteica de la forma activa de AMPK (172 AMPK), de las formas inactivas de la acetil-CoA carboxilasa-1 y -2, así como de la ácido graso sintasa. No se observaron cambios en la expresión del factor transcripcional PPAR α o de la carnitina palmitoiltransferasa-1. Mediante ensayos de incorporación de carbono 14, nuestros datos revelaron que la suplementación con biotina disminuyó la síntesis de ácidos grasos e incrementó su tasa de oxidación, mientras que la tasa de incorporación de ácidos grasos a la fracción lipídica se vio aumentada. Nuestros datos también revelaron un incremento de la abundancia de transcritos que codifican para proteínas que participan en la incorporación de ácidos grasos libres: *Fatp-1* y *Ascl1*, sin presentarse cambios en los transcritos de *Cd36* o *Fatp4*. Además observamos que la suplementación con biotina

incrementó la abundancia proteica de la glicerol-3 fosfato acil transferasa-3 pero no hubo cambios en el contenido de triglicéridos entre ambos grupos. Interesantemente encontramos que el número de gotas de grasa fue mayor en el tratamiento suplementado sin embargo, las gotas de grasa fueron de menor tamaño.

Adicionalmente, observamos que la suplementación con biotina incrementó significativamente el contenido de triglicéridos posterior a la utilización de un inhibidor de AMPK. Los adipocitos suplementados con biotina incrementaron su contenido de GMPc. En correlación con este dato encontramos un incremento de la forma activa de la óxido nítrico sintasa endotelial. En contraste no observamos cambios en el contenido de triglicéridos cuando utilizamos un inhibidor de la proteína-cinasa dependiente de GMPc.

CONCLUSION: La suplementación con biotina en adipocitos 3T3-L1 incrementó la abundancia proteica de la forma activa de AMPK. En correlación, el tratamiento modificó la expresión de las formas inactivas de la fosfo-^{S79}-acetil-CoA carboxilasa-1 y la ácido graso sintasa; efectos que conllevaron a una disminución en la tasa de síntesis de ácidos grasos. Además, la suplementación con biotina incrementó la oxidación de ácidos grasos a través de un incremento en la fosfo-^{S212}-acetil-CoA carboxilasa-2, sin observarse modificaciones en la expresión de las proteínas carnitina palmitoiltransferasa-1 o el factor transcripcional PPAR α . Además, nuestros datos indicaron que la suplementación con biotina incrementó la incorporación de ácidos grasos libres, así como de transcritos que codifican para proteínas asociadas a su transporte (FATP-1 y ACSL1) y esterificación (glicerol-3 fosfato aciltransferasa-3). No observamos cambios en la expresión de los genes de CD36 y FATP4. Por lo que estos efectos podrían estar modificados en respuesta a la suplementación con biotina de manera independiente a la activación de AMPK.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Several studies have shown that pharmacological concentrations of biotin decrease serum lipid concentrations and the expression of lipogenic genes.

Previous studies on epididymal adipose tissue in mice revealed that eight weeks of dietary biotin supplementation increased the protein abundance of the active form of AMPK and the inactive forms acetyl CoA carboxylase -1 and -2, and decreased serum free fatty acid concentrations but did not affect lipolysis. These data suggest that pharmacological concentrations of the vitamin might affect fatty acid metabolism. In this work, we investigated the effects of pharmacological biotin concentrations on fatty acid synthesis, oxidation, and uptake in 3T3-L1 adipocytes.

RESULTS: Similar to observations in mice, biotin-supplemented 3T3-L1 adipose cells increased the protein abundance of active ^{T172}-AMPK and inactive ACC-1 and -2 forms, and decreased fatty acid synthase. No changes were observed in the expression of the transcriptional factor PPAR α and carnitine-palmitoyltransferase-1. Radiolabeled assays indicated a decrease in fatty acid synthesis; an increase in fatty acid oxidation and fatty acid incorporation rate into the lipid fraction between control cells and biotin-supplemented cells. The data revealed an increase in the mRNA abundance of the fatty acid transport proteins *Fatp1* and *Acs1* but not *Cd36* or *Fatp4* mRNA. Furthermore, the abundance of glycerol phosphate acyl transferase-3 protein was increased. Triglyceride content was not affected. Lipid droplet numbers showed an increase and their areas were smaller in the biotin-supplemented group. We also found that biotin supplementation increased the content of cGMP and the active form of endothelial nitric oxide synthetase. However, the triglyceride content did not change after the addition of a cGMP-dependent protein kinase inhibitor, but AMPK blocking increased the triglyceride content.

CONCLUSION: Biotin supplementation in 3T3-L1 adipocytes increased the active form of AMPK. Accordingly, the treatment modified the protein expression of the inactive form of phospho-^{S79}-acetyl CoA carboxylase-1 and fatty acid synthase; and decreased fatty acid synthesis. Furthermore, biotin-supplementation increased the fatty acid oxidation rate via phospho-^{S212}-ACC-2 without affecting the protein expression of CPT-1 and PPAR α . In addition, our data indicate that biotin supplementation increased fatty acid incorporation into the lipid fraction, fatty acid transport-associated proteins (*Fatp1* and *Acs11*) mRNA levels, and GPAT-3 protein expression without affecting *Cd36* or *Fatp4* mRNA levels. These actions could be mediated independently of AMPK activation.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Tejido adiposo

La grasa es la forma común de almacenar energía en los animales [1]. En los mamíferos, el órgano encargado de este proceso es el tejido adiposo, por lo que se le ha conferido clásicamente la función de reservorio energético. Sin embargo, actualmente se ha demostrado que el tejido adiposo también produce una gran cantidad de moléculas llamadas “adipocinas” que participan regulando el metabolismo y la alimentación en función de los requerimientos energéticos del organismo [2]. Este tejido se encuentra conformado principalmente por adipocitos; los cuales representan hasta dos tercios del tejido. Además de existir otras células como las endoteliales, macrófagos y precursores de adipocitos [3].

El tejido adiposo está localizado en la dermis, tejido subcutáneo, mediastínico, mesentérico, perigonadal, perirrenal y retroperitoneal [4]. Existen dos tipos de tejido adiposo: El tejido adiposo blanco y el marrón. Mientras el tejido adiposo blanco se encuentra mayormente involucrado en el almacenamiento de grasa en forma de triglicéridos, el tejido adiposo marrón participa en procesos de oxidación de grasa ya que su principal función es termogénica [5]. Recientemente se ha descrito un nuevo tipo de adipocito: el beige. Este tipo de adipocito presenta un solapamiento morfológico y fisiológico con los otros dos tipos de adipocitos, sin embargo, su origen continúa en debate [6].

1.1.2 Actividad endocrina del tejido adiposo

Los adipocitos del tejido adiposo blanco producen una gran variedad de péptidos, hormonas y moléculas, algunas de ellas al ser sintetizadas exclusivamente por los

adipocitos se llaman “adipocinas”, las cuales tienen su mecanismo de acción de forma autocrina, paracrina y/o endocrina [7]. La secreción de adipocinas resulta en señales que regulan el funcionamiento y actividad de sus órganos blanco, tales como el cerebro, hígado, páncreas, músculo, sistema vascular, etc. [8]. En la tabla 1 se describen algunas adipocinas.

Tabla 1. Moléculas sintetizadas por el tejido adiposo

Adipocinas	Principales efectos
Adiponectina	Citocina anti-inflamatoria, mejora la sensibilidad a la insulina
Adipsina	Estimula la secreción de insulina en respuesta a glucosa en las células beta.
Apelina	Participa en el control de la presión arterial, estimula la contracción del músculo cardíaco.
BMP7 (Proteína morfogenética ósea-7)	Disminuye el apetito y promueve la producción de energía
IL-6 (Interleucina-6)	Citocina pro-inflamatoria que incrementa la resistencia a la insulina
IL-8 (Interleucina-8)	Citocina pro-inflamatoria asociada a problemas cardiovasculares
Leptina	Señal de saciedad en el cerebro. Regula el apetito.
MCP-1 (Factor reclutador de macrófagos y monocitos)	Participa en procesos inflamatorios reclutando macrófagos en el tejido adiposo.
Omentina	Sensibilización celular a la insulina y propiedades anti-inflamatorias
Resistina	Participa en el desarrollo de la resistencia a la insulina y promueve respuestas inflamatorias.
TNFα (Factor de Necrosis tumoral alfa)	Citocina pro-inflamatoria involucrada en la resistencia a la insulina en la obesidad y la diabetes.

*Modificado de[7,9].

1.2 Desórdenes asociados al tejido adiposo

La obesidad es la patología más frecuente asociada al tejido adiposo blanco. En la mayoría de los casos desencadena el síndrome metabólico. La obesidad ha alcanzado niveles epidémicos en todo el mundo principalmente en los países occidentales, entre ellos nuestro país, en donde se ha informado una prevalencia entre el 21% y 60% (INEGI, 2017).

La obesidad se caracteriza por el crecimiento exacerbado del tejido adiposo blanco a través de un incremento en el número (hiperplasia) y/o tamaño de los adipocitos (hipertrofia) [10]. Esta desregulación en el tejido adiposo por el incremento en la acumulación de grasa se asocia a desórdenes sistémicos como el síndrome metabólico, la diabetes tipo-2, hipertensión y la acumulación ectópica de grasa en diversos tejidos y órganos [11].

El aumento en el número y/o tamaño de adipocitos es causado, entre otros factores, por un exceso en la ingesta calórica de lípidos y carbohidratos que contribuyen al desarrollo de la obesidad [12]. Hasta hace algunos años predominaba la hipótesis de que la hipertrofia precedía a la hiperplasia; sin embargo, investigaciones recientes han demostrado que ambos procesos se llevan a cabo consecutivamente cuando el organismo requiere de una mayor acumulación de triglicéridos [13]. Si bien tanto la hipertrofia como la hiperplasia provocan un incremento en la masa corporal del organismo, la obesidad hipertrófica es la que se encuentra asociada con la desregulación del tejido adiposo y el desarrollo del síndrome metabólico [14]. En la obesidad hipertrófica los adipocitos presentes llegan a su nivel máximo de almacenamiento de grasa lo que afecta la capacidad de estas células para acumular triglicéridos favoreciendo dislipidemias tales como la hipercolesterolemia y el incremento de ácidos grasos libres en circulación [15].

La acumulación de triglicéridos en los adipocitos es un proceso controlado que depende de la actividad de diversas vías metabólicas tales como la tasa de síntesis de ácidos grasos a partir de precursores no lipídicos (lipogénesis *de novo*), la tasa de oxidación de ácidos grasos, la incorporación y esterificación de ácidos grasos libres, así como de la tasa de lipólisis [16]. Alteraciones en estas vías metabólicas se observan en patologías como el síndrome metabólico [3].

1.3 Vías metabólicas del metabolismo de los lípidos

1.3.1 Lipogénesis *de novo*

La lipogénesis *de novo* es el proceso por el que se sintetizan ácidos grasos a partir de carbohidratos. En ella se utiliza la vía glicolítica para la formación de los precursores de ácidos grasos [17]. El piruvato, que es el producto final de la glucólisis, a través de la acción enzimática del complejo piruvato deshidrogenasa se convierte en acetil-CoA y subsecuentemente en citrato dentro de la mitocondria. El citrato sale hacia el citoplasma donde por acción de la citrato liasa, se transforma nuevamente en acetil-CoA y oxaloacetato. En el citoplasma se transforma en un compuesto de 3 átomos de carbono: malonil-CoA, molécula que constituye el bloque básico para el inicio de la síntesis de ácidos grasos. Esta molécula es sintetizada por la enzima acetil-CoA carboxilasa-1. Posteriormente, el complejo de la ácido graso sintasa conjuga la molécula de malonil-CoA con otra molécula de acetil-CoA y formar acetoacetil-CoA. Este acetoacetil se une a otra molécula de malonil-CoA incrementando el número de átomos de carbono del ácido graso. Este paso se repite hasta formar el ácido graso palmitoil-CoA [18]. La acetil-CoA carboxilasa-1 y la ácido graso sintasa regulan la velocidad de la vía, sin embargo, la primera es la enzima limitante dentro de este proceso [19]. Adicionalmente, la síntesis de ácidos grasos también puede provenir de precursores como el acetato [20].

El hígado es el lugar dónde se lleva a cabo la mayor tasa de síntesis de ácidos grasos a partir de precursores no lipídicos, sin embargo, se sabe que también la realizan los adipocitos aunque de manera más limitada [21] **Figura 1.**

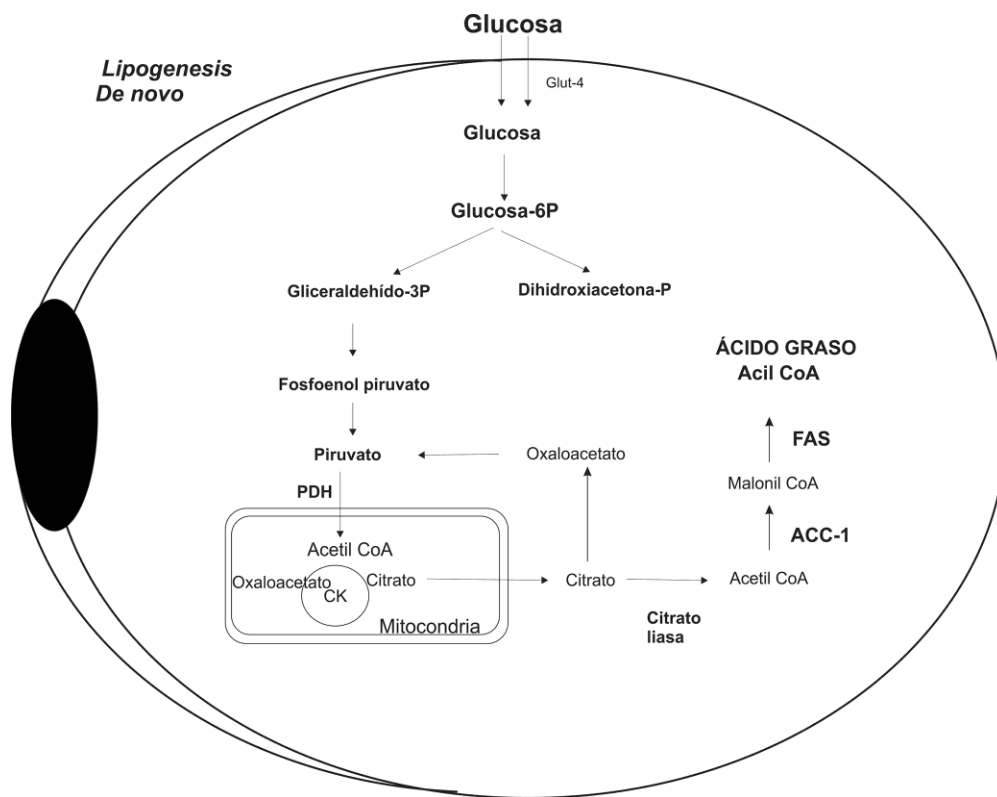


Figura 1. Lipogénesis de novo en el adipocito. La lipogénesis *de novo* se lleva a cabo en el citoplasma a partir de precursores no lipídicos (carbohidratos) por lo que se encuentra acoplada a la vía glicolítica. Glut-4 (Transportador de glucosa tipo 4); PDH (Complejo piruvato deshidrogenasa); acetil-CoA carboxilasa-1 (ACC-1); ácido graso sintasa (FAS); ácido graso de cadena larga (acil-CoA); ciclo de Krebs (CK).

1.3.2 Incorporación de ácidos grasos libres y síntesis de triglicéridos

En los mamíferos, los triglicéridos que se producen en el hígado tienen que ser transportados a través de la circulación hacia el tejido adiposo donde serán almacenados [22]. Los triglicéridos son transportados en vesículas de origen lipídico y proteico llamadas lipoproteínas de baja densidad (VLDL). Cuando las VLDL llegan al tejido adiposo la enzima lipoproteína lipasa cataliza la hidrólisis de los triglicéridos produciendo ácidos grasos libres de cadena larga y glicerol [23]. Los ácidos grasos de cadena larga son transportados a través de la membrana hacia el interior de los adipocitos. A pesar de que existe controversia sobre cómo éstos pueden ingresar y difundirse a través de la membrana celular, han sido reportadas una gran variedad de moléculas que participan activamente en este proceso.

Cuatro familias de proteínas han sido descritas como participantes en la incorporación de ácidos grasos libres: FABPpm (Proteína membranal de unión al ácido graso), FAT/CD36 (Translocasa de ácidos grasos), transporte modulado por Caveolinas (Caveolin-1) y las moléculas asociadas al transporte de ácidos grasos con actividad acil-CoA sintetasa: Proteínas transportadoras de ácidos grasos (FATP's) y la acil-CoA sintetasa (ACSL) [24].

En el tejido adiposo se expresan todos los tipos de proteínas que participan en la incorporación de ácidos grasos. A través de ensayos de pérdida y ganancia de función se ha podido demostrar la influencia de estos transportadores en la acumulación de triglicéridos en los adipocitos. De tal manera que se ha documentado que la regulación negativa del transportador FATP-1 representa una reducción significativa de la incorporación y esterificación de ácidos grasos por lo que la acumulación de triglicéridos en esos adipocitos carentes de esta proteína es muy limitada [25]. Adicionalmente, se ha documentado que ACSL-1 es importante en la incorporación como en la esterificación de ácidos grasos [26].

Una vez que los ácidos grasos han ingresado al interior de la célula pueden tomar dos posibles vías: a) Ingresar a la mitocondria para su oxidación o b) esterificarse para almacenarse en forma de triglicéridos. La esterificación involucra la unión de tres ácidos grasos con una molécula de glicerol, por medio de las enzimas glicerol fosfato aciltransferasas. Existen cuatro isoformas de esta proteína, sin embargo, en adipocitos la de mayor participación es la glicerol-3 fosfato aciltransferasa-3 [27]. De esta manera la esterificación o síntesis de triglicéridos tiene dos fuentes de obtención de ácidos grasos: de la lipogénesis *de novo* y de la incorporación de ácidos grasos [16]. **Figura 2.**

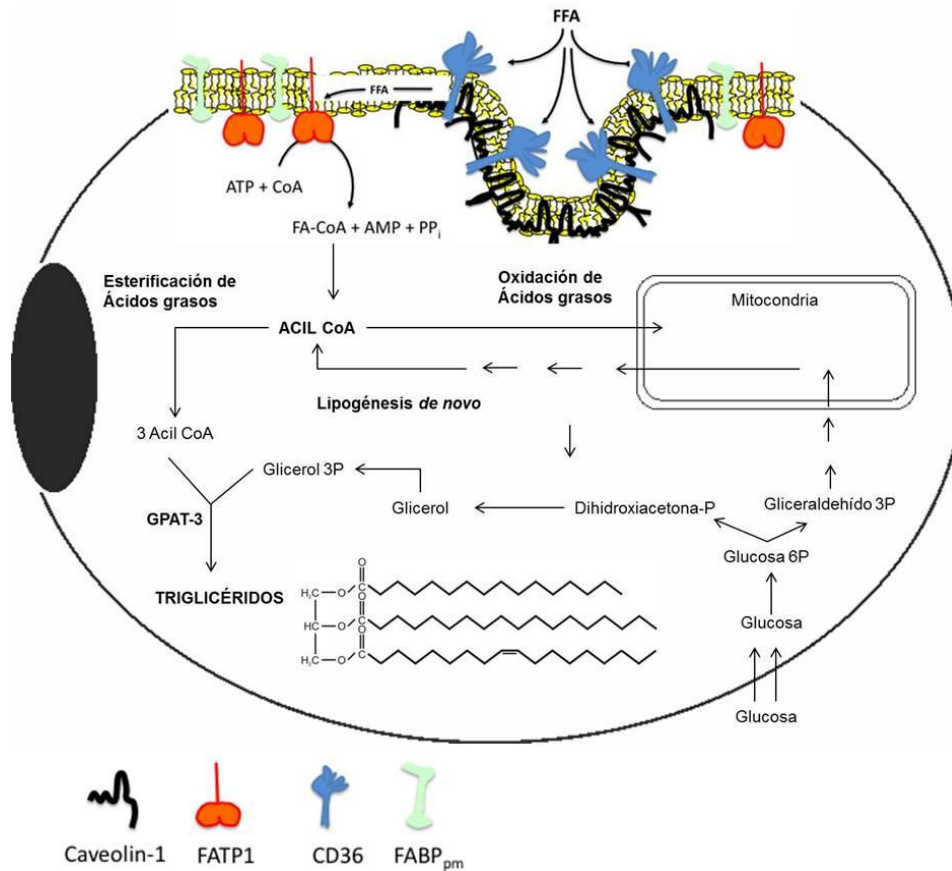


Figura 2. Incorporación y esterificación de ácidos grasos. Los ácidos grasos libres (FFA) provenientes de la circulación ingresan al adipocito a través de diversa proteínas de la membrana celular: Caveolina-1, FATP-1, FATP-4 CD36, ACSL y FABP_{pm}. Al interior de la célula los ácidos grasos se activan con la adición de CoA para formar acil-CoA. Estos ácidos grasos activados pueden tener como destino su oxidación en la mitocondria o su esterificación a través de la glicerol 3 fosfato aciltransferasa-3 (GPAT-3) para almacenarse como lípidos de reserva (triglicéridos). Los acil-CoA para esterificación pueden provenir de la incorporación de ácidos grasos libres o de la lipogénesis *de novo*. Modificado de [23]

1.3.3 Lipólisis

El adipocito es la célula encargada de almacenar grandes cantidades de energía en forma de triglicéridos. Cuando el organismo requiere de energía, estos son hidrolizados en ácidos grasos y glicerol a través de la vía metabólica denominada lipólisis [28]. Existen 2 tipos de lipólisis: la basal y la estimulada por hormonas. Este último proceso es activado en condiciones de ayuno por hormonas como las catecolaminas que estimulan la

producción de AMPc y la activación de las lipasas sensibles a hormonas (HSL) y perilipinas [29]. **Figura 3**

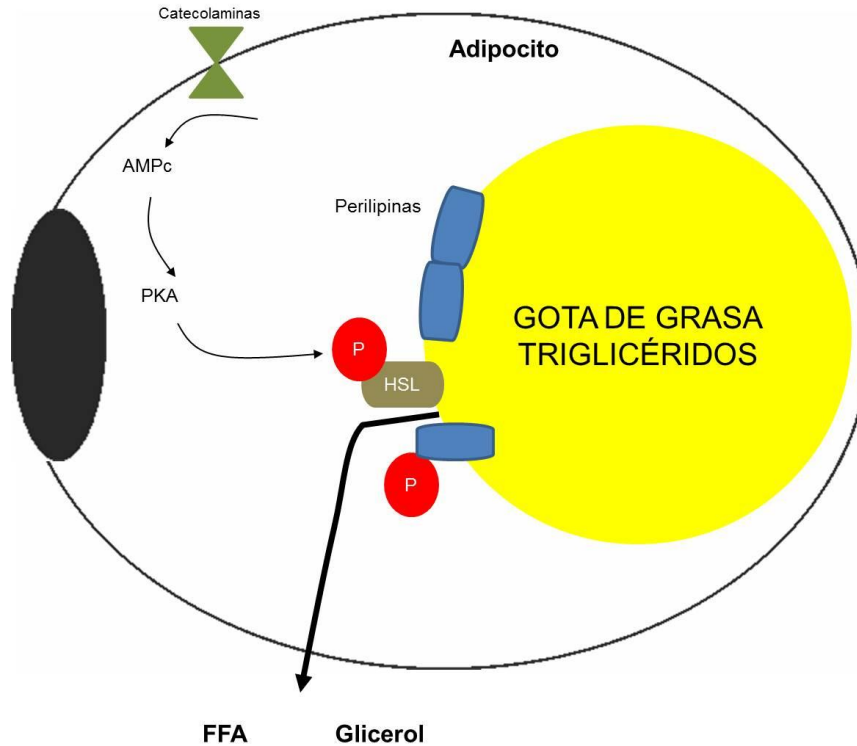


Figura 3. Lipólisis. Vía metabólica en la que en condiciones de demanda energética los triglicéridos son hidrolizados para formar ácidos grasos libres y glicerol, que se liberan a la circulación y son utilizados por otros órganos como el hígado y músculo para su oxidación. Este mecanismo es activado por hormonas como las catecolaminas que promueven la fosforilación de las enzimas lipasas sensibles a hormonas (HSL) y de perilipinas que permiten el acceso de HSL y degradar los triglicéridos. AMPc (adenosinmonofosfato cíclico); PKA (Proteína cinasa dependiente de AMPc). FFA (Ácidos grasos libres)

1.3.4. Oxidación de ácidos grasos

La oxidación de ácidos grasos es una vía metabólica en la que los ácidos grasos en forma de acil-CoA son oxidados hasta formar acetil-CoA en una serie de reacciones que incluyen a las enzimas: acil-CoA sintetasa, 2-3 enoil-CoA hidratasa, 3-hidroxiacil-CoA

deshidrogenasa y la β -cetoacil-CoA tiolasa. Este proceso se llama β -oxidación y se lleva a cabo en la matriz mitocondrial, por lo que el acetil-CoA generado es metabolizado posteriormente en el ciclo de Krebs. Finalmente a partir de las formas reductoras generadas en este ciclo: flavin adenina dinucleotido (FADH_2) y nicotinamida adenina dinucleótido reducido ($\text{NADH} + \text{H}$), se obtiene energía a través de la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa [30].

Adicionalmente existe la β -oxidación que se lleva a cabo en los peroxisomas, este proceso no proporciona energía, sin embargo, es capaz de acortar los ácidos grasos de cadena muy larga para que posteriormente estos puedan ingresar a la mitocondria y generar energía [31].

El transporte de ácidos grasos hacia el interior de la mitocondria es un proceso en el que participan diversas moléculas, tales como la acetil-CoA carboxilasa-2, carnitina palmitoiltransferasa-1 y -2 y la carnitina acilcarnitina translocasa. La acetil-CoA carboxilasa-2 se encuentra en asociación con la carnitina palmitoiltransferasa-1 en la membrana externa de la mitocondria modulando el ingreso de los acil-CoA. Mientras que la carnitina palmitoiltransferasa-2 y la carnitina acilcarnitina translocasa se encuentran en la membrana interna regulando la última etapa de la translocación de los ácidos grasos hacia la matriz mitocondrial. Este mecanismo depende de las condiciones energéticas del organismo.

En el ayuno, el músculo, hígado y tejido adiposo marrón son los principales órganos que oxidan ácidos grasos como fuente de energía, sin embargo, se sabe que los adipocitos blancos también tienen una tasa de oxidación de ácidos grasos [32]. **Figura 4.**

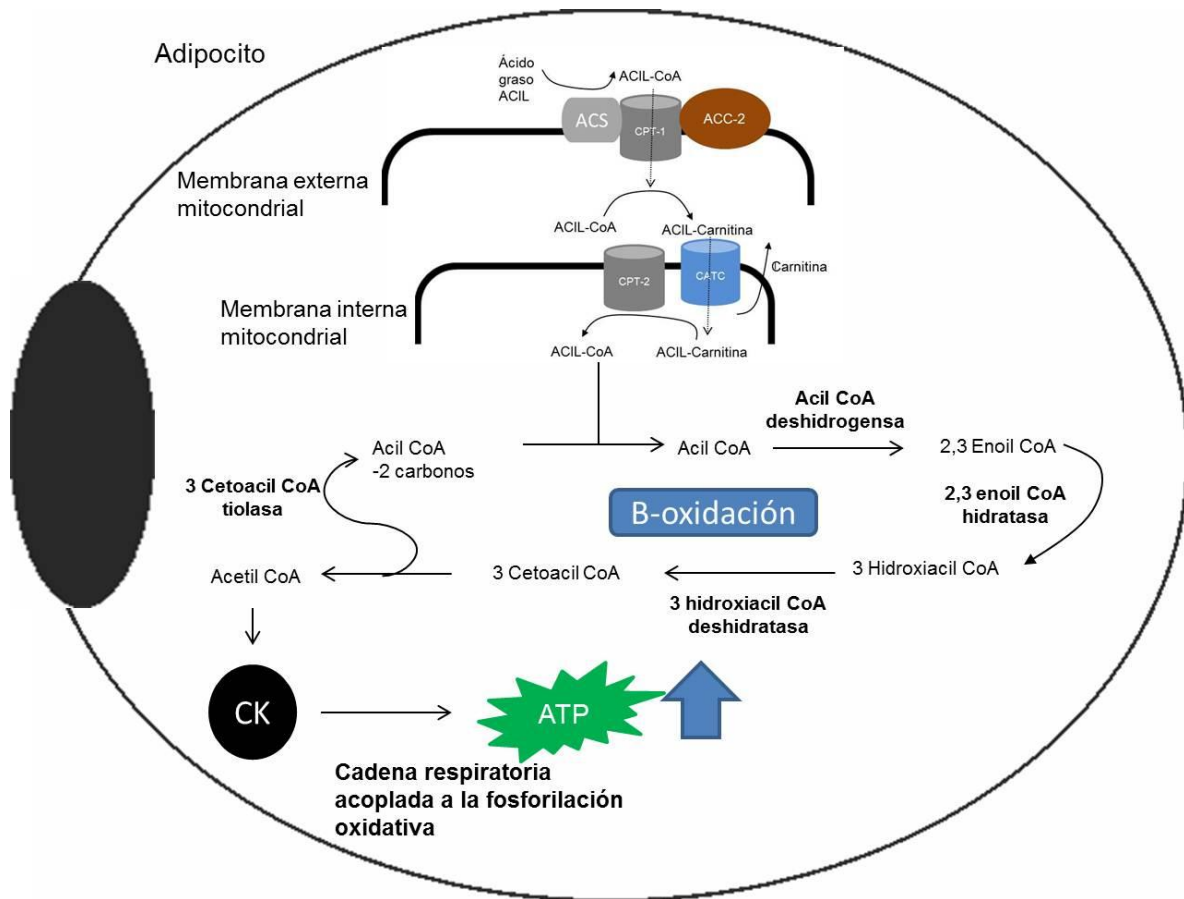


Figura 4. Oxidación de ácidos grasos. Los ácidos grasos en el citoplasma se conjugan con la coenzima A. El acil-CoA es convertido a acil-carnitina por la enzima CPT-1 y así poder ingresar al espacio intermembrana de la mitocondria. La carnitina es liberada y devuelta al espacio intermembrana por acción de la enzima CATC mientras que la CPT-2 cataliza la formación de Acil-CoA que se encuentra ya en la matriz mitocondrial. A partir de este paso comienza la β -oxidación a través de una serie de reacciones enzimáticas hasta la formación de acetil-CoA el cual ingresará a metabolizarse en el ciclo de Krebs para formar poder reductor que alimentará a la cadena respiratoria y acoplamiento con la fosforilación oxidativa se obtendrá energía en forma de ATP. Por cada ciclo de β -oxidación el ácido graso pierde dos átomos de carbono en forma de acetil-CoA. Acil-CoA sintasa (ACS); carnitina palmitoiltransferasa-1 y -2 (CPT-1 y -2); carnitina acil carnitina translocasa (CATC); ciclo de Krebs (CK); adenosin trifosfato (ATP).

1.4 Regulación del metabolismo de los lípidos a través de enzimas y metabolitos

1.4.1 Lipogénesis *de novo*

La lipogénesis *de novo* es regulada principalmente por cambios en la transcripción y/o fosforilación de las enzimas que comienzan la vía de síntesis: acetil-CoA carboxilasa-1 y ácido graso sintasa. Sin embargo, existen metabolitos que actúan como represores o activadores alostéricos de la acetil-CoA carboxilasa-1 como el citrato y el glutamato que promueven su oligomerización y activación. Por otra parte el aumento de acil-CoA, ácidos grasos libres y malonil-CoA inhiben su actividad [33]. Además, la ácido graso sintasa puede ser inhibida en el citoplasma debido a la alta concentración de ácidos grasos [34].

1.4.2 Oxidación de ácidos grasos

La acetil-CoA carboxilasa-2 es una de las enzimas más importantes que modula el proceso de oxidación de ácidos grasos. Esta enzima cataliza la reacción de formación de malonil-CoA a partir de acetil-CoA en la membrana externa mitocondrial. El malonil-CoA actúa como represor de la carnitina palmitoiltransferasa-1 inhibiendo la incorporación de los acil-CoA para su oxidación en la matriz mitocondrial [32]. Esta enzima puede ser regulada alostéricamente de manera positiva por citrato y glutamato y de manera negativa por elevadas concentraciones de ácidos grasos, promoviendo su oxidación.

Adicionalmente otro punto de control de ésta es la regulación por fosforilación [35]. Otro metabolito que regula negativamente esta vía metabólica es el producto final: acetil-CoA. Cuando el acetil-CoA se encuentra en exceso actúa como inhibidor alostérico de la enzima β -cetoacil-CoA tiasa provocando una inhibición de la β -reducción [36].

1.4.3 Lipólisis

Los triglicéridos almacenados en los adipocitos que componen el tejido adiposo blanco se encuentran compartimentalizados en una única gota de grasa. En los adipocitos marrón y beige los depósitos de grasa se almacenan en varias gotas pequeñas. Estas gotas de grasa se encuentran rodeadas por diversas proteínas que regulan la tasa de lipólisis cuando este proceso es requerido [37]. Existen 2 variantes del proceso lipolítico: lipólisis basal y lipólisis inducida. Durante mucho tiempo se consideró a la lipasa sensible a hormonas la enzima clave en la lipólisis en el tejido adiposo. Esta enzima es blanco de fosforilación por la proteína cinasa A (PKA) lo que conduce a su activación durante la lipólisis inducida [28]. Posteriormente se demostró la existencia de otra enzima responsable de la hidrólisis de triglicéridos que es independiente de la actividad de la lipasa sensible a hormonas. Esta enzima es la lipasa de triglicéridos y es responsable de la tasa de lipólisis basal [38].

En condiciones normales, la regulación lipolítica está dada por estados como el ayuno y/o post-prandio lo que conlleva al incremento y/o disminución en la tasa de expresión y actividad de las lipasas. Sin embargo, existen otros metabolitos que pueden modificar esta vía tales, como la hormona del crecimiento, interleucinas, leptina, óxido nítrico, entre otros [39]

1.4.4 Incorporación y esterificación de ácidos grasos

La internalización de los ácidos grasos en los adipocitos ha sido de gran interés ya que los ácidos grasos de cadena larga no pueden atravesar de manera pasiva la membrana celular y requieren de un sistema de transporte [23]. La regulación en la incorporación de ácidos grasos no está del todo clara; sin embargo, se ha determinado que la

concentración sérica de ácidos grasos de cadena larga puede estimular su internalización [24]. Dado que la concentración de ácidos grasos libres se encuentra modulada por condiciones de ayuno y/o post-prandio, el mayor punto de control en la incorporación de ácidos grasos está determinada por la acción de hormonas como la insulina [37].

Por otra parte la síntesis de triglicéridos requiere de ácidos grasos libres y una molécula de glicerol. Estos ácidos grasos se tienen que convertir a sus derivados acil-CoA, mientras que el glicerol se requiere en forma de glicerol-3 fosfato. En los adipocitos el glicerol-3 fosfato se produce en la primera fase de la vía glicolítica y/o por gliceroneogénesis, ya que carecen de la enzima glicerol-3 fosfato cinasa. De esta manera la esterificación de ácidos grasos depende en primera instancia de la disponibilidad de éstos metabolitos [40]. Adicionalmente, la actividad de las glicerol fosfato aciltransferasas es esencial para el inicio de la síntesis de triglicéridos. Estudios en el tejido adiposo han observado que la actividad de estas enzimas también se correlaciona positivamente con la disponibilidad de ácidos grasos no esterificados [41]. Además, la expresión de estas puede ser regulada a nivel transcripcional por la proteína de unión al elemento regulador de esteroides (SREPB-1c) y a nivel pos-traducciona a través de forforilaciones que modifican su actividad [42].

1.5 Regulación del metabolismo de los lípidos por vías de señalización.

1.5.1 Regulación por insulina vía proteína cinasa B (PKB/AKT)

La insulina es una hormona de origen peptídico sintetizada por las células beta de la región endocrina del páncreas. La producción y secreción de insulina está principalmente modulada por las concentraciones sanguíneas de glucosa y que al secretarse esta hormona actúa en sus tejidos blanco, siendo el tejido adiposo uno de los blancos más

importantes [43]. La insulina, al interactuar con su receptor, desencadena una serie de cambios conformacionales que catalizan la fosforilación de proteínas intracelulares desembocando en la activación de la proteína PKB/AKT. Esta proteína juega un papel central en las acciones metabólicas de la insulina [44].

Sobre el metabolismo de los lípidos en adipocitos, la insulina estimula la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos a través de la activación del factor transcripcional SREBP-1c el cual participa regulando la expresión de las enzimas reguladoras de estos procesos: acetil-CoA carboxilasa-1, ácido graso sintasa y las glicerol-3 fosfato aciltransferasas [17]. Además, incrementa la tasa de incorporación y esterificación de ácidos grasos ya que promueve la translocación de los transportadores tipo FATP's. hacia la membrana celular incrementando la captación de ácidos grasos para su almacenamiento en el tejido adiposo en el estado de post-prandio [45,46]. Otras acciones importantes de la insulina son inhibir la lipólisis y disminuir la tasa de oxidación de ácidos grasos [43].

1.5.2 Regulación por la proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK)

La proteína AMPK responde a cambios energéticos de las células. En comparación con las vías de señalización moduladas por hormonas en donde la cascada de señalización se produce a través de sus receptores, la vía de señalización regulada por AMPK responde a variaciones en el contenido de adenosin monofosfato (AMP). AMPK es una cinasa formada por 3 subunidades (α , β y γ) la cual se encuentra activa cuando se fosforila en la región de treonina 172 de la subunidad alfa [47]. En el tejido adiposo la proteína más abundante es la de la subunidad catalítica α 1.

Un déficit energético en la célula produce aumento en la forma activa de la AMPK, la cual a través de reacciones de fosforilación, favorece la activación de vías catabólicas para la

producción de energía, como la oxidación de ácidos grasos; en tanto que inhibe vías anabólicas, de gasto de energía, como la lipogénesis [48]. Entre los mecanismos por los cuales la AMPK disminuye la lipogénesis se encuentran: la inactivación del factor transcripcional SREBP-1c y la inactivación por fosforilación en la región de Serina 79 en la enzima lipogénica acetil-CoA carboxilasa-1 [49].

La AMPK también fosforila a la acetil-CoA carboxilasa-2, en la región de Serina 212 [35]. La regulación negativa de acetil-CoA carboxilasa-1 y -2 por AMPK conlleva a la disminución en la producción global de malonil-CoA, metabolito para iniciar la síntesis de ácidos grasos, que a su vez regula la oxidación de ácidos grasos ya que actúa como represor de la carnitina palmitoiltransferasa-1 limitando la incorporación de ácidos grasos a la mitocondria. Cuando la acetil-CoA carboxilasa-2 está inactiva la carnitina palmitoiltransferasa-1 se desreprime y los ácidos grasos pueden ser transportados para su posterior oxidación [50].

Otra acción de la AMPK sobre la oxidación de ácidos grasos se lleva a cabo a nivel transcripcional a través de PPAR α , el cual es imprescindible en el control de la transcripción de proteínas de la oxidación de ácidos grasos [51]. Dado que esta cinasa actúa como un “switch” metabólico entre la lipogénesis y la oxidación de ácidos grasos ha sido utilizada como molécula blanco en el tratamiento del síndrome metabólico y sus desórdenes asociados [47].

1.5.3 Regulación por la vía guanilato ciclasa, GMPc y proteína cinasa G (GC/GMPc/PKG)

Se sabe que el GMPc participa como regulador en diversas funciones biológicas a través de una cascada de fosforilaciones y su efecto sobre la expresión génica [52]. El GMPc es producido por dos mecanismos: 1) A través de la actividad de la guanilato ciclasa soluble (GCs); enzima que es activada por óxido nítrico, monóxido de carbono [52] y también por vitaminas como la biotina [53]; y 2) Por la actividad de la guanilato ciclasa particulada (GCp), activada por péptidos natriuréticos y las guanidinas [54]. El GMPc realiza sus efectos a través de la modificación en fosfodiesterasas (FDE's), proteínas cinasas dependientes de GMPc (PKG-1 y -2) y por canales de iones [52].

Estudios han demostrado que el óxido nítrico (cuya función es incrementar las concentraciones de GMPc) reducen las concentraciones de colesterol [55]. Además en modelos animales de diabetes tipo-2, el incremento en el óxido nítrico disminuye los triglicéridos y VLDL's en sangre [56]. En contraste, la reducción en la producción éste a través de la inhibición de la óxido nítrico sintasa produce hipercolesterolemia [57].

Adicionalmente, en modelos transgénicos para la forma constitutivamente activa de la guanilato ciclasa en cardiomiocitos de ratón, se observó una modulación en el transporte y en la acumulación de grasa [58].

Otros estudios en hepatocitos han demostrado que el incremento del óxido nítrico afecta negativamente la lipogénesis a través de modificaciones en la actividad de la acetil-CoA carboxilasa-1, en tanto que promueve la oxidación de ácidos grasos [59]. Mientras que ratas tratadas con L-N-omega nitroarginina (inhibidor de la óxido nítrico sintasa) disminuyen significativamente su tasa de oxidación de ácidos grasos [57]. Este efecto también se observó en músculo esquelético en donde el incremento del óxido nítrico vía

nitroprusiato de sodio incrementó la oxidación de ácidos grasos por un mecanismo que requiere la activación de la proteína PKG [60].

1.6 Regulación del metabolismo de los lípidos por factores de transcripción

1.6.1 Proteínas de unión al elemento regulador de esteroides (SREBP's)

La familia de factores transcripcionales SREBP's tienen un papel central en el metabolismo de los lípidos, principalmente en la tasa de síntesis de ácidos grasos. Se conocen 3 isoformas: SREBP-1a, SREBP-1c y SREBP-2. Todos ellos presentan un motivo de unión al DNA (cremallera de leucina) y dos dominios hidrofóbicos que determinan su localización en el retículo endoplásmico. A través de diversas vías de señalización, estos factores son modificados de manera post-traduccional lo que conduce a su translocación al núcleo y su participación en la transcripción de diversos genes [61].

La isoforma SREBP-1c es la que se expresa mayormente en el tejido adiposo y actúa como modulador de señales inducidas por insulina [62]. Entre los transcritos que se encuentran regulados por SREBP-1c están las enzimas reguladoras de la síntesis *de novo* de ácidos grasos: acetil-CoA carboxilasa-1, ácido graso sintasa y estearil-CoA desaturasa-1 [61]. Además, se ha demostrado que SREBP-1c puede regular positivamente a la acetil-CoA carboxilasa-2 y a la forma mitocondrial de la glicerol-3 fosfato aciltransferasa [62]

1.6.2 Receptores nucleares activados por la proliferación de peroxisomas (PPAR's)

Los factores de transcripción tipo PPAR's son proteínas de una familia de receptores nucleares. La unión de los PPAR's con su ligando resulta en la activación de estos como factores transcripcionales que se unen a las secuencias de DNA de los genes bajo su control [63]. Se conocen 3 isoformas PPAR α , PPAR γ y PPAR δ . En el tejido adiposo la isoforma de mayor abundancia es PPAR γ ya que es el gen maestro de la adipogénesis y regula una gran variedad de proteínas del metabolismo de los lípidos tales como SREBP-1c, glicerol-3 fosfato aciltransferasa, acetil-CoA carboxilasa-1 y transportadores de ácidos grasos tipo FATP [64,65].

La isoforma PPAR α es esencial en la regulación de la oxidación de ácidos grasos ya que participa de manera positiva en la expresión de genes que codifican para proteínas involucradas en el transporte de ácidos grasos hacia el interior de la mitocondria: carnitina palmitoiltransferasa y acetil-CoA carboxilasa-2 , así como proteínas de unión a ácidos grasos (FABP's) [66] . Además, se sabe que la regulación negativa de este factor disminuye significativamente la tasa de oxidación de ácidos grasos en músculo e hígado [51]

1.7 Desregulación del metabolismo de los lípidos en el síndrome metabólico

De manera normal, cuando aumenta la ingesta calórica y por ende la producción de lípidos, los adipocitos incrementan su tamaño, además de inducir señales para el reclutamiento de precursores para la formación de adipocitos nuevos [67]. Este incremento en el número y/o tamaño de adipocitos debido a la demanda para acumular

lípidos, es el principal factor que influye en el desarrollo de la obesidad, la cual en la mayoría de los casos conlleva a padecer enfermedades como el síndrome metabólico [15]

El síndrome metabólico incluye a un conjunto de desregulaciones metabólicas simultáneas derivada de la resistencia a la insulina, estas incluyen: dislipidemias, intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina, hipertensión arterial e inflamación, anomalías que están asociadas a la obesidad. Esta asociación de factores incrementa el riesgo de desarrollar enfermedades sistémicas como la diabetes tipo-2 y problemas cardiovasculares [15]. Uno de los protagonistas principales en estas patologías es el tejido adiposo, el cual mediante varios factores que incluyen: a) la liberación de ácidos grasos; b) la producción de hormonas y adipocinas y c) la capacidad afectada de almacenar triglicéridos participando activamente en la homeostasis del organismo, cuya desregulación está asociada al desarrollo de estas patologías.

Ácidos grasos. Los ácidos grasos libres producidos por el tejido adiposo, son uno de los componentes propuestos como agentes principales en el desarrollo del síndrome metabólico [68]. La producción excesiva de ácidos grasos libres es debido a que el adipocito pierde la capacidad para controlar la lipólisis entre los estados de ayuno y posprandio [17] con lo que se favorece el incremento de ácidos grasos libres en circulación.

Adipocinas: En la obesidad existe la desregulación en la producción de hormonas y adipocinas en los adipocitos, los cuales intervienen en los estados de resistencia a la insulina e hiperinsulinemia, [69]. Esta desregulación incluye la disminución de la adipocina adiponectina, la cual tiene como función la sensibilización de los tejidos blanco a las acciones de la insulina [70], así como el incremento de citocinas de tipo pro-inflamatorio

como: TNF α e Interleucina-6 que favorecen estados de resistencia a insulina e inflamación de tejidos, incluido el tejido adiposo [71].

Almacenamiento de lípidos: Los desórdenes en la producción, almacenamiento y transporte de ácidos grasos en el tejido adiposo también son puntos clave para el desarrollo del síndrome metabólico [72]. Según algunos autores, la resistencia a la insulina, es una consecuencia de alteraciones en el procesado y almacenamiento de ácidos grasos y triglicéridos [68]. Es decir, estos desórdenes en el metabolismo de los lípidos llevan a la incapacidad de los adipocitos de almacenar triglicéridos, debido a ello el exceso de lípidos se mantiene en el plasma, ocasionando niveles elevados de ácidos grasos libres y triglicéridos induciendo su almacenamiento ectópico en otros tejidos como el músculo e hígado [73]. Esta acumulación ectópica causa alteraciones metabólicas inducidas por lípidos (lipotoxicidad), lo cual contribuye a la pérdida de las células β -pancreáticas productoras de insulina, fenómeno observado en la diabetes tipo-2 [74]. La acumulación de grasa ectópica así como las altas concentraciones de ácidos grasos libres en plasma también pueden deberse a alteraciones en la tasa lipolítica del tejido adiposo [75].

La hiperinsulinemia incrementa la lipogénesis de *novo* en el hígado, por lo que la producción de triglicéridos se ve favorecida [76]. Por el contrario, en esta condición, la capacidad lipogénica del tejido adiposo se encuentra disminuida debido al decremento en la expresión de la ácido graso sintasa y del factor transcripcional SREBP-1c [77], sin embargo, se favorece la activación de vías metabólicas no oxidativas, como la producción de ceramidas, cuya formación excesiva induce resistencia a la insulina y conduce a la muerte celular programada [78].

La acumulación ectópica de grasa se debe a que el tejido adiposo no tiene la capacidad de expandirse y adaptarse al exceso de ácidos grasos, por lo que una mayor cantidad de ácidos grasos libres trae como consecuencias: 1) Resistencia a la insulina, 2) Aumento en la producción de lípidos en el hígado, 3) Incremento de la tasa lipolítica. Estos efectos favorecen la progresión de desórdenes sistémicos que pueden conllevar al desarrollo de diabetes tipo-2 [67].

La incapacidad del tejido adiposo para almacenar lípidos, también se debe alteraciones en la incorporación de ácidos grasos libres en condiciones de resistencia a la insulina. La insulina promueve la función y/o expresión de proteínas asociadas al transporte de ácidos grasos hacia el interior de la célula, por lo que la falta de acción de la hormona disminuye la abundancia de los transportadores tipo FABP's así como de la translocación hacia la membrana celular de FATP-1 y FATP-4 [25].

Adicionalmente, se ha observado en el síndrome metabólico una disfunción mitocondrial del tejido adiposo la cual está asociada a la disminución en genes implicados en la fosforilación oxidativa regulados a través del coactivador 1 α (PGC-1 α) y de PPAR γ [79]. PPAR γ es un receptor que actualmente es blanco de fármacos como las tiazolidinedionas que mejoran la sensibilidad a la insulina y que son ampliamente utilizadas en el tratamiento contra la diabetes [65].

1.8 Agentes terapéuticos en el tratamiento del síndrome metabólico y sus desórdenes asociados

El tejido adiposo participa en una gran variedad de procesos fisiológicos, cuya desregulación promueve en el desarrollo de enfermedades como la obesidad y la diabetes

tipo-2. Tres de las principales funciones de los adipocitos han sido propuestas para explicar la importancia de la homeostasis del tejido adiposo: la secreción adecuada de adipocinas, la disipación de energía o termogénesis y la capacidad de acumular triglicéridos. Existe evidencia de que este repertorio de acciones y funciones contribuye directamente a la homeostasis energética del organismo [80]. Dadas estas razones, el potencial de usar el tejido adiposo como diana terapéutica en el tratamiento del síndrome metabólico y sus desórdenes asociados está creciendo en los últimos años.

1.8.1 Tiazolidinedionas

Las tiazolidinedionas (TZD) son un tipo de fármacos que fueron introducidos al mercado a finales de los años 1990 como agentes terapéuticos auxiliares en el tratamiento de la diabetes tipo-2 y otras enfermedades relacionadas. Actualmente la tiazolidinediona más utilizada para estos fines es la pioglitazona. Pioglitazona actúa de manera primaria en el tejido adiposo a través de promover la expresión del factor transcripcional PPAR γ , que como se mencionó anteriormente, participa activamente en la regulación de moléculas involucrada en el metabolismo de la glucosa y los lípidos en adipocitos. Entre los efectos benéficos observados en modelos animales y en humanos diabéticos tratados con tiazolidinedionas se encuentran: a) mejoran la sensibilidad a la insulina; b) tener efectos hipolipemiantes, ya que estimula la diferenciación *de novo* de adipocitos lo que conlleva a una mejora en la capacidad de almacenamiento y distribución de grasa; c) aumentar la producción de adiponectina; d) incrementar la abundancia de PPAR γ y de los transcritos regulados por este factor [65,81].

Sin embargo, a pesar de que diversos estudios siguen demostrando que el tratamiento con tiazolidinedionas es adecuado para mejorar problemas metabólicos, los eventos adversos de las TZD en relación a la inducción de daño hepático es un tema fundamental a resolver para el uso terapéutico de este producto [82].

1.8.2 Metformina

La metformina es uno de los principales fármacos utilizados en el tratamiento de la diabetes tipo-2 ya que entre sus efectos están mejorar la sensibilidad a la insulina favoreciendo la metabolización de la glucosa [83]. En el tejido adiposo blanco la metformina estimula la β -oxidación de ácidos grasos y modifica la lipólisis, aunque este último efecto se encuentra en debate [84]. Los efectos metabólicos de la metformina se ejercen a través de la activación de AMPK, pero sus primeras etapas de acción, que ocurren a nivel mitocondrial, no son bien conocidas [48]. Adicionalmente, se ha demostrado que la metformina promueve el incremento de la proteína desacoplante-1 (UCP-1) cuyo papel está relacionado en la oxidación de ácidos grasos en el proceso termogénico. Este efecto estaría dado por el hecho de que la metformina inhibe la respiración a nivel del complejo I de la cadena respiratoria. Adicionalmente, la AMPK se encuentra involucrada en la producción de adiponectina [83]. A diferencia de las tiazolidinedionas, no se han reportado efectos tóxicos de la metformina en el hígado [84].

1.8.3. Vitaminas

En la última década se ha incrementado en número de estudios que han demostrado que las vitaminas producen efectos sobre la expresión de genes que participan en diversas funciones biológicas adicionales a su papel fisiológico [83,84]. A partir de estos estudios ha sido posible el uso de las vitaminas o derivados de estas en el tratamiento de diversas enfermedades, como el uso de las vitaminas A, D y niacina (B₃) [87]. En pacientes con dislipidemias, la niacina ha sido utilizada desde los años 50 como un fármaco hipolipemiante [88].

Desde los años 1960 se ha reportado que la biotina, una vitamina del complejo B, cuando es administrada en concentraciones farmacológicas genera efectos benéficos sobre el metabolismo de la glucosa y los lípidos [89,90]. Estos efectos se han observado tanto en modelos animales considerados sanos [91–93] como en modelos de diabetes tipo-2 [94,95]. Estas evidencias han llevado al desarrollo de complementos dietéticos que contienen biotina recomendados para el tratamiento de la diabetes tipo-2. Estos productos representan de 40-600 veces la ingesta de la vitamina recomendada, la cual es de 30 µg [85].

1.9 Biotina

1.9.1 Generalidades

La biotina es una vitamina hidrosoluble, también conocida como vitamina B7 o vitamina H, del complejo B descrita por Boas en 1927 [96]. Químicamente la biotina es un compuesto heterocíclico con un anillo imidazolidona enlazado a un anillo tetrahidrotiofeno, a este último se une una cadena lateral de ácido valérico. **Figura 5.**

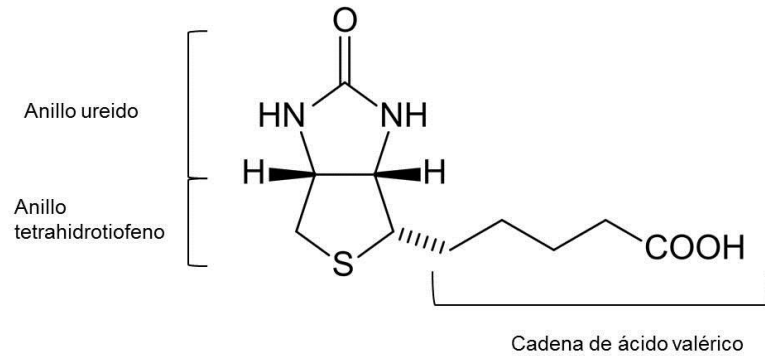


Figura 5. Estructura química de la biotina

La biotina se encuentra ampliamente distribuida en los alimentos y puede encontrarse libre o unida covalentemente a proteínas a través de sus residuos de lisina. La leche, el hígado, la yema de huevo y los vegetales son las principales fuentes de biotina para el ser humano [97]. Sin embargo, su biodisponibilidad depende de la fuente que la contenga, por ejemplo cerca del 100% de su biodisponibilidad ocurre si se obtiene del maíz, pero en el trigo, su disponibilidad disminuye hasta el 5%. Por otra parte, se ha demostrado que cuando se administra de manera oral en concentraciones farmacológicas su biodisponibilidad es del 100% [97].

Cuando la biotina es ingerida, las peptidasas y proteasas del jugo gástrico digieren a las proteínas a las que se encuentra unida. De este proceso se forma la biocitina que es la biotina unida a un residuo de lisina o péptidos pequeños unidos a la vitamina. La biotinidasa es una enzima que rompe el enlace entre la biotina y la lisina dejando a la biotina libre la cual es absorbida por los enterocitos de la porción distal del duodeno. Dada la carga negativa que tiene la biotina a pH fisiológico, requiere de un transportador para atravesar las membranas plasmáticas. Se ha caracterizado como transportador primario en la incorporación de la biotina al SMVT (Transportador múltiple de vitaminas dependiente de sodio) [98]. El SMVT es una proteína transmembranal que funciona como simportador electroneutro, introduciendo a la biotina y al ácido pantoténico junto con el

sodio a favor de un gradiente de concentración. Sin embargo, también se ha demostrado que la biotina puede transportarse a través de MCT-1 (transportador de monocarboxilatos-1) [99]. La incorporación de la biotina al interior de la célula resulta esencial para la homeostasis metabólica y el crecimiento celular ya que los mamíferos no pueden sintetizarla, por lo tanto su asimilación solo proviene de la dieta y de la microbiota [100].

El papel más conocido de la biotina es como cofactor de enzimas carboxilasas: acetil-CoA carboxilasa; piruvato carboxilasa; propionil-CoA carboxilasa y metilcrotonil-CoA carboxilasa (**Figura 6**) [97]. Las carboxilasas se sintetizan como apocarboxilasas en el citoplasma. La participación de la enzima holocarboxilasa sintetasa es esencial para incorporar la biotina a las apocarboxilasas. En su forma de holocarboxilasas, estas enzimas participan en diversas vías del metabolismo de carbohidratos, lípidos y aminoácidos (**Figura 7**) [101]. A excepción de la acetil-CoA carboxilasa todas las demás carboxilasas se encuentran localizadas en la mitocondria.

El mecanismo de transporte de biotina hacia la mitocondria se ha estudiado utilizando mitocondrias aisladas de hepatocitos, y se ha sugerido que es dependiente de pH. Se cree que la biotina entra al espacio intramitocondrial en su forma protonada (neutra), para posteriormente disociarse en su forma aniónica ($pK_a = 4.5$) en el pH alcalino de la mitocondria, con lo cual queda atrapada dentro de ella [97].

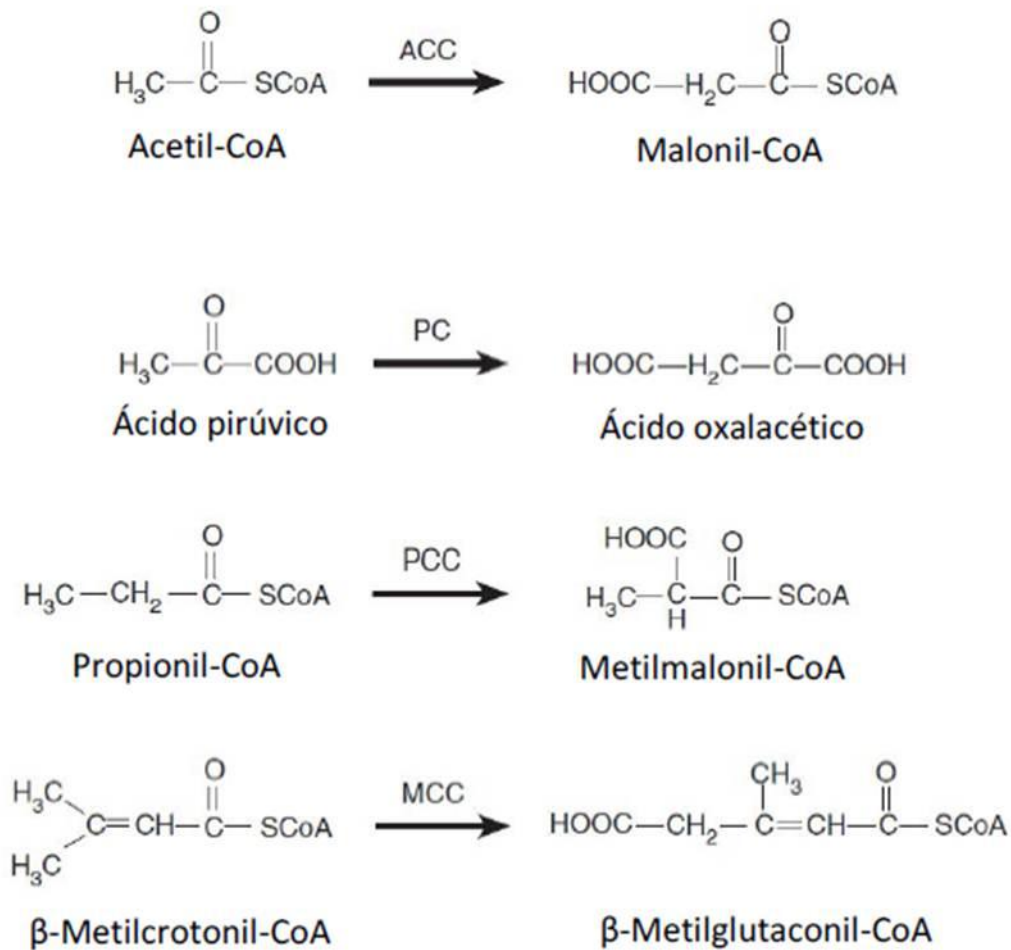


Figura 6. Reacciones catalizadas por las carboxilasas dependientes de biotina. ACC, acetil-CoA carboxilasa; PC, piruvato carboxilasa; PCC, propionil-CoA carboxilasa; MCC, metilcrotonil-CoA carboxilasa. Acetil CoA carboxilasa-1 se encuentra en el citoplasma, mientras que la acetil-CoA carboxilasa-2, PC, PCC y MCC se encuentran localizadas en la mitocondria.

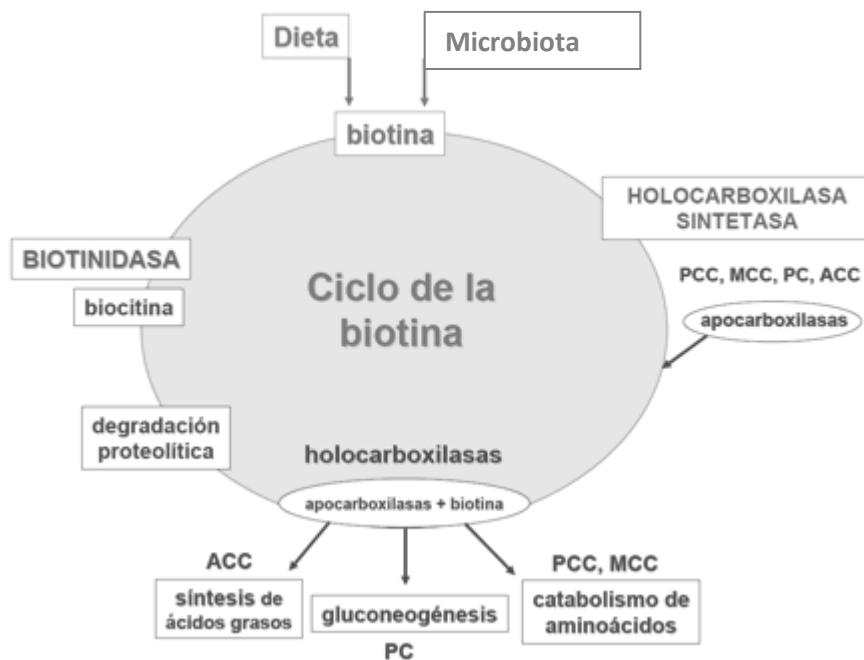


Figura 7. Ciclo de la biotina y su participación en diversas vías del metabolismo central. La vitamina a través de la holocarboxilasa sintetasa se une a las apocarboxilasas dependientes de biotina. Estas enzimas participan en el metabolismo de la glucosa, de los lípidos y aminoácidos. En el recambio de estas enzimas, la biotinidasa rompe el enlace de la biotina con el residuo de lisina de las carboxilasas y la biotina queda en su forma libre. La biotina libre puede volver a ser utilizada por la holocarboxilasa sintetasa o ser metabolizada.

1.9.2 Efectos de concentraciones farmacológicas de biotina sobre la expresión de genes

Estudios pioneros realizados por el grupo de Dakshinamurti y colaboradores [102,103] mostraron que concentraciones farmacológicas de biotina incrementan la actividad de la glucocinasa hepática en ratas, así como en cultivos aislados de hepatocitos [104].

Posteriormente se demostró que este incremento estaba asociado al aumento en la

abundancia su transcrito [105]. En estudios de microarreglos y proteómica se ha demostrado que la biotina modifica la expresión de centenas de proteínas tanto a nivel transcripcional [106] como post-transcripcional [107]. Esto ha indicado un amplio efecto en la expresión génica en respuesta a la suplementación con biotina.

Otros estudios demostraron que diversas moléculas que se observan modificadas por la vitamina se encuentran relacionadas con su papel como cofactor como la holocarboxilasa sintetasa [108], las carboxilasas piruvato carboxilasa y propionil-CoA carboxilasa [109], así como el transportador múltiple de vitaminas SMVT, sin embargo también se encontraron modificadas proteínas que no la requieren como cofactor, tales son los casos de la Interleucina-2 (IL-2), los factores NF- κ B y moléculas involucradas en el metabolismo del ión calcio como la bomba SERCA-3 [110].

1.9.3 Mecanismos moleculares propuestos por los que la suplementación con biotina modifica la expresión de genes

A pesar de las evidencias que demuestran que la suplementación con biotina modifica la expresión de diversas moléculas independientemente de su papel como cofactor, los mecanismos por lo que realiza estos efectos no son del todo conocidos. Se han propuesto dos mecanismos a través de los cuales la vitamina realiza sus acciones. Uno de ellos explora que la regulación genética ocurre a través del proceso de biotinilación de histonas, mientras que el otro propone la participación de la vía de señalización modulada por la guanilato ciclasa soluble, el GMPc y la proteína cinasa G (GC/GMPc/PKG) [111].

1.9.3.1 Biotinilación de histonas

Existe evidencia de que la biotina puede unirse a proteínas histonas a través de sus residuos de lisina, lo que sugiere que podría modificar la expresión génica a este nivel [112]. Entre los efectos que se han atribuido a la biotinilación de histonas se encuentran: la disminución de células polimorfonucleares durante la proliferación celular [113], el incremento de la biotinilación de histonas en células Jukart al ser expuestas a radiación ultravioleta [114], así como el cambio en el patrón de biotinilación en *Drosophila melanogaster* en respuesta a una deficiencia de la vitamina [115].

Sin embargo, diversos trabajos han puesto en duda este mecanismo, ya que algunos de estos estudios se han realizado en sistemas *in vitro* los cuales no se han observado *in vivo*, por lo que se cuestiona si la biotinilación de histonas es un proceso natural o no [116,117]. Sin embargo, Kuroishi y colaboradores en el 2011 publican un estudio en el cual utilizan una serie de diferentes métodos de análisis que provee evidencia de que la biotinilación de histonas es una modificación que se lleva a cabo, sin embargo, no es frecuente [118].

1.9.3.2 Vía de señalización GC/GMPc/PKG

Un estudio realizado con homogenados de diversos tejidos de rata demostró que el tratamiento con biotina produjo un incremento del contenido de GMPc y que éste incremento se encontraba asociado a un aumento en la actividad de la guanilato ciclasa soluble (GC) [119]. Posteriormente se demostró en hepatocitos aislados que el incremento en la actividad de la glucocinasa hepática, previamente reportada como hallazgo inicial de los efectos de la suplementación con biotina, estaba precedido del incremento en el contenido intracelular de GMPc. Estos datos sugirieron la participación

del segundo mensajero GMPc en los efectos mediados por concentraciones farmacológicas de biotina [104] El mecanismo propuesto para esta teoría se representa en la **Figura 8**. Otros estudios encontraron que la biotina mediante la acción de la holocarboxilasa sintetasa participa en la activación de la vía GMPc/Proteína cinasa G [120].

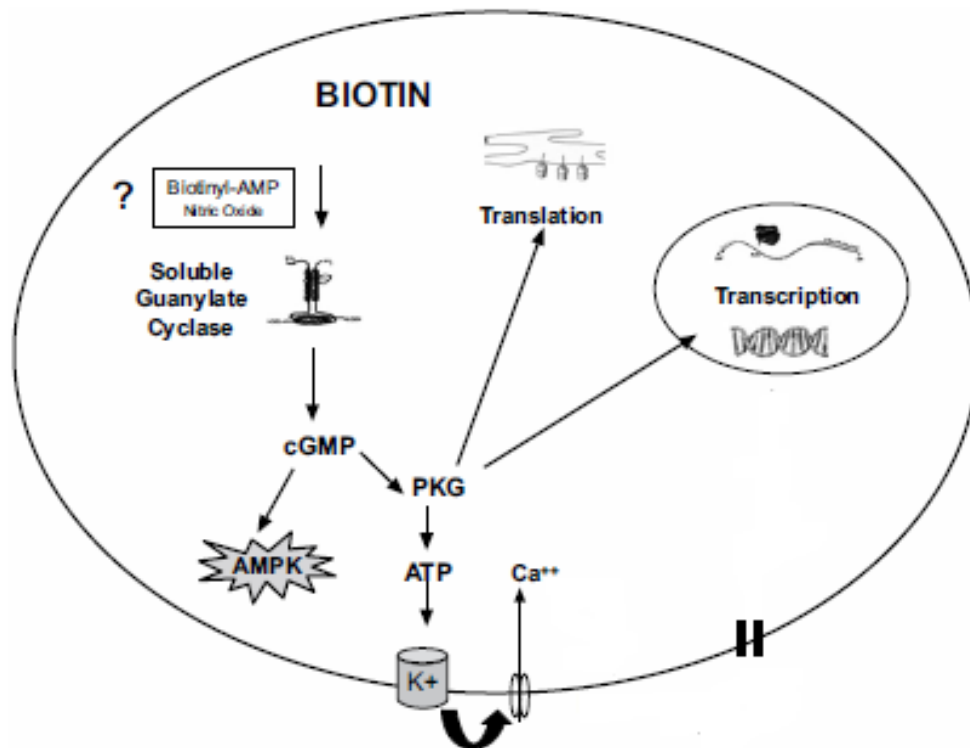


Figura 8. Mecanismo de acción de la biotina a través de la vía de señalización GC/GMPc/PKG. A partir del intermediario biotinil-AMP producto de la actividad de la holocarboxilasa sintetasa, se promueve el incremento en la actividad de la guanilato ciclasa soluble (GC). El incremento en las concentraciones de GMPc activa a la proteína cinasa G (PKG), la cual cascada abajo puede participar en la regulación de la expresión génica a nivel transcripcional y pos-transcripcional. Modificado de [121].

Entre los genes cuya expresión se ha demostrado se encuentra modulada por esta vía de señalización están acetil-CoA carboxilasa-1 y piruvato carboxilasa [109], el transportador múltiple de vitaminas SMVT [122], el receptor de asialoglicoproteínas [53] y el receptor de insulina [123]. Adicionalmente, en trabajos de nuestro laboratorio se demostró que la biotina modifica la expresión de la glucocinasa pancreática a través de este mecanismo [124]. En apoyo a este mecanismo, también se ha reportado en modelos animales considerados sanos así como animales con problemas de hipertensión que la suplementación con biotina reduce la presión arterial a través de un mecanismo en el que participa la acción del GMPc [125]. Además, otro trabajo por parte de nuestro laboratorio encontró que la suplementación con biotina en la dieta durante 8 semanas en ratones incrementa el contenido intracelular de GMPc en el hígado y el tejido adiposo [93,126].

1.9.4 Efectos de la suplementación con biotina sobre el metabolismo de la glucosa y de los lípidos

1.9.4.1 Efectos sobre el metabolismo de la glucosa

Como se señaló anteriormente, las concentraciones farmacológicas de biotina modifican la expresión del RNA mensajero de la glucocinasa hepática [89]. Este efecto también se ha observado en la isoenzima pancreática [127]. Estudios en modelos diabéticos se reportó que dosis farmacológicas de biotina incrementan la actividad de las enzimas fosfofructocinasa y piruvato cinasa en el hígado. Estas enzimas juegan un papel importante en la glucólisis [103]. En tanto que la administración de biotina en ratas diabéticas redujo significativamente la abundancia del RNAm de la fosfoenol piruvato carboxicinas, enzima clave durante la gluconeogénesis y que se encuentra desregulada en la diabetes tipo-2 [128].

En el páncreas se encontró que la suplementación con biotina durante 8 semanas en ratones incrementa la secreción estática de insulina y la expresión de este gen, así como la expresión de genes de factores transcripcionales que son determinantes en el desarrollo y función de los islotes pancreáticos [92]. En concordancia con sus efectos sobre el metabolismo de glucosa y la secreción de insulina, existen estudios que han demostrado que la administración de biotina en dosis farmacológicas disminuye la hiperglucemia tanto en pacientes [129] como en modelos diabéticos[130].

1.9.4.2 Efectos de la suplementación con biotina sobre el metabolismo de los lípidos

En estudios en modelos animales [91,95,131,132] así como en humanos [133,134] la suplementación con biotina tiene efectos benéficos sobre diversos marcadores metabólicos asociados al metabolismo lipídico. Estudios realizados en ratas BHE, las cuales tienen una predisposición genética a presentar elevadas concentraciones de glucosa y lípidos, se observó que la suplementación con biotina disminuye los niveles plasmáticos de lípidos [134]. Otro estudio en el que utilizan una combinación de picolinato de cromo y biotina en ratas diabéticas, también observaron una disminución de los triglicéridos plasmáticos así como un incremento en la abundancia proteica del factor transcripcional PPAR γ en el tejido adiposo [95]. Adicionalmente, nuestro grupo reportó que los niveles séricos de triglicéridos disminuyen aproximadamente 35% en ratones que fueron suplementados con la vitamina durante 8 semanas, al igual que la concentración sérica de ácidos grasos [93]. Este efecto está asociado con una disminución en la abundancia de los transcritos que codifican para enzimas y factores transcripcionales que participan en la síntesis de ácidos grasos[135], pero no a la lipólisis [93]. Entre los transcritos que se encontraron significativamente disminuidos en respuesta a la

suplementación con biotina fueron: SREBP-1c, acetil-CoA carboxilasa-1 y ácido graso sintasa, mientras que el RNAm de Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa incrementó. Por otra parte, existen evidencias de que las acciones de la biotina pueden diferir dependiendo el tejido estudiado. En apoyo a estas observaciones nosotros hemos determinado que el factor transcripcional PPAR γ se ve modificado en el tejido adiposo pero no en el hígado de ratones que fueron suplementados con la vitamina durante 8 semanas [135].

Al igual que en modelos animales referidos en el párrafos anteriores, se ha observado que en humanos tratados con concentraciones farmacológicas de biotina se produce una disminución de la concentración de lípidos séricos totales. La administración de 5 mg de biotina durante 4 semanas en pacientes con aterosclerosis e hipercolesterolemia produjo un decremento en las concentraciones de colesterol total [133]. Mientras que en humanos sanos se encontró que la administración de biotina produjo modificaciones en los niveles de lípidos presentes en plasma [134]. Estudios en nuestro laboratorio encontraron que el tratamiento de 5 mg de biotina 3 veces al día durante 28 días en pacientes diabéticos y no diabéticos con hipertrigliceridemia disminuyó la concentración de triglicéridos séricos [136].

Estudios *in vitro* encontraron que en la línea celular de adipocitos 3T3-L1 un análogo cloro-acetilado de biotina (CABI), inhibe la actividad de la acetil-CoA carboxilasa-1 y reduce la expresión de los factores STAT-1, STAT-5a y PPAR γ , factores transcripcionales que juegan un papel importante en el metabolismo de lípidos [137]. Estas evidencias sugieren que el mecanismo de acción por el cual la biotina afecta al metabolismo de los lípidos está relacionado con una acción sobre la expresión de genes.

Por otro lado, en estudios previos reportamos que la suplementación con biotina durante 8 semanas en modelos animales incrementan la abundancia de la forma activada de AMPK

en el hígado y el tejido adiposo [93,126]. Dado que AMPK es una proteína central en la regulación del metabolismo de los lípidos, estos estudios sugieren la participación de AMPK en los efectos hipolipemiantes de la suplementación con biotina.

1.10 Modelos de estudio del tejido adiposo

El tejido adiposo de roedores estuvo dentro de los primeros modelos de estudio que facilitaron los análisis histológicos y algunos metabólicos [138]. El aislamiento de adipocitos maduros comenzó a facilitar los estudios sobre la biología del adipocito, sin embargo, los métodos de aislamiento y mantenimiento de los adipocitos *in vitro* representaron dificultades [138]. Posteriormente se dio un salto en la exploración de aquellas células precursoras de adipocitos “preadipocitos”. Los primeros reportes datan de 1960 cuando se logró el aislamiento de la línea celular inmortalizada de ratón suizo 3T3-L1 [139]. Los cultivos de adipocitos 3T3-L1 continúan siendo utilizados con gran interés en la investigación biomédica, por ser una herramienta para el estudio del tejido adiposo sobre todo en la búsqueda de posibles blancos terapéuticos para la obesidad, diabetes mellitus y dislipidemias. Consistentemente, diversos estudios han demostrado que la expresión génica en estas células es muy similar a los adipocitos presentes en el tejido adiposo nativo [138,140], lo que sustenta el uso de estas células para el estudio del metabolismo de los adipocitos.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Alteraciones en la homeostasis de los lípidos conllevan a desórdenes metabólicos sistémicos tales como la obesidad, el síndrome metabólico y/o la diabetes tipo-2 [70,141,142]. Estas patologías se encuentran dentro de las principales causas de muerte en México (INEGI, 2017). Por lo que el incremento en la incidencia de estas enfermedades hace apremiante el estudio y el desarrollo de nuevas estrategias para su tratamiento y/o prevención. La vitamina biotina podría ser utilizada con estos fines ya que, como se ha descrito en la Introducción, existen diversos estudios que han demostrado que concentraciones farmacológicas de biotina modifican disminuyen la concentración sérica de triglicéridos, colesterol y ácidos grasos libres mediante cambios en la expresión de proteínas reguladoras del metabolismo de lípidos.

En estudios previos encontramos que dosis farmacológicas de biotina incrementan la abundancia de la forma activa de la AMPK, así como de sus proteínas blanco: acetil-CoA carboxilasa-1 y -2 en hígado y tejido adiposo. Estas enzimas son claves en el metabolismo de los ácidos grasos que regulan la síntesis y la oxidación de ellos, respectivamente. En este trabajo proponemos investigar en la línea celular 3T3-L1 los efectos de concentraciones farmacológicas de biotina sobre otras proteínas reguladoras de estas vías, sobre las tasas de síntesis y oxidación de ácidos grasos, así como de la incorporación de ácidos grasos libres.

3. HIPÓTESIS

La suplementación con biotina modifica el metabolismo de los lípidos en adipocitos 3T3-L1 a través de cambios en la expresión de proteínas reguladoras de la síntesis, oxidación e incorporación de ácidos grasos.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la suplementación con biotina en adipocitos 3T3-L1 sobre diferentes vías del metabolismo de los lípidos así como los mecanismos moleculares involucrados en estos procesos.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar los efectos que produce la suplementación con biotina en el metabolismo de los lípidos en adipocitos analizando:

- 1.- La activación de la proteína cinasa AMPK en respuesta a diversas concentraciones de la vitamina biotina.
- 2.- La abundancia y estado de fosforilación de proteínas reguladoras de la lipogénesis *de novo*: acetil-CoA carboxilasa-1 y ácido graso sintasa
- 3.- La tasa de síntesis de ácidos grasos
- 4.- La abundancia de moléculas reguladoras de la oxidación de ácidos grasos: acetil-CoA carboxilasa-2, carnitina palmitoiltransferasa-1 y PPAR α .
- 5.- La tasa de oxidación de ácidos grasos
- 6.- La tasa de incorporación de ácidos grasos libres así como de moléculas que participan en su esterificación
- 7.- La expresión de transcritos que participan en la incorporación de ácidos grasos libres al interior de las células: *FATP-1*, *FATP-4*, *ACSL1* y *CD36*

8.- El almacenamiento de triglicéridos en los adipocitos, así como la distribución y tamaño de las gotas de grasa que los constituyen.

9.- El efecto de bloqueadores sobre la vía GMPc/PKG/AMPK sobre el contenido de triglicéridos así como cuantificar el contenido intracelular de GMPc.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cultivos celulares

Las células 3T3-L1 (ATCC® CL-173™) se sembraron a una densidad de 2×10^4 células por placa de 35 mm^2 en medio DMEM suplementado con 6.25 mM de glucosa, 0.25 mM de piruvato de sodio, 1% antibióticos (penicillin-streptomycin 10,000 U/mL; 10,000 $\mu\text{g/mL}$) y 10% suero fetal bovino dializado (dFBS). Este medio fue reemplazado cada 48 horas. 2 días posteriores al 100% de confluencia, las células fueron estimuladas a diferenciación utilizando medio DMEM suplementado con 10% suero fetal bovino (FBS), 0.5 mM 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), 1 μM de dexametasona (DEX) y 10 $\mu\text{g/mL}$ de insulina (medio control) o medio adicionado con 0.1 μM , 0.5 μM , 1 μM o 10 μM de d-biotina. El contenido de biotina en el medio del grupo control fue de 14.6 nM, esta cantidad proviene del contenido de biotina en el suero fetal de bovino. Después de 48 horas de inducción el medio fue retirado y reemplazado con medio DMEM el cual contenía 10% SFB e insulina (10 $\mu\text{g/mL}$) y la concentración requerida de biotina para cada tratamiento. Este medio se reemplazó cada 2 días. Las células se mantuvieron durante todo el experimento en una incubadora a 37°C bajo condiciones de humedad adecuadas en una concentración 5% CO_2 . Las células fueron cosechadas al día 8 posterior a la inducción a diferenciación.

6.2 Cuantificación de biotina en el medio

Se realizó mediante un kit de ELISA en sándwich (mdblproducts, MN, USA) utilizando la metodología propuesta por el proveedor. La absorbancia se midió utilizando un espectrofotómetro de microplacas Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader de Instrumentos BioTek. Las muestras se midieron por duplicado.

6.3 Extracción y cuantificación de proteína

Los adipocitos 3T3-L1 al día 8 se lavaron 2 veces con buffer de fosfatos (PBS) pH 7.4 y posteriormente fueron raspadas de la placa utilizando 200 μ L de buffer de lisis (50 mM HEPES, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2 mM ortovanadato de sodio, 25 mM fluoruro de sodio, 5 mM pirofosfato de sodio, 1 mM DTT, 0.1% TritonX-100 y el inhibidor de proteasas minicomplete (Roche, IN, USA). La suspensión celular se sonicó por 1 minuto y posteriormente se centrifugó a 12 000g por 15 minutos a 4°C para remover cualquier rastro de material insoluble. Se realizaron alícuotas del sobrenadante, el cual contenía la proteína total y se almacenaron a -70°C hasta su uso. La concentración de proteína se cuantificó utilizando el reactivo Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Richmond, CA), realizando una curva estándar de albúmina (BSA). Las cuantificaciones se realizaron por duplicado de muestra.

6.4 Análisis por Western blot

6.4.1 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes SDS-PAGE

30 μ g de proteína total por muestra se calentó hasta ebullición en buffer Laemmli 1X (Bio-Rad, Richmond, CA) durante 5 minutos y posteriormente se cargó en un gel preparativo de acrilamida SDS-PAGE al 7%. La electroforesis se corrió a 120 volts durante 2:30 horas aproximadamente o hasta observar la separación de las proteínas de alto peso molecular. Se utilizó el buffer de corrida el cual contenía: Glicina 192 mM, Tris-base 25 mM y SDS 0.1 %.

6.4.2. Electrotransferencia en cámara húmeda

Las proteínas fueron transferidas del gel hacia a una membrana de nitrocelulosa a través de una cámara húmeda que contenía el buffer de transferencia (Tris-base 48 mM, glicina 39 mM y metanol al 20 %) durante 1:30 horas a 100 voltios. Para corroborar la transferencia de las proteínas a la matriz de nitrocelulosa, las membranas fueron teñidas con una solución de rojo de Ponceau (0.3% y ácido acético 3%) de la marca sigma (St. Louis MO, USA). Se retiró el colorante y las membranas se almacenaron o se continuó con la inmunodetección.

6.4.3 Inmunodetección

Las membranas se incubaron durante 2 horas y en agitación constante en solución de bloqueo (5% leche libre de grasa en PBS-tween 0.05% pH 7.4) para evitar interacciones inespecíficas con los anticuerpos utilizados. Posteriormente, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario específico para cada proteína de interés: anti-fosfo^{S79} acetil-CoA carboxilasa-1, anti-fosfo^{S212} acetil-CoA carboxilasa-2 así como los anticuerpos para sus formas totales. Anti-ácido graso sintasa, anti fosfo^{T172} AMPK y su forma total, anti-carnitina palmitoiltransferasa-1 y anti fosfo^{S117} óxido nítrico sintasa endotelial. Todos estos montados en conejo de Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). Anti-PPAR α de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) y anti-glicerol-3 fosfato acil transferasa-3 de Thermo Fisher Scientific Inc. (Pittsburgh, PA, USA), montados en ratón, así como el control de carga endógeno anti-beta actina montado en cabra. EL anticuerpo primario se incubó al título recomendado por el proveedor durante 16 horas a 4°C y en agitación constante en solución de bloqueo.

Las membranas se lavaron 5 veces en agitación constante durante 5 minutos con PBS-tween 0.05% para eliminar el exceso de anticuerpo para después incubarse durante 1 hora con el correspondiente anticuerpo secundario y en solución de bloqueo: Anti-conejo inmunoglobulina G (IgG) conjugado a la peroxidasa del rábano (HRP), anti-ratón IgG HRP y anti-cabra IgG HRP (Santa Cruz, CA, USA). Las membranas fueron lavadas 5 veces durante 5 minutos en agitación constante para eliminar el exceso de anticuerpo no unido específicamente con PBS-tween 0.05%. Se añadió solución de quimioluminiscencia Chemiluminescent HRP substrate (Merck-Millipore, Darmstadt, Alemania) a las membranas y se detectaron las bandas inmuno-reactivas con el equipo Fusion FX (VilberLourmat). La intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría usando el software Image J 1.40 (Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA) en una computadora personal. Para corroborar la homogeneidad en la cantidad de proteína cargada se reutilizaron las membranas para detectar al control de carga endógeno utilizando el mismo procedimiento pero incubando con el anticuerpo contra β -actina. Para este procedimiento así como para la detección de proteínas adicionales, las membranas fueron sometidas al proceso de “stripping” el cual consiste en la desunión de los anticuerpos utilizando una solución de glicina 250 mM, SDS 1%, pH 2. Las membranas se incuban durante 30 minutos en solución de stripping y en agitación constante y se lavan 5 veces durante 5 minutos con PBS-tween 0.05%. Posterior este proceso, las membranas se volvieron a bloquear y a incubar con otro anticuerpo primario específico.

6.5 Análisis de la expresión de mRNA

El RNA total fue aislado por el método de Trizol[®] de acuerdo a las instrucciones del proveedor. El RNA se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm en un instrumento

Take3 de biotek, la pureza del mismo por la relación de las absorbancias 260/280 nm que se verificó su integridad en geles de agarosa al 1.5%. 1µg de RNA total se utilizó para realizar la síntesis de la cadena simple complementaria de DNA (cDNA) mediante la reacción de transcripción reversa con la enzima retro-transcriptasa reversa del virus M-MVL RT (500 U) mezclada con oligo dT o random hexámeros de Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) para aislar el RNA mensajero. El cDNA se mezcló con la solución de Sybrn Green PCR master mix (Foster City, CA. USA) y los primers específicos para cada uno de los mRNA's. Se evaluó la abundancia de genes que participan en el transporte de ácidos grasos: *FATP-1*, *FATP-4*, *ASCL1* y *CD36*. En la tabla 2 se muestran la secuencia de los primers usados. Actina Beta se utilizó como gene de referencia de expresión endógena.

La detección de cada gen se realizó por triplicado por muestra en un instrumento ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems) equipado con placas ópticas de 96 pozos bajo las especificaciones del fabricante. Para la medición de la abundancia en la expresión de los genes se calculó el valor umbral del ciclo (CT, cycle threshold) usando el método de cuantificación relativa doble-delta CT ($2^{-\Delta\Delta CT}$). Todas las muestras se analizaron por triplicado y la media de la expresión de cada gen del tratamiento suplementado fue normalizado respecto a la media de la expresión del tratamiento control como se describió previamente [126].

Tabla 2. Lista de primers utilizados para la determinación de la expresión de mRNA's en adipocitos 3T3-L1 por medio de qRT-PCR en tiempo real.

Gene	Nombre	Sequence 5'-----3'	Tamaño del amplicón (bp)
<i>SLC27A1</i> (FATP-1)	Long-chain fatty acid transporter-1	F: AGTGCGTCATCTACGGGTTG R: ACACAGTCATCCCAGAAGCG	73
CD36	Platelet glycoprotein-4	F: GGCAGGAGTGCTGGATTAGT R: TGAGGCTGTGAGCAGACGTA	95
ACTB	Beta-Actin	F: CCACCATGTACCCAGGCATT R: AGGGTGTAACCGCAGCTCA	253
<i>SLC27A4</i> (FATP-4)	Long-chain fatty acid transporter-4	F:GGGGCCAATAAACTCTGCCT R:TCCCAAGGGCTAAGCGAAAG	96
ACSL1	Acyl CoA Synthetase Long-chain family member-1	F: AGCCTCACTGCCCTTTTCTG R:TGGGTTGGTGGTTCTCTATGC	97

6.6 Radio-ensayos de la tasa de síntesis de ácidos grasos a partir de la incorporación de ¹⁴C-acetato a lípidos totales

Los cultivos de adipocitos a los 8 días de tratamiento se lavaron 3 veces en PBS pH 7.4. Posteriormente, se incubaron durante 3 horas con 1 mL de buffer Krebs-Ringer pH 7.4 el cual contenía 0.01% de albúmina sérica bovina, acetato marcado con carbono 14 en la posición 1 (¹⁴C-acetato) [50.5 µCi/mmol], acetato no marcado (0.3 mM) y 10 µM de L-carnitina. Después del periodo de incubación, las células se lisaron con SDS al 0.05%. Se realizó la extracción de lípidos totales utilizando una modificación del protocolo de Folch [143]. A la suspensión celular se le agregó una mezcla de metanol-cloroformo (2:1 v/v) y se homogenizó vigorosamente durante 1 minuto, se agregó otra parte de cloroformo puro y se mezcló durante un minuto adicional y después se agregó 1 mL de NaCl [1 M] para lograr la separación de las fases. La fase orgánica se clarificó por centrifugación a 4000

rpm durante 10 minutos y a temperatura ambiente. La fase acuosa se descartó y la fase orgánica se concentró por evaporación utilizando nitrógeno gaseoso. El residuo se disolvió en 150 μ L de la mezcla cloroformo-metanol (2:1). A la muestra se le agregaron 5 mL de líquido de centelleo y la radioactividad del lisado celular fue detectado por la emisión de partículas β en el equipo Wallac 1414 (Wallac; CA, USA). Los ensayos se realizaron en 3-4 réplicas de 3 experimentos independientes. Los resultados se reportaron en micromoles de ^{14}C -acetato incorporados/miligramo de proteína/hora.

6.7 Radio-ensayos de la tasa de oxidación de ácidos grasos a partir de la oxidación de ^{14}C -palmitato

Los adipocitos de 8 días de tratamiento se lavaron 3 veces con PBS pH 7.4 y se incubaron durante 3 horas en 1 mL de buffer Krebs-Ringer pH 7.4 el cual contenía una 0.01% albúmina sérica bovina, palmitato marcado con carbono 14 en la posición 1 (^{14}C -palmitato) [22.4 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$], palmitato no marcado (0.4 mM) y 10 μM of L-carnitina. Después del tiempo de incubación 1 mL de este medio se removió y se transfirió a placas de 12 pozos seguido de la adición de 100 μL de ácido sulfúrico concentrado en cada pozo para liberar el $^{14}\text{CO}_2$ producto de la oxidación del ^{14}C -palmitato. El $^{14}\text{CO}_2$ liberado fue atrapado en papel Whatman® el cual había sido humedecido en una mezcla de monoetilenglicol éter: 1-aminoetanol (2:1) durante 3 horas en agitación suave y a temperatura ambiente. El papel filtro fue removido y puesto en un vial de centelleo con 5 mL de líquido de centelleo. La emisión de partículas β fue medida durante 60 segundos en el equipo Wallac 1414. Las muestras se midieron en 3-4 réplicas de 3 experimentos

independientes. La tasa de oxidación de ácidos grasos fue reportada en nanomoles de $^{14}\text{CO}_2$ /miligramos de proteína/hora.

6.8 Radio-ensayos de la incorporación de ácidos grasos libres a través de la incorporación de ^{14}C -palmitato a la fracción lipídica

Adipocitos de 8 días posteriores de inducción a diferenciación de ambos tratamientos se incubaron con ^{14}C -palmitato como se describió en la sección 6.7. Las células se lisaron y se realizó la extracción de la fracción lipídica utilizando el protocolo de Folch [143] con algunas modificaciones. Las muestras se midieron en 3-4 réplicas de 3 experimentos independientes. La tasa de incorporación de ácidos grasos libres fue reportada en micromoles de ^{14}C -palmitato/miligramo de proteína/hora.

6.9 Cuantificación del contenido de grasa

6.9.1 Cuantificación de triglicéridos por un método enzimático

Adipocitos 3T3-L1 a los 8 días de tratamiento se lavaron 3 veces con PBS pH 7.4. Después, fueron cosechadas utilizando 400 μL una solución 5% NonidetP-40. La suspensión celular se sonicó durante 1 minutos y las muestras fueron calentadas lentamente en baño maría a 70°C hasta que el detergente NP-40 se pusiera opaco. Las muestras se centrifugaron a 2000 g por 2 minutos. La concentración de triglicéridos se determinó por espectrofotometría utilizando un kit comercial de acuerdo a las instrucciones del proveedor (Spinreact: Sant Esteve de Bas, España). Los resultados se reportaron en microgramos de triglicérido/miligramo de proteína.

6.9.2 Tinción y extracción de Rojo Oleoso O

Las células tratadas bajo condiciones fisiológicas y suplementadas con biotina se utilizaron al día 8 posterior a la inducción a diferenciación. Los cultivos se lavaron 3 veces con PBS pH 7.4 y se fijaron con una solución 10% formalina toda la noche a 4°C. Posteriormente se lavaron hasta eliminar la formalina, se secaron en una estufa a 37°C y se sumergieron en una solución saturada de Rojo Oleoso O durante 2 horas. Para remover el exceso de colorante las placas se lavaron exhaustivamente con agua destilada y después se secaron. El colorante se extrajo con 2-propanol puro y se determinó su absorbancia a 520 nm como previamente fue reportado [144].

6.10 Análisis morfométrico

Los cultivos control y suplementados con biotina se observaron en un microscopio invertido de la marca Olympus 1X70 (Tokio, Japón) a 20X acoplado a una cámara fotográfica de Media Cybernetics Evolution VF (Georgia, MD. USA). Las fotografías fueron tomadas con idéntica configuración y almacenadas en una computadora personal. Las imágenes se analizaron con el software Image J 1.40 (Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA). 5 secciones de 5000 μm^2 de 6 fotografías por tratamiento fueron analizadas para medir el número, el área y la distribución de tamaños de las gotas de grasa. El área se reportó en μm^2 y la distribución de la frecuencia de tamaños en porcentaje respecto al número total de gotas de grasa.

6.11 Inhibición de AMPK y PKG

Después de 8 días de cultivo posteriores a la inducción a diferenciación, los adipocitos control y suplementados con biotina fueron tratados con el Compuesto C [50 μM] o con el

inhibidor de la PKG (Rp-8-CPT-cGMPS) [10 μ M] y/o con sus respectivos vehículos durante 24 horas. Posteriormente se cuantificó el contenido de triglicéridos utilizando el método enzimático descrito en la sección **6.9.1**.

6.12 Cuantificación del contenido de GMPc

La cuantificación de GMPc se realizó utilizando el kit cGMP assay (R&D Systems) de acuerdo a las especificaciones y recomendaciones del fabricante. Este ensayo se basa en la competencia que se establece entre el GMPc presente en la muestra para unirse a su anticuerpo específico. Esta interacción desarrolla un color el cual que se cuantifica a 450 nm. La intensidad del color es inversamente proporcional a la concentración de GMPc en la muestra. Las células de ambos tratamientos se lisaron con el buffer de extracción contenido en el kit, posteriormente se realizaron 2 ciclos de congelación-descongelación y se centrifugaron para remover el material insoluble. El sobrenadante se almacenó a -70°C hasta realizar la determinación. Los resultados se reportaron en picomoles de GMPc/miligramo de proteína.

6.13 Análisis estadístico

Todos los resultados se expresan como la media \pm el error estándar (ES). (n) representa el número de ensayos realizados. Los análisis estadísticos realizados fueron t-student cuando 2 grupos de valores fueron comparados. Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) y las comparaciones de Tukey para las múltiples comparaciones. Para el análisis de datos se utilizó software GraphPad Prism 6.0 (Berkeley, CA, USA). Valores de P menores a 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos.

7. RESULTADOS

7.1 Efecto dosis-dependiente de biotina en la activación la proteína AMPK

Estudios previos de nuestro laboratorio en animales han encontrado que la suplementación con biotina produce efectos hipotrigliceridémicos [90,91,94,133,145], y que este efecto está asociado con la activación de la proteína cinasa dependiente de AMP en el hígado y en el tejido adiposo [93,126]. En este trabajo primeramente analizamos si los efectos observados *in vivo* también se presentaban en la línea celular 3T3-L1, con el fin de utilizar este modelo experimental que ha sido ampliamente usado para el estudio del metabolismo de los lípidos en los adipocitos.

Nosotros evaluamos la abundancia de la forma activa de AMPK en adipocitos maduros tratados durante 8 días bajo distintas concentraciones de la vitamina. Las **Figuras 9a y 9b** muestran que la activación de AMPK en presencia de diversas concentraciones de biotina presentó un efecto dosis-dependiente (control: 0.61 ± 0.04 ; 0.1 μM biotina: 0.66 ± 0.02 ; 0.5 μM biotina: 1.00 ± 0.02 ; 1 μM biotina: 1.45 ± 0.18 ; 10 μM biotina: 2.10 ± 0.11). Este efecto no se encontró relacionado con un cambio en la abundancia de la proteína en su forma total.

Para los experimentos posteriores se utilizó la concentración de 1 μM como tratamiento del grupo suplementado con biotina.

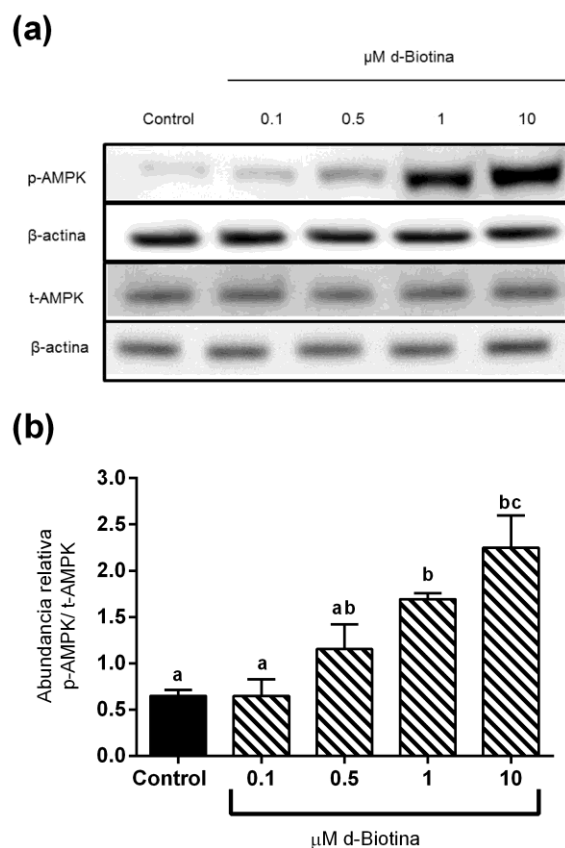


Figura 9. Efecto dosis-dependiente de biotina sobre la abundancia de la forma activa de AMPK. Adipocitos 3T3-L1 cultivados en medio control o bajo diferentes concentraciones de biotina durante 8 días. **(a)** Western blot representativo de la abundancia de la proteína AMPK en sus formas total, 1172 AMPK y el control de carga endógeno β -actina. **(b)** Cuantificación densitométrica de 1172 AMPK normalizada con respecto a AMPK en su forma total. Los datos representan la media \pm SE de 3 experimentos independientes. Letras diferentes indican significancia estadística ($P < 0.05$).

7.2 Efecto de la suplementación con biotina sobre la lipogénesis de novo y proteínas reguladoras de este proceso: acetil-CoA carboxilasa-1 y ácido graso sintasa

7.2.1 Efecto de la suplementación con biotina sobre la acetil-CoA carboxilasa-1

Estudios previos en el hígado y el tejido adiposo de ratones alimentados con una dieta suplementada con biotina demostraron un incremento de la forma inactiva de la acetil-CoA carboxilasa-1 [93,126], enzima limitante dentro del proceso de la síntesis *de novo* de lípidos [19] y que es regulada por fosforilación a través de AMPK [49,146,147].

Dado que en nuestro modelo encontramos que la suplementación con biotina incrementó la abundancia de la proteína AMPK en su forma activa (T172 AMPK), evaluamos el estado de fosforilación de la acetil-CoA carboxilasa-1. En correlación con estudios previos [93,126] y con nuestros resultados, encontramos que en los adipocitos cultivados bajo una concentración 1 μ M de la vitamina se incrementó en un 100% la abundancia de la acetil-CoA carboxilasa-1 fosforilada en la región de Ser79. Esta región de fosforilación es modulada por AMPK [148]. **Figuras 10a y 10b.** (Control: 1.92 ± 0.24 ; suplementado: 3.84 ± 0.54). Este cambio fue independiente de modificaciones en la abundancia de la proteína total de esta carboxilasa.

7.2.2 Efecto de la suplementación con biotina sobre la ácido graso sintasa

Se ha reportado que la ácido graso sintasa es regulada negativamente a nivel transcripcional por la activación de AMPK [34]. Nosotros evaluamos la abundancia proteica de esta enzima en respuesta a la suplementación con biotina. Los resultados

presentados en las **Figuras 10c y 10d** muestran que los cultivos de adipocitos tratados con 1 μM de biotina presentaron una disminución significativa de la abundancia de esta enzima con respecto a los adipocitos cultivados en condiciones fisiológicas de la vitamina. (Control: 0.91 ± 0.01 ; suplementado: 0.50 ± 0.07) $P < 0.005$.

7.2.3 Efecto de la suplementación con biotina sobre la biosíntesis de lípidos

Para determinar si la modificación en las proteínas reguladoras de la lipogénesis afecta directamente la síntesis de ácidos grasos, nosotros evaluamos la capacidad de los adipocitos 3T3-L1 maduros para sintetizar lípidos a partir de precursores provenientes de acetato. La **Figura 10e** representa los datos obtenidos de la incorporación de ^{14}C -acetato a la fracción lipídica (control: 20.92 ± 1.79 ; suplementado: 15.79 ± 0.70 nmol acetato·mg de proteína·hora) $P < 0.05$. Estos resultados muestran que la disminución observada en la expresión de las proteínas lipogénicas, se refleja en la incorporación de ^{14}C -acetato a la fracción lipídica.

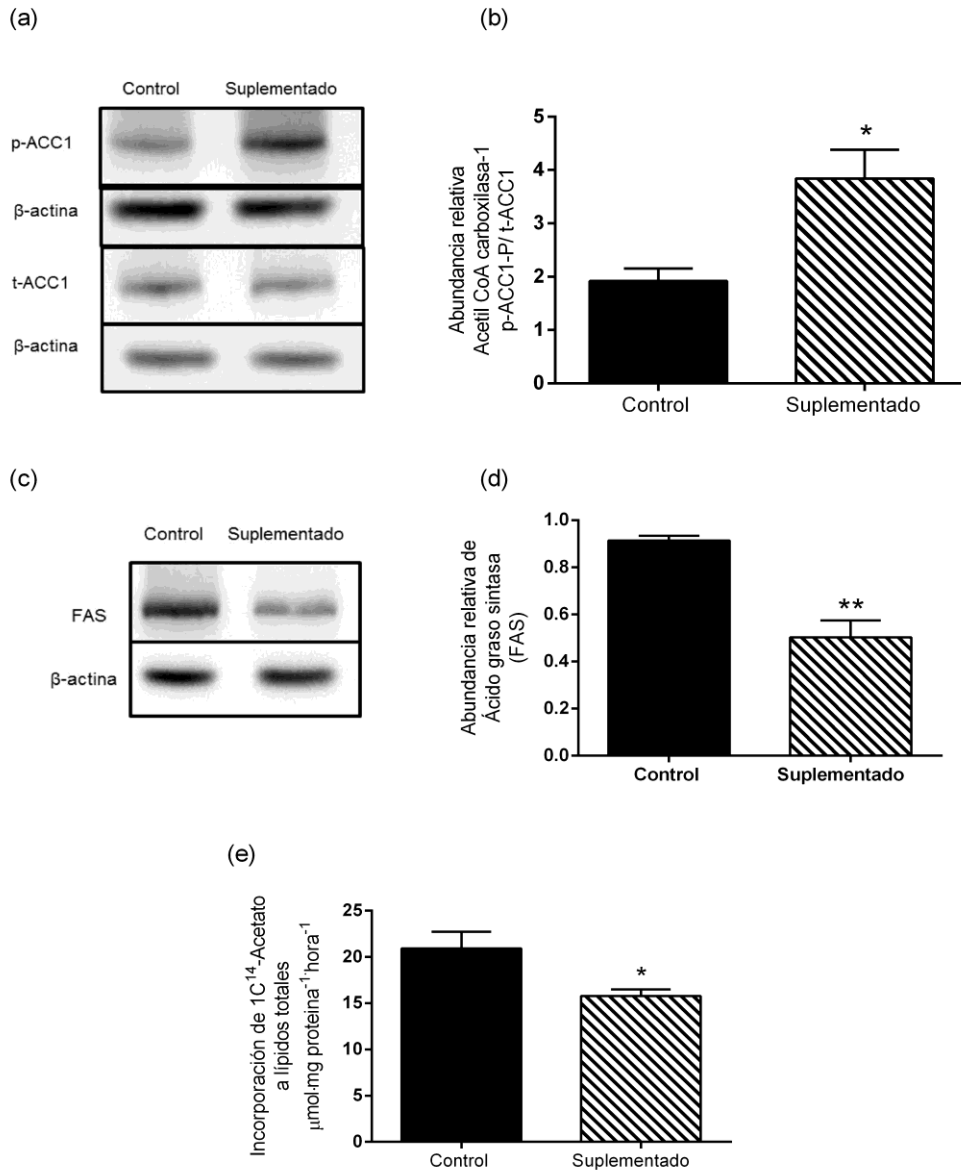


Figura 10. Efecto de la suplementación con biotina sobre la síntesis de ácidos grasos y las proteínas reguladoras de la vía: ^{79}S acetil-CoA carboxilasa-1 (ACC-1) y ácido graso sintasa (FAS). Adipocitos de 8 días tratados con medio control o con $1\ \mu\text{M}$ de biotina durante 8 días. **(a)**: Western blot representativo de la abundancia de ^{79}S ACC-1 y ACC-1 total. **(b)** Cuantificación densitométrica de la abundancia de ^{79}S ACC-1 normalizada respecto a ACC-1 total. **(c)** y **(d)**. Western blot y cuantificación relativa de la abundancia de la proteína FAS normalizada respecto al control de carga β -actina. Las barras representan la media \pm SE de 3 experimentos independientes. **(e)**. Incorporación de $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ -acetato a la fracción lipídica. El gráfico representa la media \pm SE de los valores de 3 experimentos independientes en réplicas de 3-4. (* $P < 0.05$) (** $P \leq 0.005$).

7.3 Efecto de la suplementación con biotina en la oxidación de ácidos grasos y proteínas reguladoras de este proceso: acetil-CoA carboxilasa-2, carnitina palmitoiltransferasa-1 y el receptor nuclear activado por la proliferación de peroxisomas alfa (PPAR α)

7.3.1 Efecto de la suplementación con biotina sobre la acetil-CoA carboxilasa-2

La AMPK regula a la enzima acetil-CoA carboxilasa-2 a través de fosforilación en la posición de Serina 212 [149]. Este mecanismo promueve la oxidación de ácidos grasos e inhibe la síntesis de éstos [50,150]. Por lo tanto, nosotros evaluamos el estado de fosforilación y la abundancia de la proteína total de la acetil-CoA carboxilasa-2 en adipocitos tratados con 1 μ M de biotina en comparación con los cultivos control. Las **Figuras 11a y 11b** muestran que la suplementación con biotina incrementó 1.5 veces la abundancia de la forma fosforilada de esta enzima (control: 0.66 ± 0.11 ; suplementado: 1.61 ± 0.04 ; $P \leq 0.005$), sin presentarse cambios en la abundancia de la proteína en su forma total.

7.3.2 Efecto de la suplementación con biotina sobre la carnitina palmitoiltransferasa-1

Esta enzima es importante dentro en la regulación de la oxidación de los ácidos grasos ya que participa en su incorporación hacia el interior de la mitocondria para su oxidación [32]. Nosotros investigamos la abundancia proteica de esta enzima, encontrando que su expresión se mantiene sin cambios con respecto a las células control (control: 1.04 ± 0.03 ; suplementado: 1.01 ± 0.08). **Figuras 11c y 11d.**

7.3.3 Efecto de la suplementación con biotina sobre el receptor activado por la proliferación de peroxisomas (PPAR α)

Otra proteína importante en la oxidación de ácidos grasos es el factor transcripcional PPAR α cuya activación incrementa la transcripción de proteínas reguladoras de la oxidación de ácidos grasos en el hígado y en adipocitos [51,151]. Las **figuras 11e y 11f** muestran los resultados que indican que la suplementación con biotina no modificó la abundancia de este factor transcripcional con respecto al tratamiento bajo condiciones fisiológicas de la vitamina. (Control: 0.56 ± 0.03 ; suplementado: 0.53 ± 0.01).

7.3.4 Efecto de la suplementación con biotina sobre la oxidación de ácidos grasos

Dado que nuestros resultados mostraron un incremento significativo de la forma fosforilada de la acetil-CoA carboxilasa-2, enzima que regula positivamente la vía de la β -oxidación, evaluamos la tasa de oxidación de ácidos grasos a través de radio-ensayos utilizando ^{14}C -palmitato y midiendo su tasa de producción de $^{14}\text{CO}_2$. Nuestros resultados (**Figura 11g**) muestran que los adipocitos suplementados con biotina incrementan su tasa de oxidación de ácidos grasos aproximadamente 73% en comparación con los cultivos control (control: 18.1 ± 1.18 ; suplementado: $31.3 \pm 2.06 \text{ nmol}\cdot\text{mg proteina}^{-1}\cdot\text{hr}^{-1}$).

**** $P \leq 0.0001$.

7.4 Efecto de la suplementación con biotina sobre la incorporación y transporte de ácidos grasos.

7.4.1 Efecto de la suplementación con biotina sobre la incorporación de ácidos grasos libres

Estudios previos en nuestro laboratorio han encontrado que los niveles séricos de ácidos grasos libres de roedores que recibieron una dieta suplementada con biotina durante 8 semanas se encuentran significativamente disminuidos y que este efecto no se encuentra relacionado con modificaciones en la lipólisis [93]. En este trabajo evaluamos la posibilidad de que la disminución de ácidos grasos libres se encuentre ligada a una modificación en la capacidad de las células para incorporarlos del medio. Para este fin analizamos la incorporación de ^{14}C -palmitato hacia el interior de la célula detectando la marca radioactiva en la fracción lipídica. La **Figura 12a** muestra los resultados que indican que la suplementación con biotina en adipocitos incrementa un 37% la incorporación de ácidos grasos libres en comparación con los cultivos control (control: 3.16 ± 0.27 ; suplementado: $4.35 \pm 0.48 \mu\text{mol}\cdot\text{mg protein}^{-1}\cdot\text{hr}^{-1}$). $P < 0.0001$.

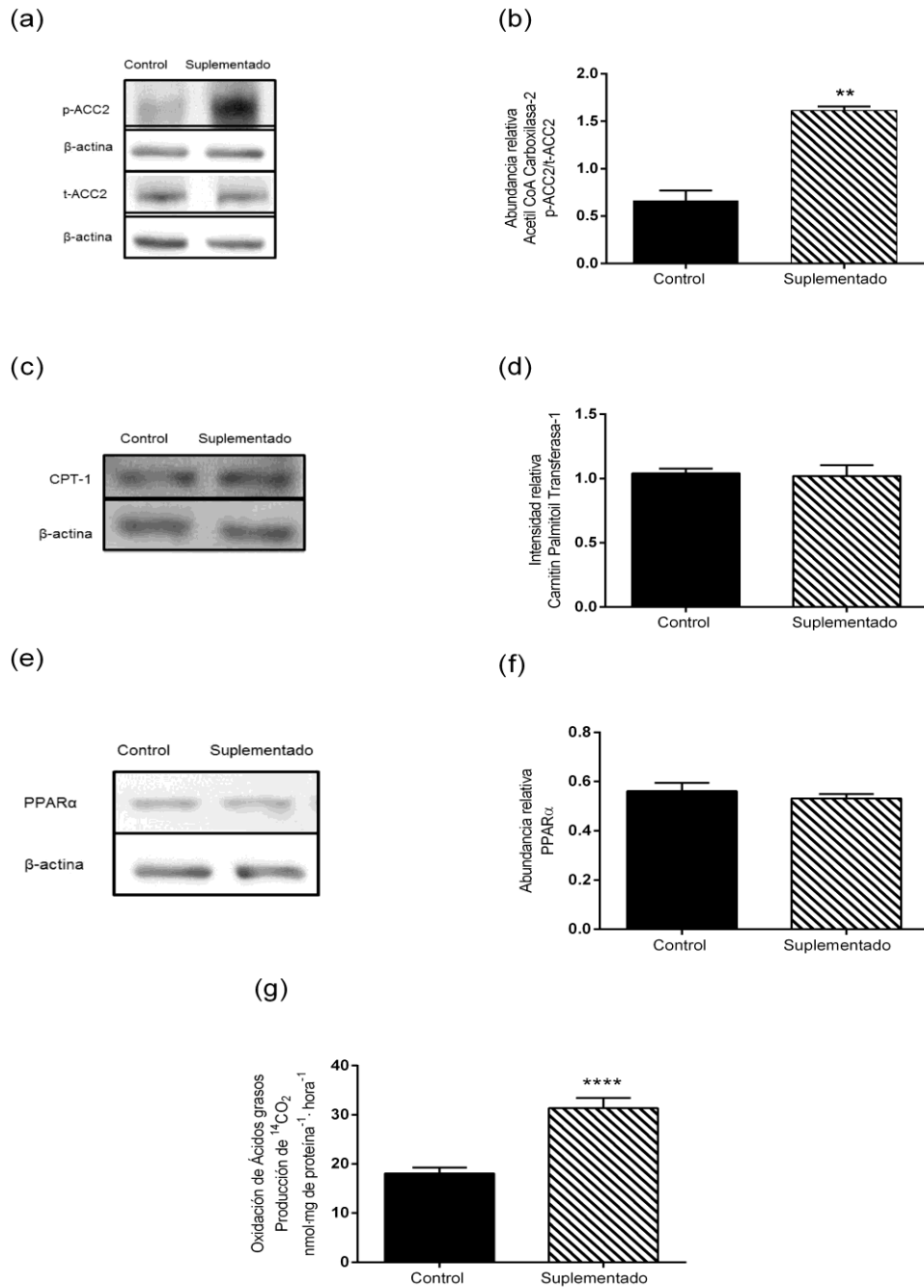
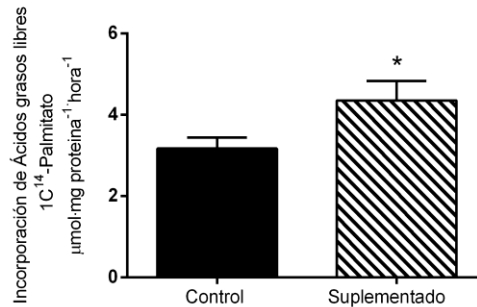


Figura 11. Efecto de la suplementación con biotina sobre proteínas reguladoras y la tasa de oxidación de ácidos grasos. Adipocitos cultivados en medio control o con una concentración 1μM de biotina durante 8 días. **(a)** y **(b)**: Western blot representativo y cuantificación densitométrica de la abundancia de la acetil-CoA carboxilasa-2 (ACC-2) en sus formas total y fosforilada. **(c)** y **(d)**: Western blot y abundancia relativa de la expresión de la carnitina palmitoiltransferasa-1(CPT-1). **(e)** y **(f)**: Western blot representativo y abundancia proteica del factor transcripcional PPARα. Las gráficas representan la media ± SE de 3 experimentos independientes. **(g)** Oxidación de ácidos grasos monitoreados a través de la producción de CO₂ por incorporación y oxidación de ¹⁴C-palmitato. La gráfica representa la media ± SE de 3-4 réplicas de 3 experimentos independientes. **P≤0.005; ****P≤0.0001.

7.4.2 Efecto de la suplementación con biotina sobre los transportadores de ácidos grasos

Como aproximación a los mecanismos moleculares involucrados en el incremento de la incorporación de ácidos grasos en respuesta a la suplementación con biotina, investigamos la expresión de algunas proteínas asociadas a su transporte, evaluando la abundancia de los transportadores de ácidos grasos que se han reportado tienen una mayor expresión en los adipocitos analizando el mRNA de *Slc27a1* y *Slc27a4* (también conocidos como *Fatp-1* y *Fatp-4* respectivamente), *Acs1-1*; una proteína con actividad acil-CoA que participa en el proceso de incorporación de ácidos grasos [26], así como de la translocasa de ácidos grasos *Cd36*. Nuestros resultados (**figura 12b**) muestran que la suplementación con biotina incrementó la abundancia del mRNA de *Fatp-1* y de *Acs1-1* aproximadamente 50%, y 77% respectivamente. No encontramos modificaciones en la abundancia de los transcritos de *Fatp-4* y *Cd36*.

(a)



(b)

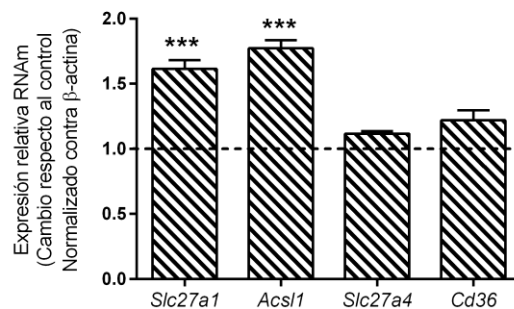


Figura 12. Efecto de la suplementación con biotina sobre la incorporación de ácidos grasos libres y expresión de mRNA's asociados a su transporte. Adipocitos 3T3-L1 cultivados en medio control o suplementado con biotina durante 8 días. **(a):** Incorporación de [1-¹⁴C]-palmitato a la fracción lipídica. Las barras representan la media ± SE de 3 experimentos independientes de 3-4 réplicas por experimento. **(b):** Expresión relativa de los mRNA's de *Slc27a1*, *Acs1*, *Slc27a4*, y *Cd36*. Las barras representan la media ± SE del cambio en la expresión de los cultivos suplementados con biotina respecto a los cultivos control (línea punteada). Valores de tres experimentos independientes. *P≤0.05; ***P≤0.001.

7.5 Efecto de la suplementación con biotina sobre el contenido de triglicéridos y distribución de las gotas de grasa

7.5.1 Efecto de la suplementación con biotina sobre la acumulación de triglicéridos

En contraste con los resultados descritos en la sección **7.4** que mostraron que la suplementación con biotina incrementa la incorporación de ácidos grasos libres en los adipocitos, nosotros encontramos que la acumulación de triglicéridos es similar en los adipocitos control y los suplementados con biotina (**Figuras 13a y 13b**). Esta determinación se realizó a través de un ensayo enzimático: (control: 743 ± 23.7 ; suplementado: 734 ± 19.6 μg triglicéridos:mg proteína⁻¹) y por tinción y extracción del colorante rojo oleoso O (control: 0.72 ± 0.01 ; suplementado: 0.71 ± 0.005) (**Figura 13c**). La contradicción de estos datos con los que muestran un aumento en la incorporación de ácidos grasos podría deberse al decremento en la lipogénesis *de novo* y al incremento en la tasa de oxidación de ácidos grasos en los cultivos de adipocitos cultivados con una concentración 1 μM de biotina.

7.5.2 Efecto de la suplementación con biotina sobre el número y tamaño de las gotas de grasa

Interesantemente, encontramos que el área de las gotas de grasa de los adipocitos en el tratamiento suplementado fue significativamente menor a las del grupo control (control: 13.62 ± 0.34 ; suplementado: 10.20 ± 0.26 μm^2) ($P < 0.0001$) (**Figura 13d**). Es decir que las gotas de triglicéridos de los adipocitos suplementados con biotina son más pequeñas. En la **figura 13e** se muestra la distribución de frecuencias del tamaño de las gotas de grasa en donde encontramos que aproximadamente el 43% de las gotas de grasa corresponden

a un tamaño entre $0.1-9.9 \mu\text{m}^2$ en el tratamiento suplementado mientras que en el tratamiento control solo el 23% de las gotas de grasa corresponden a ese tamaño. Adicionalmente, en el tratamiento control encontramos gotas de grasa de más de $150 \mu\text{m}^2$, tamaño que no se observó en el tratamiento suplementado.

Estos resultados también contrastan respecto a que el contenido de triglicéridos se mantuvo sin cambio en ambos tratamientos (**Figura 13c**). Sin embargo, encontramos un que la suplementación con biotina incrementó significativamente el número de las gotas de grasa por cada campo de $5000 \mu\text{m}^2$ analizado (control: 71.63 ± 2.6 ; suplementado: 84.03 ± 1.9 gotas de grasa) (**Figura 13f**). Este resultado puede explicar que el contenido de grasa es el mismo en ambos tratamientos. Es decir, la suplementación con biotina incrementa el número pero disminuye el tamaño de las gotas de grasa en adipocitos en comparación con el tratamiento control.

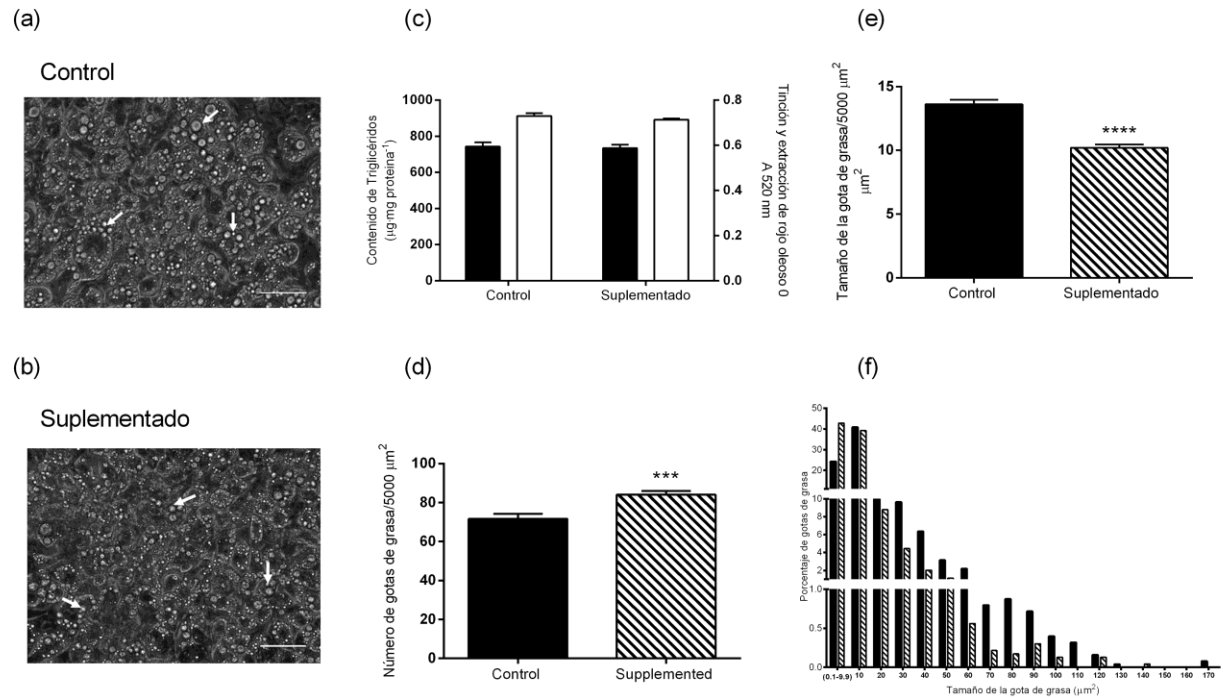


Figura 13. Efecto de la suplementación con biotina sobre la morfología, contenido y distribución de las gotas de grasa. Adipocitos 3T3-L1 cultivados en medio control y suplementado con 1 μM de biotina durante 8 días. **(a)** y **(b)** Fotografías representativas de la morfología de los adipocitos control y suplementados respectivamente. Las flechas indican las gotas de grasa. La barra de escala corresponde a 50 μm. **(c)**: Cuantificación del contenido de triglicéridos a través del método enzimático (barras negras) y por tinción y extracción del colorante rojo oleoso O (barras blancas). Valores de media ± SE de tres experimentos independientes realizados en duplicado. **(d)**: Área de las gotas de grasa en μm². **(e)**: Distribución de las frecuencias de tamaño de las gotas de grasa expresadas en porcentaje respecto al número total de gotas de grasa. **(f)**: Número de gotas de grasa. Cultivos control (barras negras), cultivos suplementados (barras con líneas). Los datos representan la media ± SE de n=2182 (control) y n=2322 (suplementado) gotas de grasa. ***P<0.0005, ****P<0.0001.

7.6 Efecto de la inhibición de AMPK sobre la acumulación de triglicéridos

La inhibición de la lipogénesis *de novo*, así como el incremento en la oxidación de ácidos grasos, son dos vías metabólicas reguladas por la proteína AMPK [48]. Dado que nosotros encontramos que estos dos procesos se encuentran modificados de manera acorde con la activación de AMPK en respuesta a la suplementación con biotina pero sin modificaciones en el contenido de triglicéridos en ambos tratamientos, nosotros analizamos el efecto de la inhibición de AMPK sobre la acumulación de triglicéridos; para lo cual a los 8 días, los cultivos fueron tratados con el Compuesto C (un inhibidor de AMPK) durante 24 horas. Los resultados en la **Figura 14** muestran que los adipocitos tratados con 1 μ M de biotina incrementaron significativamente su contenido de triglicéridos respecto a los adipocitos del grupo control en presencia del inhibidor de AMPK (control + vehículo: $1,344 \pm 80.8$; control + Compuesto C: $1,338 \pm 41.2$; suplementado + vehículo: $1,260 \pm 108$; Suplementado + Compuesto C: $2,507 \pm 115$ μ g triglicéridos·mg proteína⁻¹).

Estos datos sugieren que la activación de AMPK en respuesta a la suplementación con biotina afecta el contenido de triglicéridos en adipocitos; sin embargo, otras vías independientes de la cinasa como la incorporación y/o la esterificación de ácidos grasos, podrían estar participando en la acumulación de triglicéridos en los adipocitos suplementados con biotina.

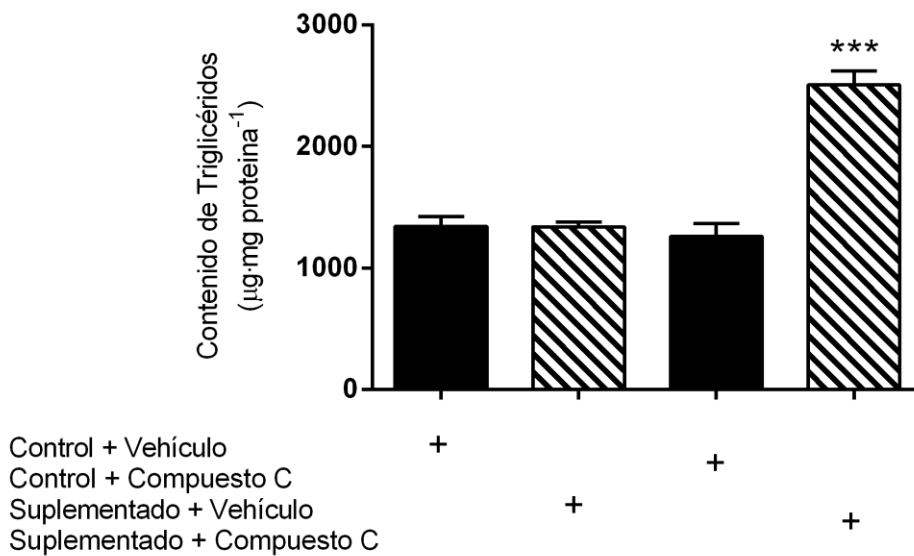
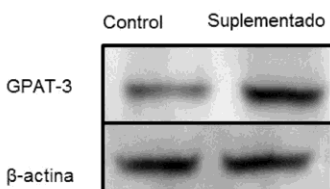


Figura 14.- Efecto de la inhibición de AMPK en el contenido de triglicéridos. A los 8 días los adipocitos cultivados bajo condiciones fisiológicas de biotina y en una concentración 1 µM de la vitamina fueron tratados durante 24 horas con el Compuesto C. Posteriormente se evaluó la acumulación de triglicéridos en presencia y/o ausencia del inhibidor a través de un método enzimático. Los datos representan la media ± SE de tres experimentos independientes. ***P<0.005.

7.7 Efecto de la suplementación con biotina sobre la glicerol-3 fosfato aciltransferasa-3

Dado que nosotros encontramos que la incorporación de ácidos grasos libres se encuentra incrementada en adipocitos cultivados bajo concentraciones farmacológicas de biotina evaluamos el efecto de la vitamina sobre la enzima glicerol -3 fosfato aciltransferasa-3. Esta enzima es la que se ha reportado contribuye mayormente en la síntesis de triglicéridos en adipocitos 3T3-L1 [27]. Como se observa en la **Figura 15a y 15b**, la suplementación con biotina incrementó la abundancia de esta proteína aproximadamente en un 60% respecto al tratamiento control (control: 0.56 ± 0.03 ; suplementado: 0.89 ± 0.09). $P < 0.05$.

(a)



(b)

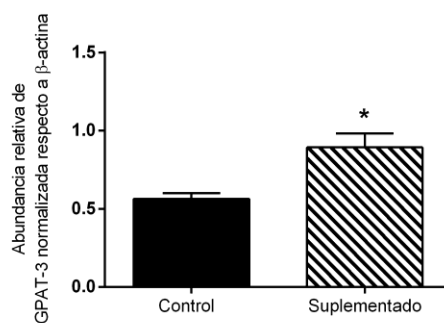


Figura 15.- Efecto de la suplementación con biotina sobre los niveles de expresión de la proteína glicerol-3 fosfato aciltransferasa-1 (GPAT-3). Las células 3T3-L1 fueron cultivadas en medio control o bajo una concentración 1 μ M de biotina durante 8 días. **(a):** Western blot representativo de la abundancia de la proteína GPAT-3. **(b):** Cuantificación de la abundancia proteica de GPAT-3 normalizada respecto a su control de carga β -actina. Las barras representan la media \pm SE de tres experimentos independientes. * $P < 0.05$.

7.8 Efecto de la suplementación con biotina sobre la vía de señalización del GMPc

7.8.1 Efecto de la suplementación con biotina sobre el contenido de guanosín monofosfato cíclico (GMPc)

Diversos estudios han reportado que el mecanismo de acción de la biotina en concentraciones farmacológicas es a través de la vía del GMPc/PKG [53,109,123,152,153]. Dados estos antecedentes, nosotros evaluamos el contenido intracelular de GMPc en adipocitos tratados con 1 μ M de biotina y bajo la concentración fisiológica de la vitamina. **La figura 16a** muestra que los niveles de GMPc se encuentran significativamente incrementados en el tratamiento suplementado respecto al control (control: 153.3 ± 3.14 ; suplementado: 337.1 ± 21.4) $P < 0.001$.

7.8.2 Efecto de la inhibición de la proteína cinasa G (PKG) sobre el contenido de triglicéridos

PKG es una cinasa de serinas/treoninas activada por cGMP. Esta activación inicia una cascada de señalización involucrada en diversos procesos biológicos, incluida la activación de AMPK [123]. Como una aproximación al mecanismo por el que la suplementación con biotina induce la activación de AMPK, y dado que nuestros resultados mostraron que al usar un inhibidor de esta cinasa el contenido de triglicéridos se incrementa en los adipocitos tratados con biotina, nosotros exploramos la posibilidad de observar este mismo efecto al utilizar un inhibidor de la PKG (Rp-8-CPT-cGMPS). En contraste con el resultado de la **(Figura 14)**, al utilizar el inhibidor de PKG no se observaron diferencias significativas en la acumulación de triglicéridos entre ambos

grupos (control + vehículo: 1344 ± 80.76 ; suplementado + vehículo: 1260 ± 108.3 ; control + Rp-8-CPT-cGMPS: 1254 ± 56.6 ; suplementado + Rp-8-CPT-cGMPS 1196 ± 69.5 μg de triglicéridos · mg de proteína) (**Figura 16b**).

7.8.3 Efecto de la suplementación con biotina sobre la activación de la óxido nítrico sintasa

La producción de óxido nítrico es uno de los mecanismos mediante los cuales se activa a la guanilato ciclasa soluble para producir cGMP [154]. Está documentado que los adipocitos producen óxido nítrico a través de la óxido nítrico sintasa endotelial y aunque existen pocos estudios al respecto se ha sugerido que el óxido nítrico juega un papel importante en el balance energético del organismo [155]. Esta enzima se activa por fosforilación en la región de Ser117 por varias cinasas, incluida AMPK [156]. Dado que nuestros resultados demuestran que la suplementación con biotina incrementa el contenido celular de GMPc, así como la abundancia de la forma activa de la AMPK, nosotros evaluamos la posibilidad de que el aumento en el contenido de cGMP fuera una consecuencia del aumento del óxido nítrico promovido por la activación de AMPK. Por este motivo analizamos la abundancia de la óxido nítrico sintasa en su forma activa. Las **Figuras 16c y 16d** muestra que existe un incremento significativo de esta enzima en su forma activa en adipocitos tratados con $1 \mu\text{M}$ de la vitamina con respecto a los cultivos control. (Control: 0.576 ± 0.08 ; suplementado: 1.18 ± 0.19).

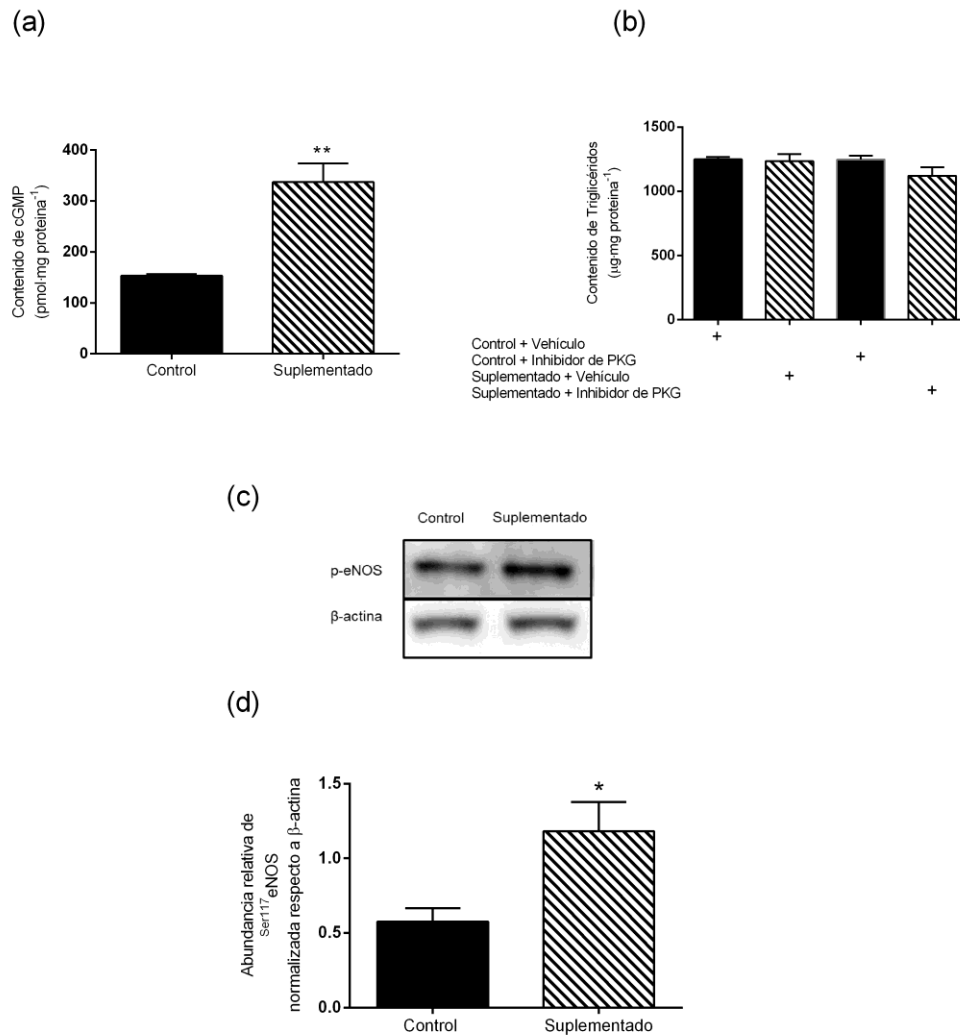


Figura 16. Efecto de la suplementación con biotina sobre la vía de señalización del GMPc. Adipocitos 3T3-L1 cultivados durante 8 días en condición fisiológica de biotina y bajo una concentración 1 µM de la vitamina. **(a):** Cuantificación intracelular de GMPc. **(b):** Efecto de la inhibición de la proteína cinasa dependiente de GMPc (PKG) sobre el contenido de triglicéridos. **(c):** Western blot representativo de la abundancia proteica de T¹¹⁷eNOS. **(d):** Cuantificación densitométrica de óxido nítrico sintasa (T¹¹⁷eNOS) normalizada respecto al control de carga endógeno β-actina. Las barras representan la media ± SE de tres experimentos independientes. *P<0.05; **P<0.005.

8. DISCUSIÓN

Diversos estudios han demostrado que la suplementación con biotina disminuye la concentración sérica de ácidos grasos libres [93,145] y modifica el metabolismo de los lípidos [91,93,126,145]. Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales la vitamina realiza estos efectos son desconocidos. En este trabajo nosotros investigamos el efecto de la suplementación con biotina sobre diferentes vías del metabolismo de los lípidos en un sistema *in vitro* utilizando adipocitos de la línea 3T3-L1, una línea celular comúnmente usada para investigar los mecanismos que participan en el metabolismo de los adipocitos.

Nuestros resultados muestran que la suplementación con biotina incrementan la abundancia de la proteína AMPK en su forma activa (^{T172}AMPK) en un efecto dosis-dependiente. Además esta modificación es independiente de cambios en la abundancia de la proteína en su forma total. En concordancia con este efecto, la suplementación con biotina disminuyó la síntesis de ácidos grasos e incrementó su tasa de oxidación a través del aumento en la abundancia de la acetil-CoA carboxilasa-2 en su forma inactiva (^{S212}ACC-2). No observamos cambios en la abundancia del factor transcripcional PPAR α o de la carnitina palmitoiltransferasa-1. En este trabajo también demostramos que los adipocitos tratados con una concentración 1 μ M de biotina incrementan su capacidad para incorporar ácidos grasos libres y que este efecto se encuentra asociado a un aumento en los RNAm de moléculas involucradas en su transporte como *FATP-1* y *ACSL-1*. A pesar del incremento en la incorporación de los ácidos grasos libres en respuesta a la suplementación con biotina, encontramos que la acumulación de triglicéridos permaneció sin cambios, posiblemente debido a la disminución en la lipogénesis e incremento en la tasa de oxidación de ácidos grasos en los adipocitos tratados con la vitamina.

Existen diversos estudios que han demostrado que la administración de una dieta suplementada con biotina disminuye la expresión de genes que participan en la

lipogénesis [91,157]. Estos efectos han sido observados en modelos diabéticos, [157] así como en animales normales [91]. En estudios previos en nuestro laboratorio se demostró que la suplementación con biotina incrementa la abundancia de ^{T172}AMPK en el hígado y en el tejido adiposo [93,126] y que, en concordancia, se observó un incremento en la fosforilación de la proteína acetil-CoA carboxilasa-1 en una región de fosforilación modulada por AMPK (^{S79}ACC-1). También, el tratamiento con biotina produjo una disminución en la proteína ácido graso sintasa. De la misma manera, acorde con el aumento de la forma activa de AMPK se observó un aumento de la forma inactiva de la acetil-CoA carboxilasa-2. Estos resultados nos indican que la suplementación con biotina afecta a proteínas que participan en el metabolismo de los lípidos independientemente del modelo experimental utilizado.

Los resultados obtenidos sobre el efecto de la suplementación con biotina sobre las enzimas reguladoras de la lipogénesis sugieren que esta vía se encuentra inhibida. Para probar esta hipótesis nosotros evaluamos la capacidad de las células tratadas en condiciones fisiológicas de biotina así como bajo el tratamiento suplementado de la vitamina para sintetizar lípidos a partir de precursores derivados del acetato. Mediante radio-ensayos utilizando ¹⁴C-acetato y midiendo su incorporación a la fracción lipídica encontramos una disminución significativa de la marca radioactiva en los cultivos de adipocitos suplementados con biotina respecto a los cultivos control. Con estos resultados, en este trabajo se demuestra por primera vez que la biotina inhibe la síntesis de lípidos. Todos estos resultados sustentan el efecto inhibitorio de la suplementación con biotina sobre la lipogénesis *de novo* previamente sugerido por estudios en nuestro laboratorio [91,93,126].

Estudios previos en ratones que recibieron una dieta suplementada con biotina durante 8 semanas, se encontró un incremento de la abundancia de la acetil-CoA carboxilasa-2 en su forma inactiva [93]. Esta enzima tiene 2 isoformas: acetil-CoA carboxilasa-1 y-2, ambas catalizan la formación de malonil-CoA a partir de acetil-CoA, sin embargo, difieren en su localización celular [35]. Mientras la isoenzima 1 se encuentra en el citoplasma y es limitante en la síntesis de lípidos [35,158], la isoenzima 2 se encuentra en la membrana externa mitocondrial regulando su oxidación [158]. Se ha demostrado que la inhibición por fosforilación sobre la isoenzima mitocondrial incrementa la oxidación de ácidos grasos [147,159]. En el presente trabajo nosotros evaluamos los efectos de la suplementación con biotina sobre la tasa de oxidación de ácidos grasos así como de algunas proteínas reguladoras del este proceso: acetil-CoA carboxilasa-2, PPAR α y la carnitina palmitoiltransferasa-1. PPAR α es un factor transcripcional que regula diversos genes que participan en la oxidación de ácidos grasos. Se ha demostrado que la sobre expresión de este factor representa un incremento en la tasa oxidativa de ácidos grasos en músculo e hígado [51,66,160]. Por otra parte, la carnitina palmitoiltransferasa-1 es una enzima que participan en la incorporación de los ácidos grasos hacia el interior de la mitocondria para su oxidación. Esta proteína está regulada negativamente por el malonil-CoA producido por la acetil-CoA carboxilasa-2 [32], y su transcripción se encuentra regulada por PPAR α . Nosotros encontramos que la suplementación con biotina incrementó la abundancia de la ^{S212}acetil-CoA carboxilasa-2 sin cambios en la abundancia de PPAR α o de la carnitina palmitoiltransferasa-1. Para demostrar si el cambio en la expresión proteica de esta carboxilasa se traducía en modificaciones en la tasa de oxidación de ácidos grasos, evaluamos la capacidad oxidativa de los adipocitos. Nuestros resultados mostraron que los cultivos suplementados con biotina presentaron mayor tasa de oxidación de ácidos grasos. Estos datos indican que el incremento en la ^{S212}acetil-CoA carboxilasa-2 es capaz de incrementar la tasa de oxidación de ácidos grasos en respuesta a una concentración

farmacológica de biotina. Dado que se sabe que la región de fosforilación de S212 en la acetil-CoA carboxilasa-2 es modulada por AMPK [35], nuestros resultados sustentan que la biotina a través de la activación de esta cinasa incrementa la oxidación de ácidos grasos en adipocitos 3T3-L1.

Además, nosotros encontramos que los adipocitos suplementados con biotina incrementaron su capacidad para incorporar ácidos grasos libres. Este efecto se encontró asociado a un aumento en la expresión de RNAm de proteínas que participan en su transporte: FATP-1 y ACSL1, sin observarse cambios en la abundancia de los transcritos de los transportadores CD36 y FATP-4. FATP-1 y ACSL1, son proteínas que catalizan la adición del grupo acilo al ácido graso en una reacción ATP dependiente [23,24]. El mecanismo de acción de FATP-1 se encuentra relacionado con la incorporación de ácidos grasos libres en el estado de post-prandio y su actividad es regulada por insulina, la cual promueve su translocación hacia la membrana celular en adipocitos [45]. Estudios previos en animales suplementados durante 8 semanas con concentraciones farmacológicas de biotina mostraron un aumento en la secreción de insulina en el post-prandio [161] y una disminución del contenido sérico de ácidos grasos libres [93]. Dado que nuestros resultados muestran un aumento del transcrito de FATP-1, es posible que este transportador del tejido adiposo se encuentre participando en la incorporación de ácidos grasos libres en respuesta a la suplementación con biotina observada en estudios previos.

ACSL1 es la proteína tipo acil-CoA sintetasa de mayor actividad en adipocitos, contribuyendo con aproximadamente el 80% de la actividad acil-CoA en el tejido adiposo [26,162]. La sobre-expresión de ACSL1 en adipocitos 3T3-L1 incrementa la incorporación y esterificación de ácidos grasos [163,164], mientras que su inhibición impide la

incorporación de ácidos grasos [164]. Por otra parte, se sabe que ACSL1 tiene una co-localización constitutiva con FATP-1 por lo que se ha propuesto que esta interacción contribuye directamente a la incorporación adecuada de ácidos grasos hacia el interior de las células [164]. En el presente estudio se encontró un aumento en la expresión de los RNAm de ambas proteínas; sin embargo, experimentos adicionales son necesarios para establecer el efecto de la suplementación con biotina sobre estos transportadores.

Por otra parte, la suplementación con biotina no modificó la abundancia de los transportadores FATP-4 y CD36. Un trabajo previo reportado por Lobo *et. al* [24], demostró que FATP-1 y FATP-4 presentan distintas funciones, mientras que en células knock-down para FATP-1 se reduce en un 25% la incorporación de ácidos grasos, los ensayos de knock-down para FATP-4 no presentaron ningún cambio. Esto apoya un papel importante del transportador FATP-1 en la incorporación de ácidos grasos libres en respuesta a la suplementación con biotina. Interesantemente, a pesar de que la incorporación de ácidos grasos libres se encuentra incrementada en el tratamiento suplementado con biotina, encontramos que la acumulación de triglicéridos en ambos tratamientos se mantuvo sin cambio. Estos resultados sugieren que otros mecanismos como la disminución en la síntesis de ácidos grasos y el incremento en su oxidación en el tratamiento suplementado se encuentran participando en el mantenimiento del contenido de triglicéridos.

Por otra parte, encontramos que el área y el número de las gotas de grasa se encuentran modificados en respuesta a la suplementación con biotina. Las gotas de grasa, que es la forma en la que se acumulan los triglicéridos en los adipocitos, consisten en una monocapa de fosfolípidos así como de la asociación de varias proteínas del citoesqueleto y de síntesis de triglicéridos [165]. Nuestros resultados muestran que la expresión de proteínas que se encuentran asociadas a la gota de grasa tales como: la ácido graso

sintasa, ACSL1 y la glicerol-3 fosfato acil transferasa-3 se encuentran modificadas en el tratamiento suplementado con la vitamina, por lo que estas modificaciones pudieran jugar un papel importante en la disminución del tamaño de las gotas de grasa. Sin embargo, no se puede descartar que otros mecanismos participen en el cambio del tamaño de las gotas de grasa ya que se ha demostrado que la administración de concentraciones farmacológicas de biotina modifican proteínas del citoesqueleto [166] y estructurales [167]. Además, se ha documentado que la vitamina biotina participa en la distribución de vimentina, una proteína involucrada en la biogénesis de las gotas de grasa en adipocitos 3T3-F442A [168].

La obesidad se caracteriza por un exceso en la acumulación de triglicéridos en el cuerpo [15]. El incremento en la incorporación de ácidos grasos, así como en el aumento en la expresión de moléculas como los transportadores de ácidos grasos: FATP-1, ACSL1, así como de la glicerol-3 fosfato aciltransferasa-3 podría representar modificaciones en la acumulación de grasa en adipocitos suplementados con la vitamina biotina. Sin embargo, nuestros resultados muestran que la acumulación de grasa en ambos tratamientos se mantuvo sin cambios. En un trabajo previo [91] se demostró una disminución en el peso del tejido adiposo en relación con el peso corporal de animales que recibieron durante 8 semanas una dieta con concentraciones farmacológicas de biotina. Sin embargo, este estudio no realizó ensayos de contenido de grasa ni de morfología en el tejido adiposo. Por lo que futuras investigaciones son necesarias sobre los efectos *in vivo* de la suplementación con biotina sobre los depósitos de grasa dadas las similitudes que hemos encontrado en los estudios *in vivo* e *in vitro*.

En el presente trabajo, nosotros también encontramos que al utilizar un inhibidor de AMPK, los adipocitos suplementados con biotina incrementaron su contenido de

triglicéridos. Estos datos sugieren que AMPK participa en la acumulación de triglicéridos en adipocitos pero que otras vías del metabolismo de los lípidos como la incorporación y esterificación de ácidos grasos libres podrían estar involucradas en este proceso, en un mecanismo independiente a la acción de AMPK.

En la **figura 17** podemos observar el modelo propuesto de los efectos de la suplementación con biotina sobre el metabolismo de los lípidos en adipocitos 3T3-L1. Los adipocitos tratados con biotina incrementan la forma activa de AMPK. En correlación, el tratamiento modifica la expresión de la forma inactiva de la acetil-CoA carboxilasa-1 y disminuye la abundancia de la ácido graso sintasa, efectos que se ven reflejados en la disminuyendo la lipogénesis *de novo*. La suplementación con biotina incrementa la oxidación de ácidos grasos a través de la inhibición por fosforilación de la ^{S212}acetil-CoA carboxilasa-2. Nuestros datos también indicaron que la suplementación con biotina incrementa la incorporación de ácidos grasos libres, de transcritos relacionados con su transporte como FATP-1 y ACSL1, así como de la glicerol-3 fosfato aciltransferasa-3 que participa en la esterificación de los ácidos grasos. El hecho de que la inhibición de AMPK incrementara la acumulación de triglicéridos en los adipocitos suplementados con la vitamina, sugiere que estos últimos efectos pudieran estar modulados por acciones independientes de la actividad de AMPK.

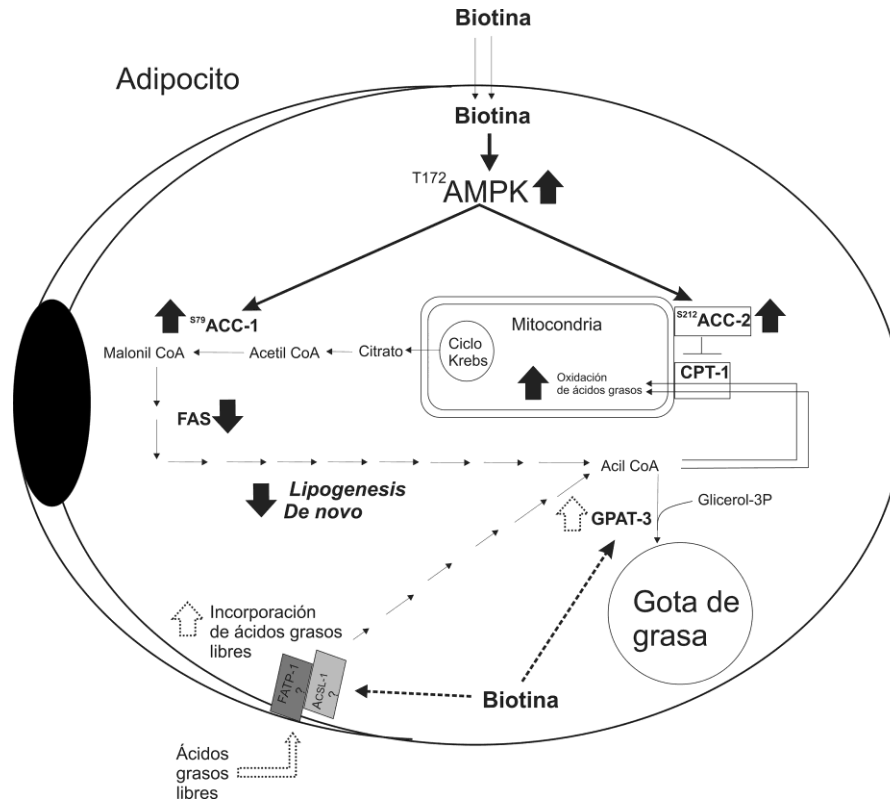


Figura 17. Modelo propuesto de las vías de señalización del metabolismo de los lípidos en los que la biotina se encuentra participando. La suplementación con biotina incrementa la abundancia de la forma activa de AMPK lo cual disminuye la síntesis de ácidos grasos e incrementa su tasa de oxidación a través de la inactivación de la acetil-CoA carboxilasa-1 (ACC-1) y la acetil-CoA carboxilasa-2 (ACC-2) respectivamente. Estos cambios no se correlacionan con una disminución en la acumulación de triglicéridos, posiblemente porque la suplementación con biotina además incrementa la incorporación de ácidos grasos libres y la abundancia de la proteína glicerol-3 fosfato aciltransferasa-3 (GPAT-3) involucrada en la esterificación. El incremento del contenido de triglicéridos posterior a la inhibición de AMPK sugiere que la incorporación y esterificación de ácidos grasos pueden ser eventos independientes de la acción de AMPK. Líneas continuas: Efectos dependientes de AMPK. Líneas punteadas: Efectos independientes de AMPK

Algunos estudios han tratado de dilucidar el mecanismo por el cual la suplementación con biotina realiza sus efectos. Uno de los mecanismos más aceptado es a través de un aumento en la producción de GMPc, mediante la acción de la guanilato ciclasa soluble [53,109,123,152,153]. Nuestros resultados muestran en soporte a estudios previos [93,126], que los adipocitos suplementados con biotina presentan un mayor contenido de GMPc. Otros estudios señalan que la vía del GMPc/PKG actúa como activador de AMPK [149,169]. Si la PKG regulase a la AMPK, entonces la inhibición de PKG debería verse reflejada en las acciones de la AMPK, como su participación en la regulación del contenido de triglicéridos, sin embargo esto no se vio en el estudio, por lo que estos datos sugieren que la PKG no está participando en la activación de AMPK.

El óxido nítrico es producido por la óxido nítrico sintasa, el cual es el sustrato de la guanilato ciclasa para producir GMPc [154]. La óxido nítrico sintasa endotelial es una enzima blanco de AMPK, a la que fosforila en la región de S117, esta modificación incrementa su actividad [156]. Nosotros evaluamos el estado de fosforilación de esta enzima y la encontramos incrementada en el tratamiento suplementado. Estos resultados podrían sugerir que la producción de GMPc en respuesta a la suplementación con biotina es una consecuencia de la activación de AMPK y no un efecto directo de la vitamina. Sin embargo, son requeridos experimentos más específicos para comprobar la participación de la proteína PKG en la activación de AMPK, así como de los mecanismos de señalización cascada arriba de la producción de GMPc en respuesta a concentraciones farmacológicas de la biotina en adipocitos.

La obesidad y el aumento de los ácidos grasos libres en suero son factores que están particularmente relacionados con patologías como el síndrome metabólico [15,170]. El presente estudio aporta nuevos conocimientos sobre los mecanismos moleculares por los

que la vitamina biotina ejerce sus efectos en el metabolismo de los lípidos, y en la acumulación de triglicéridos, mismos que contribuyen a comprender las acciones mediante las cuales la suplementación con biotina produce efectos hipolipemiantes. De esta manera, el presente trabajo aporta bases moleculares para el uso de concentraciones farmacológicas de biotina como nueva estrategia para el desarrollo de agentes terapéuticos contra desórdenes del metabolismo de los lípidos observados en patologías como el síndrome metabólico.

9. CONCLUSIONES

- 1.- La biotina en concentraciones farmacológicas incrementa la abundancia de la forma activa de AMPK (T172 AMPK) en un efecto dosis-dependiente.
- 2.- Acorde a la activación de AMPK, la suplementación con biotina inhibe la lipogénesis *de novo* a través de la regulación negativa de proteínas reguladoras del proceso: acetil-CoA carboxilasa-1 y ácido graso sintasa
- 3.- La suplementación con biotina incrementa la abundancia de la forma inactiva de la acetil-CoA carboxilasa-2 (S212 ACC-2) efecto que representa un aumento en la tasa de oxidación de ácidos grasos. Estos efectos resultaron independientes de modificaciones en la abundancia de PPAR α y de la carnitina palmitoiltransferasa-1
- 4.- La suplementación con biotina no modifica la acumulación de triglicéridos en los adipocitos, sin embargo, incrementa su número y disminuye significativamente el tamaño de las gotas de grasa en los adipocitos.
- 5.- La suplementación con biotina incrementa la capacidad de los adipocitos de incorporar ácidos grasos libres así como la abundancia de la proteína glicerol-3 fosfato aciltransferasa-3. Ambos procesos pueden estar relacionados con el aumento en la esterificación de ácidos grasos.
- 6.- La biotina incrementa la abundancia de los transcritos de moléculas que participan en la incorporación de ácidos grasos: *FATP-1* y *ACSL1* pero no de *CD36* o *FATP-4*
- 7.- La inhibición de AMPK incrementa el contenido de triglicéridos en adipocitos suplementados con biotina, lo que sugiere que la incorporación y esterificación de ácidos grasos son efectos independientes de la actividad de AMPK.
- 8.- La suplementación con biotina incrementa el contenido celular de GMPc

9.- La inhibición de PKG no modificó en el contenido de triglicéridos en adipocitos suplementados con biotina.

10.- La suplementación con biotina modifica la abundancia de la forma activa de la óxido nítrico sintasa endotelial (^{s117}eNOS) en una región de fosforilación modulada por AMPK.

10.- PERSPECTIVAS

- Explorar el efecto de la suplementación con biotina sobre otras moléculas que participan en la incorporación de ácidos grasos libres, así como de su expresión y localización celular a nivel de proteínas.
- Resultaría interesante investigar cuáles son los mecanismos que participan en el cambio del tamaño y número de las gotas de grasa en adipocitos cultivados con concentraciones farmacológicas de biotina.
- Realizar experimentos específicos para determinar si la incorporación de ácidos grasos libres en respuesta a concentraciones farmacológicas de biotina es independiente de la activación de la proteína AMPK
- Sería interesante realizar ensayos espacio-temporales y determinar el periodo de exposición a la suplementación con biotina que es requerido para la activación de AMPK, así como para el incremento en la concentración intracelular de GMPc.
- Ensayos de inmuno-precipitación para descartar o corroborar la relación entre las cinasas PKG y AMPK

11. REFERENCIAS

- [1] Gesta, S., Tseng, Y.-H., and Kahn, C. R. (2007) Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell*. **131**, 242–56
- [2] Sanchez-Gurmaches, J., and Guertin, D. A. (2014) Adipocyte lineages: tracing back the origins of fat. *Biochim. Biophys. Acta*. **1842**, 340–51
- [3] Sethi, J. K., and Vidal-Puig, A. J. (2007) Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J. Lipid Res*. **48**, 1253–62
- [4] Prunet-Marcassus, B., Cousin, B., Caton, D., André, M., Pénicaud, L., and Casteilla, L. (2006) From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: site-specific differences. *Exp. Cell Res*. **312**, 727–36
- [5] Giordano, A., Smorlesi, A., Frontini, A., Barbatelli, G., and Cinti, S. (2014) White, brown and pink adipocytes: The extraordinary plasticity of the adipose organ. *Eur. J. Endocrinol*. **170**, 1–39
- [6] Wu, J., Boström, P., Sparks, L. M., Ye, L., Choi, J. H., Giang, A.-H., Khandekar, M., Virtanen, K. A., Nuutila, P., Schaart, G., Huang, K., Tu, H., van Marken Lichtenbelt, W. D., Hoeks, J., Enerbäck, S., Schrauwen, P., and Spiegelman, B. M. (2012) Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*. **150**, 366–76
- [7] Fasshauer, M., and Blüher, M. (2015) Adipokines in health and disease. *Trends Pharmacol. Sci*. **36**, 461–70
- [8] Lehr, S., Hartwig, S., and Sell, H. (2012) Adipokines: a treasure trove for the discovery of biomarkers for metabolic disorders. *Proteomics. Clin. Appl*. **6**, 91–101

- [9] Rodríguez, A., Ezquerro, S., Méndez-Giménez, L., Becerril, S., and Frühbeck, G. (2015) Revisiting the adipocyte: a model for integration of cytokine signaling in the regulation of energy metabolism. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **309**, E691-714
- [10] Spiegelman, B. M., and Flier, J. S. (1996) Adipogenesis and Obesity: Rounding Out the Big Picture. *Cell.* **87**, 377–389
- [11] Must, A., Spadano, J., Coakley, E. H., Field, A. E., Colditz, G., and Dietz, W. H. (1999) The disease burden associated with overweight and obesity. *JAMA.* **282**, 1523–9
- [12] Joosen, A. M., and Westerterp, K. R. (2006) Energy expenditure during overfeeding. *Nutr. Metab. (Lond).* **3**, 25
- [13] Jeffery, E., Church, C. D., Holtrup, B., Colman, L., and Rodeheffer, M. S. (2015) Rapid depot-specific activation of adipocyte precursor cells at the onset of obesity. *Nat. Cell Biol.* 10.1038/ncb3122
- [14] Jernås, M., Palming, J., Sjöholm, K., Jennische, E., Svensson, P.-A., Gabrielsson, B. G., Levin, M., Sjögren, A., Rudemo, M., Lystig, T. C., Carlsson, B., Carlsson, L. M. S., and Lönn, M. (2006) Separation of human adipocytes by size: hypertrophic fat cells display distinct gene expression. *FASEB J.* **20**, 1540–2
- [15] Bremer, A. A., Devaraj, S., Afify, A., and Jialal, I. (2011) Adipose Tissue Dysregulation in Patients with Metabolic Syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**, E1782–E1788
- [16] Carobbio, S., Pellegrinelli, V., and Vidal-Puig, A. (2017) Adipose Tissue Function and Expandability as Determinants of Lipotoxicity and the Metabolic Syndrome. *Adv. Exp. Med. Biol.* **960**, 161–196

- [17] Czech, M. P., Tencerova, M., Pedersen, D. J., and Aouadi, M. (2013) Insulin signalling mechanisms for triacylglycerol storage. *Diabetologia*. **56**, 949–64
- [18] Obregon, M.-J. (2014) Adipose tissues and thyroid hormones. *Front. Physiol.* **5**, 479
- [19] Kim, K. (1997) Acetyl-Coenzyme a Carboxylase
- [20] Gram, M. R., and Okey, R. (1958) Incorporation of acetate-2-C¹⁴ into liver and carcass lipids and cholesterol in biotin-deficient rats. *J. Nutr.* **64**, 217–28
- [21] Solinas, G., Borén, J., and Dulloo, A. G. (2015) De novo lipogenesis in metabolic homeostasis: More friend than foe? *Mol. Metab.* **4**, 367–377
- [22] Nguyen, P., Leray, V., Diez, M., Serisier, S., Le Bloc'h, J., Siliart, B., and Dumon, H. (2008) Liver lipid metabolism. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. **92**, 272–83
- [23] Thompson, B. R., Lobo, S., and Bernlohr, D. A. (2010) Fatty acid flux in adipocytes: the in's and out's of fat cell lipid trafficking. *Mol. Cell. Endocrinol.* **318**, 24–33
- [24] Lobo, S., Wiczer, B. M., Smith, A. J., Hall, A. M., and Bernlohr, D. A. (2007) Fatty acid metabolism in adipocytes: functional analysis of fatty acid transport proteins 1 and 4. *J. Lipid Res.* **48**, 609–620
- [25] Wu, Q., Ortegon, A. M., Tsang, B., Doege, H., Feingold, K. R., and Stahl, A. (2006) FATP1 is an insulin-sensitive fatty acid transporter involved in diet-induced obesity. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 3455–67
- [26] Lobo, S., Wiczer, B. M., and Bernlohr, D. A. (2009) Functional analysis of long-chain acyl-CoA synthetase 1 in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* **284**, 18347–56
- [27] Cao, J., Li, J.-L., Li, D., Tobin, J. F., and Gimeno, R. E. (2006) Molecular identification of microsomal acyl-CoA:glycerol-3-phosphate acyltransferase, a key

enzyme in de novo triacylglycerol synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 19695–700

- [28] Rambold, A. S., Cohen, S., and Lippincott-Schwartz, J. (2015) Fatty acid trafficking in starved cells: regulation by lipid droplet lipolysis, autophagy, and mitochondrial fusion dynamics. *Dev. Cell.* **32**, 678–92
- [29] Cawthorn, W. P., and Sethi, J. K. (2008) TNF-alpha and adipocyte biology. *FEBS Lett.* **582**, 117–31
- [30] Schulz, H. (1991) Beta oxidation of fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* **1081**, 109–120
- [31] Watkins, P. A., Ferrell, E. V, Pedersen, J. I., and Hoefler, G. (1991) Peroxisomal fatty acid beta-oxidation in HepG2 cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **289**, 329–36
- [32] Schreurs, M., Kuipers, F., and van der Leij, F. R. (2010) Regulatory enzymes of mitochondrial beta-oxidation as targets for treatment of the metabolic syndrome. *Obes. Rev.* **11**, 380–8
- [33] Berg JM, Tymoczko JL, S. L. (2002) Acetyl Coenzyme A Carboxylase Plays a Key Role in Controlling Fatty Acid Metabolism. in *Biochemistry*
- [34] Foretz, M., Carling, D., Guichard, C., Ferré, P., and Foufelle, F. (1998) AMP-activated protein kinase inhibits the glucose-activated expression of fatty acid synthase gene in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **273**, 14767–71
- [35] Fullerton, M. D., Galic, S., Marcinko, K., Sikkema, S., Pulinilkunnil, T., Chen, Z.-P., O'Neill, H. M., Ford, R. J., Palanivel, R., O'Brien, M., Hardie, D. G., Macaulay, S. L., Schertzer, J. D., Dyck, J. R. B., van Denderen, B. J., Kemp, B. E., and Steinberg, G. R. (2013) Single phosphorylation sites in Acc1 and Acc2 regulate lipid homeostasis

and the insulin-sensitizing effects of metformin. *Nat. Med.* **19**, 1649–54

- [36] Liang, X., Le, W., Zhang, D., and Schulz, H. (2001) Impact of the intramitochondrial enzyme organization on fatty acid oxidation. *Biochem. Soc. Trans.* **29**, 279–82
- [37] Sethi, J. K., and Vidal-Puig, a. J. (2007) Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J. Lipid Res.* **48**, 1253–1262
- [38] Villena, J. A., Roy, S., Sarkadi-Nagy, E., Kim, K.-H., and Sul, H. S. (2004) Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. *J. Biol. Chem.* **279**, 47066–75
- [39] Møller, N., and Jørgensen, J. O. L. (2009) Effects of Growth Hormone on Glucose, Lipid, and Protein Metabolism in Human Subjects. *Endocr. Rev.* **30**, 152–177
- [40] Goldberg, I. J., Eckel, R. H., and Abumrad, N. A. Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase-and CD36-mediated pathways. 10.1194/jlr.R800085-JLR200
- [41] Morgan-Bathke, M., Chen, L., Oberschneider, E., Harteneck, D., and Jensen, M. D. (2016) More insights into a human adipose tissue GPAT activity assay. *Adipocyte.* **5**, 93–6
- [42] Wendel, A. A., Lewin, T. M., and Coleman, R. A. (2009) Glycerol-3-phosphate acyltransferases: rate limiting enzymes of triacylglycerol biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta.* **1791**, 501–6
- [43] Newsholme, E., and Dimitriadis, G. (2001) Integration of biochemical and physiologic effects of insulin on glucose metabolism. *Exp. Clin. Endocrinol.*

Diabetes. **109**, S122–S134

- [44] Meek, S. E., Nair, K. S., and Jensen, M. D. (1999) Insulin regulation of regional free fatty acid metabolism. *Diabetes*. **48**, 10–4
- [45] Wu, Q., Ortegon, A. M., Tsang, B., Doege, H., Feingold, K. R., and Stahl, A. (2006) FATP1 Is an Insulin-Sensitive Fatty Acid Transporter Involved in Diet-Induced Obesity. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 3455–3467
- [46] Xu, N., Zhang, S. O., Cole, R. A., McKinney, S. A., Guo, F., Haas, J. T., Bobba, S., Farese, R. V, and Mak, H. Y. (2012) The FATP1-DGAT2 complex facilitates lipid droplet expansion at the ER-lipid droplet interface. *J. Cell Biol.* **198**, 895–911
- [47] Rutter, G. A., Da Silva Xavier, G., and Leclerc, I. (2003) Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homeostasis. *Biochem. J.* **375**, 1–16
- [48] Ruderman, N. B., Park, H., Kaushik, V. K., Dean, D., Constant, S., Prentki, M., and Saha, a K. (2003) AMPK as a metabolic switch in rat muscle, liver and adipose tissue after exercise. *Acta Physiol. Scand.* **178**, 435–42
- [49] Galic, S., Loh, K., Murray-Segal, L., Steinberg, G. R., Andrews, Z. B., and Kemp, B. E. (2018) AMPK signaling to acetyl-CoA carboxylase is required for fasting- and cold-induced appetite but not thermogenesis. *Elife*. **7**, e32656
- [50] Choi, C. S., Savage, D. B., Abu-Elheiga, L., Liu, Z.-X., Kim, S., Kulkarni, A., Distefano, A., Hwang, Y.-J., Reznick, R. M., Codella, R., Zhang, D., Cline, G. W., Wakil, S. J., and Shulman, G. I. (2007) Continuous fat oxidation in acetyl CoA carboxylase 2 knockout mice increases total energy expenditure, reduces fat mass, and improves insulin sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 16480–16485
- [51] Glosli, H., Gudbrandsen, O. A., Mullen, A. J., Halvorsen, B., Røst, T. H., Wergedahl,

- H., Prydz, H., Aukrust, P., and Berge, R. K. (2005) Down-regulated expression of PPAR α target genes, reduced fatty acid oxidation and altered fatty acid composition in the liver of mice transgenic for hTNF α . *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* **1734**, 235–246
- [52] Pilz, R. B., and Broderick, K. E. (2005) Role of cyclic GMP in gene regulation. *Front. Biosci.* **10**, 1239–68
- [53] Stockert, R. J., and Morell, A. G. (1990) Second messenger modulation of the asialoglycoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* **265**, 1841–6
- [54] Pilz, R. B., and Casteel, D. E. (2003) Regulation of gene expression by cyclic GMP. *Circ. Res.* **93**, 1034–46
- [55] Kurowska, E. M., and Carroll, K. K. (1998) Hypocholesterolemic properties of nitric oxide. In vivo and in vitro studies using nitric oxide donors. *Biochim. Biophys. Acta.* **1392**, 41–50
- [56] Míguez, I., Mariño, G., Rodríguez, B., and Taboada, C. (2004) Effects of dietary L-arginine supplementation on serum lipids and intestinal enzyme activities in diabetic rats. *J. Physiol. Biochem.* **60**, 31–7
- [57] Khedara, A., Kawai, Y., Kayashita, J., and Kato, N. (1996) Feeding rats the nitric oxide synthase inhibitor, L-N(omega)nitroarginine, elevates serum triglyceride and cholesterol and lowers hepatic fatty acid oxidation. *J. Nutr.* **126**, 2563–7
- [58] Khairallah, R. J., Khairallah, M., Gélinas, R., Bouchard, B., Young, M. E., Allen, B. G., Lopaschuk, G. D., Deschepper, C. F., and Des Rosiers, C. (2008) Cyclic GMP signaling in cardiomyocytes modulates fatty acid trafficking and prevents triglyceride accumulation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **45**, 230–9

- [59] García-Villafranca, J., Guillén, A., and Castro, J. (2003) Involvement of nitric oxide/cyclic GMP signaling pathway in the regulation of fatty acid metabolism in rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* **65**, 807–12
- [60] Young, M. E., and Leighton, B. (1998) Fuel oxidation in skeletal muscle is increased by nitric oxide/cGMP--evidence for involvement of cGMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett.* **424**, 79–83
- [61] Horton, J. D., Shimomura, I., Brown, M. S., Hammer, R. E., Goldstein, J. L., and Shimano, H. (1998) Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. *J. Clin. Invest.* **101**, 2331–9
- [62] Raghow, R., Yellaturu, C., Deng, X., Park, E. A., and Elam, M. B. (2008) SREBPs: the crossroads of physiological and pathological lipid homeostasis. *Trends Endocrinol. Metab.* **19**, 65–73
- [63] Lee, J.-E., and Ge, K. (2014) Transcriptional and epigenetic regulation of PPAR γ expression during adipogenesis. *Cell Biosci.* **4**, 29
- [64] Siersbaek, R., Nielsen, R., and Mandrup, S. (2010) PPAR γ in adipocyte differentiation and metabolism--novel insights from genome-wide studies. *FEBS Lett.* **584**, 3242–9
- [65] Tzameli, I., Fang, H., Ollero, M., Shi, H., Hamm, J. K., Kievit, P., Hollenberg, A. N., and Flier, J. S. (2004) Regulated production of a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand during an early phase of adipocyte differentiation in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* **279**, 36093–102
- [66] Kersten, S., Seydoux, J., Peters, J. M., Gonzalez, F. J., Desvergne, B., and Wahli,

- W. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor α mediates the adaptive response to fasting. *J. Clin. Invest.* **103**, 1489–1498
- [67] Boden, G. (2011) Obesity, insulin resistance and free fatty acids. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes. Obes.* **18**, 139–43
- [68] Trujillo, M. E., and Scherer, P. E. (2006) Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. *Endocr. Rev.* **27**, 762–78
- [69] Hocking, S., Samocha-Bonet, D., Milner, K.-L., Greenfield, J. R., and Chisholm, D. J. (2013) Adiposity and insulin resistance in humans: the role of the different tissue and cellular lipid depots. *Endocr. Rev.* **34**, 463–500
- [70] Hajer, G. R., van Haften, T. W., and Visseren, F. L. J. (2008) Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur. Heart J.* **29**, 2959–71
- [71] Hotamisligil, G. S. (2003) Inflammatory pathways and insulin action. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **27 Suppl 3**, S53-5
- [72] Stolar, M. (2007) Metabolic syndrome: controversial but useful. *Cleve. Clin. J. Med.* **74**, 199–202, 205–8
- [73] Capurso, C., and Capurso, A. (2012) From excess adiposity to insulin resistance: The role of free fatty acids. *Vascul. Pharmacol.* **57**, 91–97
- [74] McGarry, J. D., and Dobbins, R. L. (1999) Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion. *Diabetologia.* **42**, 128–138
- [75] Choi, S. M., Tucker, D. F., Gross, D. N., Easton, R. M., DiPilato, L. M., Dean, A. S., Monks, B. R., and Birnbaum, M. J. (2010) Insulin regulates adipocyte lipolysis via an Akt-independent signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 5009–20

- [76] Ruderman, N. B., Saha, A. K., Vavvas, D., and Witters, L. A. (1999) Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance. *Am. J. Physiol.* **276**, E1–E18
- [77] Diraison, F., Dusserre, E., Vidal, H., Sothier, M., and Beylot, M. (2002) Increased hepatic lipogenesis but decreased expression of lipogenic gene in adipose tissue in human obesity. *Am. J. Physiol. Metab.* **282**, E46–E51
- [78] Unger, R. H., and Orci, L. (2002) Lipoapoptosis: its mechanism and its diseases. *Biochim. Biophys. Acta.* **1585**, 202–12
- [79] Yang, X., Jansson, P.-A., Nagaev, I., Jack, M. M., Carvalho, E., Sunnerhagen, K. S., Cam, M. C., Cushman, S. W., and Smith, U. (2004) Evidence of impaired adipogenesis in insulin resistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **317**, 1045–1051
- [80] Klein, J., Perwitz, N., Kraus, D., and Fasshauer, M. (2006) Adipose tissue as source and target for novel therapies. *Trends Endocrinol. Metab.* **17**, 26–32
- [81] Spiegelman, B. M. (1998) PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes.* **47**, 507–14
- [82] Scheen, A. J. (2001) Thiazolidinediones and liver toxicity. *Diabetes Metab.* **27**, 305–13
- [83] Snehalatha, C., Priscilla, S., Nanditha, A., Arun, R., Satheesh, K., and Ramachandran, A. (2018) Metformin in Prevention of Type 2 Diabetes. *J. Assoc. Physicians India.* **66**, 55–58
- [84] Bailey, C. J. (2017) Metformin: historical overview. *Diabetologia.* **60**, 1566–1576
- [85] Fernandez-Mejia, C., and Lazo-de-la-Vega-Monroy, M.-L. (2011) Biological Effects

of Pharmacological Concentrations of Biotin. *J. Evid. Based. Complementary Altern. Med.* **16**, 40–48

- [86] Riveron-Negrete, L., and Fernandez-Mejia, C. (2017) Pharmacological Effects of Biotin in Animals. *Mini-Reviews Med. Chem.* **17**, 529–540
- [87] Martini, L. A., Catania, A. S., and Ferreira, S. R. (2010) Role of vitamins and minerals in prevention and management of type 2 diabetes mellitus. *Nutr. Rev.* **68**, 341–354
- [88] Vosper, H. (2009) Niacin: a re-emerging pharmaceutical for the treatment of dyslipidaemia. *Br. J. Pharmacol.* **158**, 429–41
- [89] Dakshinamurti, K., and Cheah-Tan, C. (1968) Biotin-mediated synthesis of hepatic glucokinase in the rat. *Arch. Biochem. Biophys.* **127**, 17–21
- [90] Suchy, S. F., and Wolf, B. (1986) Effect of biotin deficiency and supplementation on lipid metabolism in rats: cholesterol and lipoproteins. *Am. J. Clin. Nutr.* **43**, 831–8
- [91] Larrieta, E., Velasco, F., Vital, P., López-Aceves, T., Lazo-de-la-Vega-Monroy, M. L., Rojas, A., and Fernandez-Mejia, C. (2010) Pharmacological concentrations of biotin reduce serum triglycerides and the expression of lipogenic genes. *Eur. J. Pharmacol.* **644**, 263–268
- [92] Lazo de la Vega-Monroy, M. L., Larrieta, E., German, M. S., Baez-Saldana, a, and Fernandez-Mejia, C. (2013) Effects of biotin supplementation in the diet on insulin secretion, islet gene expression, glucose homeostasis and beta-cell proportion. *J. Nutr. Biochem.* **24**, 169–77
- [93] Boone-Villa, D., Aguilera-Méndez, A., Miranda-Cervantes, A., and Fernandez-Mejia, C. (2015) Effects of Biotin Supplementation in the Diet on Adipose Tissue cGMP

- Concentrations, AMPK Activation, Lipolysis, and Serum-Free Fatty Acid Levels. *J. Med. Food.* **18**, 1150–1156
- [94] Revilla-Monsalve, C., Zendejas-Ruiz, I., Islas-Andrade, S., Báez-Saldaña, A., Palomino-Garibay, M. A., Hernández-Quiróz, P. M., and Fernandez-Mejia, C. (2006) Biotin supplementation reduces plasma triacylglycerol and VLDL in type 2 diabetic patients and in nondiabetic subjects with hypertriglyceridemia. *Biomed. Pharmacother.* **60**, 182–5
- [95] Sahin, K., Tuzcu, M., Orhan, C., Sahin, N., Kucuk, O., Ozercan, I. H., Juturu, V., and Komorowski, J. R. (2013) Anti-diabetic activity of chromium picolinate and biotin in rats with type 2 diabetes induced by high-fat diet and streptozotocin. *Br. J. Nutr.* **110**, 197–205
- [96] Boas, M. A. (1927) The Effect of Desiccation upon the Nutritive Properties of Egg-white. *Biochem. J.* **21**, 712–724.1
- [97] Said, H. M. (2012) Biotin: biochemical, physiological and clinical aspects. *Subcell. Biochem.* **56**, 1–19
- [98] Uchida, Y., Ito, K., Ohtsuki, S., Kubo, Y., Suzuki, T., and Terasaki, T. (2015) Major involvement of Na⁺-dependent multivitamin transporter (SLC5A6/SMVT) in uptake of biotin and pantothenic acid by human brain capillary endothelial cells. *J. Neurochem.* **134**, 97–112
- [99] Daberkow, R. L., White, B. R., Cederberg, R. a, Griffin, J. B., and Zemleni, J. (2003) Monocarboxylate transporter 1 mediates biotin uptake in human peripheral blood mononuclear cells. *J. Nutr.* **133**, 2703–6
- [100] McMahon, R. J. (2002) Biotin in metabolism and molecular biology. *Annu. Rev.*

Nutr. **22**, 221–39

- [101] Zempleni, J., and Mock, D. M. (2001) Biotin homeostasis during the cell cycle. *Nutr. Res. Rev.* **14**, 45–64
- [102] Dakshinamurti, K., and Desjardins, P. R. (1968) Lipogenesis in biotin deficiency. *Can. J. Biochem.* **46**, 1261–7
- [103] Dakshinamurti, K., and Ho Chong Hong (1970) Regulation of key hepatic glycolytic enzymes. *Enzymol. Biol. Clin. (Basel)*. **11**, 423–8
- [104] Spence, J. T., and Koudelka, A. P. (1984) Effects of biotin upon the intracellular level of cGMP and the activity of glucokinase in cultured rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **259**, 6393–6
- [105] Chauhan, J., and Dakshinamurti, K. (1991) Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats. *J. Biol. Chem.* **266**, 10035–8
- [106] Wiedmann, S., Rodriguez-Melendez, R., Ortega-Cuellar, D., and Zempleni, J. (2004) Clusters of biotin-responsive genes in human peripheral blood mononuclear cells. *J. Nutr. Biochem.* **15**, 433–9
- [107] Rodriguez-Melendez, R., and Zempleni, J. (2003) Regulation of gene expression by biotin☆ (review). *J. Nutr. Biochem.* **14**, 680–690
- [108] Rodríguez-Meléndez, R., and Cano, S. (2001) Biotin regulates the genetic expression of holocarboxylase synthetase and mitochondrial carboxylases in rats. *J. Nutr.* **7**, 1909–1913
- [109] Solórzano-Vargas, R. S., Pacheco-Alvarez, D., and León-Del-Río, A. (2002) Holocarboxylase synthetase is an obligate participant in biotin-mediated regulation

of its own expression and of biotin-dependent carboxylases mRNA levels in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 5325–5330

- [110] Griffin, J. B., Rodriguez-Melendez, R., Dode, L., Wuytack, F., and Zempleni, J. (2006) Biotin supplementation decreases the expression of the SERCA3 gene (ATP2A3) in Jurkat cells, thus, triggering unfolded protein response. *J. Nutr. Biochem.* **17**, 272–81
- [111] Zempleni, J. (2005) Uptake, Localization, and Noncarboxylase Roles of Biotin*. *Annu. Rev. Nutr.* **25**, 175–196
- [112] Manthey, K. C., Griffin, J. B., and Zempleni, J. (2002) Biotin supply affects expression of biotin transporters, biotinylation of carboxylases and metabolism of interleukin-2 in Jurkat cells. *J. Nutr.* **132**, 887–92
- [113] Zempleni, J., Helm, R. M., and Mock, D. M. (2001) In vivo biotin supplementation at a pharmacologic dose decreases proliferation rates of human peripheral blood mononuclear cells and cytokine release. *J. Nutr.* **131**, 1479–1484
- [114] Peters, D. M., Griffin, J. B., Stanley, J. S., Beck, M. M., and Zempleni, J. (2002) Exposure to UV light causes increased biotinylation of histones in Jurkat cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **283**, C878-84
- [115] Smith, E. M., Hoi, J. T., Eissenberg, J. C., Shoemaker, J. D., Neckameyer, W. S., Ilvarsonn, A. M., Harshman, L. G., Schlegel, V. L., and Zempleni, J. (2007) Feeding *Drosophila* a biotin-deficient diet for multiple generations increases stress resistance and lifespan and alters gene expression and histone biotinylation patterns. *J. Nutr.* **137**, 2006–12
- [116] Bailey, L. M., Ivanov, R. A., Wallace, J. C., and Polyak, S. W. (2008) Artifactual

detection of biotin on histones by streptavidin. *Anal. Biochem.* **373**, 71–7

- [117] Healy, S., Perez-Cadahia, B., Jia, D., McDonald, M. K., Davie, J. R., and Gravel, R. A. (2009) Biotin is not a natural histone modification. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1789**, 719–733
- [118] Kuroishi, T., Rios-Avila, L., Pestinger, V., Wijeratne, S. S. K., and Zempleni, J. (2011) Biotinylation is a natural, albeit rare, modification of human histones. *Mol. Genet. Metab.* **104**, 537–45
- [119] Vesely, D. L. (1982) Biotin enhances guanylate cyclase activity. *Science.* **216**, 1329–30
- [120] Solórzano-Vargas, R. S., Pacheco-Alvarez, D., and León-Del-Río, A. (2002) Holocarboxylase synthetase is an obligate participant in biotin-mediated regulation of its own expression and of biotin-dependent carboxylases mRNA levels in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 5325–30
- [121] Riveron-Negrete, L., and Fernandez-Mejia, C. (2017) Pharmacological Effects of Biotin in Animals. *Mini-Reviews Med. Chem.* **17**, 529–540
- [122] Pacheco-Alvarez, D., Solórzano-Vargas, R. S., Gravel, R. A., Cervantes-Roldán, R., Velázquez, A., and León-Del-Río, A. (2004) Paradoxical regulation of biotin utilization in brain and liver and implications for inherited multiple carboxylase deficiency. *J. Biol. Chem.* **279**, 52312–8
- [123] De La Vega, L. A., and Stockert, R. J. (2000) Regulation of the insulin and asialoglycoprotein receptors via cGMP-dependent protein kinase. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **279**, C2037-42
- [124] Vilches-Flores, A., Tovar, A. R., Marin-Hernandez, A., Rojas-Ochoa, A., and

- Fernandez-Mejia, C. (2010) Biotin increases glucokinase expression via soluble guanylate cyclase/protein kinase G, adenosine triphosphate production and autocrine action of insulin in pancreatic rat islets ☆. *J. Nutr. Biochem.* **21**, 606–612
- [125] Watanabe-Kamiyama, M., Kamiyama, S., Horiuchi, K., Ohinata, K., Shirakawa, H., Furukawa, Y., and Komai, M. (2008) Antihypertensive effect of biotin in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Nutr.* **99**, 756–63
- [126] Aguilera-Méndez, A., and Fernández-Mejía, C. (2012) The hypotriglyceridemic effect of biotin supplementation involves increased levels of cGMP and AMPK activation. *BioFactors.* **38**, 387–394
- [127] Romero-Navarro, G., Cabrera-Valladares, G., German, M. S., Matschinsky, F. M., Velazquez, A., Wang, J., and Fernandez-Mejia, C. (1999) Biotin regulation of pancreatic glucokinase and insulin in primary cultured rat islets and in biotin-deficient rats. *Endocrinology.* **140**, 4595–600
- [128] Dakshinamurti, K., and Li, W. (1994) Transcriptional regulation of liver phosphoenolpyruvate carboxykinase by biotin in diabetic rats. *Mol. Cell. Biochem.* **132**, 127–32
- [129] Koutsikos, D., Fourtounas, C., Kapetanaki, A., Agroyannis, B., Tzanatos, H., Rammos, G., Kopelias, I., Bosiolis, B., Bovoleti, O., Darema, M., and Sallum, G. (1996) Oral glucose tolerance test after high-dose i.v. biotin administration in normoglycemic hemodialysis patients. *Ren. Fail.* **18**, 131–7
- [130] Zhang, H., Osada, K., Sone, H., and Furukawa, Y. (1997) Biotin administration improves the impaired glucose tolerance of streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo).* **43**, 271–80

- [131] Suchy, S. F., and Wolf, B. (1986) Effect of biotin deficiency and supplementation on lipid metabolism in rats: cholesterol and lipoproteins. *Am. J. Clin. Nutr.* **43**, 831–8
- [132] Aguilera-Méndez, A., and Fernández-Mejía, C. (2012) The hypotriglyceridemic effect of biotin supplementation involves increased levels of cGMP and AMPK activation. *BioFactors.* **38**, 387–394
- [133] Dokusova, O. K., and Krivoruchenko, I. V (1972) [The effect of biotin on the level of cholesterol in the blood of patients with atherosclerosis and essential hyperlipidemia]. *Kardiologija.* **12**, 113
- [134] Marshall, M. W., Haubrich, M., Washington, V. A., Chang, M. W., Young, C. W., and Wheeler, M. A. (1976) Biotin status and lipid metabolism in adult obese hypercholesterolemic inbred rats. *Nutr. Metab.* **20**, 41–61
- [135] Larrieta, E., Velasco, F., Vital, P., López-Aceves, T., Lazo-de-la-Vega-Monroy, M. L., Rojas, A., and Fernandez-Mejia, C. (2010) Pharmacological concentrations of biotin reduce serum triglycerides and the expression of lipogenic genes. *Eur. J. Pharmacol.* **644**, 263–8
- [136] Báez-Saldaña, A., Zendejas-Ruiz, I., Revilla-Monsalve, C., Islas-Andrade, S., Cárdenas, A., Rojas-Ochoa, A., Vilches, A., and Fernandez-Mejia, C. (2004) Effects of biotin on pyruvate carboxylase, acetyl-CoA carboxylase, propionyl-CoA carboxylase, and markers for glucose and lipid homeostasis in type 2 diabetic patients and nondiabetic subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**, 238–43
- [137] Levert, K. L., Waldrop, G. L., and Stephens, J. M. (2002) A biotin analog inhibits acetyl-CoA carboxylase activity and adipogenesis. *J. Biol. Chem.* **277**, 16347–50
- [138] Lafontan, M. (2012) Historical perspectives in fat cell biology: the fat cell as a model

for the investigation of hormonal and metabolic pathways. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **302**, C327-59

- [139] Green, H., and Kehinde, O. (1976) Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells. *Cell.* **7**, 105–13
- [140] Macotela, Y., Emanuelli, B., Mori, M. A., Gesta, S., Schulz, T. J., Tseng, Y.-H., and Kahn, C. R. (2012) Intrinsic differences in adipocyte precursor cells from different white fat depots. *Diabetes.* **61**, 1691–9
- [141] Moreno-Indias, I., and Tinahones, F. J. (2015) Impaired Adipose Tissue Expandability and Lipogenic Capacities as Ones of the Main Causes of Metabolic Disorders. *J. Diabetes Res.* **2015**, 970375
- [142] Bergman, R. N., and Ader, M. (2000) Free Fatty Acids and Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. *Trends Endocrinol. Metab.* **11**, 351–356
- [143] Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G. H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497–509
- [144] Ramírez-Zacarías, J. L., Castro-Muñozledo, F., and Kuri-Harcuch, W. (1992) Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. *Histochemistry.* **97**, 493–7
- [145] Sahin, K., Tuzcu, M., Orhan, C., Sahin, N., Kucuk, O., Ozercan, I. H., Juturu, V., and Komorowski, J. R. (2013) Sahin, K., Tuzcu, M., Orhan, C., Sahin, N., Kucuk, O., Ozercan, I. H., ... Komorowski, J. R. (2013). Anti-diabetic activity of chromium picolinate and biotin in rats with type 2 diabetes induced by high-fat diet and streptozotocin. *The British Journal of Nu. Br. J. Nutr.* **110**, 197–205

- [146] Ha, J., Daniel, S., Broyles, S. S., and Kim, K. H. (1994) Critical phosphorylation sites for acetyl-CoA carboxylase activity. *J. Biol. Chem.* **269**, 22162–8
- [147] Smith, B. K., and Steinberg, G. R. (2017) AMP-activated protein kinase, fatty acid metabolism, and insulin sensitivity. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* **20**, 248–253
- [148] Davies, S. P., Sim, A. T., and Hardie, D. G. (1990) Location and function of three sites phosphorylated on rat acetyl-CoA carboxylase by the AMP-activated protein kinase. *Eur. J. Biochem.* **187**, 183–90
- [149] Ramnanan, C. J., McMullen, D. C., Groom, A. G., and Storey, K. B. (2010) The regulation of AMPK signaling in a natural state of profound metabolic rate depression. *Mol. Cell. Biochem.* **335**, 91–105
- [150] Kreuz, S., Schoelch, C., Thomas, L., Rist, W., Rippmann, J. F., and Neubauer, H. (2009) Acetyl-CoA carboxylases 1 and 2 show distinct expression patterns in rats and humans and alterations in obesity and diabetes. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* **25**, 577–586
- [151] Rakhshandehroo, M., Knoch, B., Müller, M., and Kersten, S. (2010) Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Target Genes. *PPAR Res.* **2010**, 1–20
- [152] Stockert, R. J., and Ren, Q. (1997) Cytoplasmic protein mRNA interaction mediates cGMP-modulated translational control of the asialoglycoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* **272**, 9161–5
- [153] Vilches-Flores, A., Tovar, A. R., Marin-Hernandez, A., Rojas-Ochoa, A., and Fernandez-Mejia, C. (2010) Biotin increases glucokinase expression via soluble guanylate cyclase/protein kinase G, adenosine triphosphate production and autocrine action of insulin in pancreatic rat islets. *J. Nutr. Biochem.* **21**, 606–12

- [154] Martínez-Ruiz, A., Cadenas, S., and Lamas, S. (2011) Nitric oxide signaling: Classical, less classical, and nonclassical mechanisms. *Free Radic. Biol. Med.* **51**, 17–29
- [155] Engeli, S., Janke, J., Gorzelniak, K., Böhnke, J., Ghose, N., Lindschau, C., Luft, F. C., and Sharma, A. M. (2004) Regulation of the nitric oxide system in human adipose tissue. *J. Lipid Res.* **45**, 1640–1648
- [156] Chen, Z. P., Mitchelhill, K. I., Michell, B. J., Stapleton, D., Rodriguez-Crespo, I., Witters, L. A., Power, D. A., Ortiz de Montellano, P. R., and Kemp, B. E. (1999) AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Lett.* **443**, 285–9
- [157] Sugita, Y., Shirakawa, H., Sugimoto, R., Furukawa, Y., and Komai, M. (2008) Effect of biotin treatment on hepatic gene expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**, 1290–8
- [158] Abu-Elheiga, L., Brinkley, W. R., Zhong, L., Chirala, S. S., Woldegiorgis, G., and Wakil, S. J. (2000) The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 1444–9
- [159] O'Neill, H. M., Lally, J. S., Galic, S., Thomas, M., Azizi, P. D., Fullerton, M. D., Smith, B. K., Pulinilkunnil, T., Chen, Z., Samaan, M. C., Jorgensen, S. B., Dyck, J. R. B., Holloway, G. P., Hawke, T. J., van Denderen, B. J., Kemp, B. E., and Steinberg, G. R. (2014) AMPK phosphorylation of ACC2 is required for skeletal muscle fatty acid oxidation and insulin sensitivity in mice. *Diabetologia.* **57**, 1693–1702
- [160] Rakhshandehroo, M., Hooiveld, G., Müller, M., and Kersten, S. (2009) Comparative

analysis of gene regulation by the transcription factor PPAR α between mouse and human. *PLoS One*. **4**, e6796

- [161] Lazo de la Vega-Monroy, M. L., Larrieta, E., German, M. S., Baez-Saldana, A., and Fernandez-Mejia, C. (2013) Effects of biotin supplementation in the diet on insulin secretion, islet gene expression, glucose homeostasis and beta-cell proportion. *J. Nutr. Biochem.* **24**, 169–177
- [162] Ellis, J. M., Li, L. O., Wu, P.-C., Koves, T. R., Ilkayeva, O., Stevens, R. D., Watkins, S. M., Muoio, D. M., and Coleman, R. A. (2010) Adipose acyl-CoA synthetase-1 directs fatty acids toward beta-oxidation and is required for cold thermogenesis. *Cell Metab.* **12**, 53–64
- [163] Gargiulo, C. E., Stuhlsatz-Krouper, S. M., and Schaffer, J. E. (1999) Localization of adipocyte long-chain fatty acyl-CoA synthetase at the plasma membrane. *J. Lipid Res.* **40**, 881–92
- [164] Richards, M. R., Harp, J. D., Ory, D. S., and Schaffer, J. E. (2006) Fatty acid transport protein 1 and long-chain acyl coenzyme A synthetase 1 interact in adipocytes. *J. Lipid Res.* **47**, 665–72
- [165] Fujimoto, T., and Parton, R. G. (2011) Not Just Fat: The Structure and Function of the Lipid Droplet. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a004838–a004838
- [166] Zempleni, J., Liu, D., Teixeira Camara, D., and Cordonier, E. L. (2014) Novel roles of holocarboxylase synthetase in gene regulation and intermediary metabolism. *Nutr. Rev.* **72**, 369–376
- [167] Riverón-Negrete, L., Sicilia-Argumedo, G., Álvarez-Delgado, C., Coballase-Urrutia, E., Alcántar-Fernández, J., and Fernandez-Mejia, C. (2016) Dietary Biotin

Supplementation Modifies Hepatic Morphology without Changes in Liver Toxicity Markers. *Biomed Res. Int.* **2016**, 1–9

- [168] Padilla-Benavides, T., Velez-delValle, C., Marsch-Moreno, M., Castro-Muñozledo, F., and Kuri-Harcuch, W. (2016) Lipogenic Enzymes Complexes and Cytoplasmic Lipid Droplet Formation During Adipogenesis. *J. Cell. Biochem.* **117**, 2315–26
- [169] Deshmukh, A. S., Long, Y. C., de Castro Barbosa, T., Karlsson, H. K. R., Glund, S., Zavadoski, W. J., Gibbs, E. M., Koistinen, H. A., Wallberg-Henriksson, H., and Zierath, J. R. (2010) Nitric oxide increases cyclic GMP levels, AMP-activated protein kinase (AMPK)alpha1-specific activity and glucose transport in human skeletal muscle. *Diabetologia.* **53**, 1142–50
- [170] Boden, G. (1999) Free fatty acids, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus. *Proc. Assoc. Am. Physicians.* **111**, 241–8

Effect of biotin supplementation on fatty acid metabolic pathways in 3T3-L1 adipocytes

Ericka Moreno-Méndez
Alain Hernández-Vázquez
Cristina Fernández-Mejía 

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

Abstract

Several studies have shown that pharmacological concentrations of biotin decrease serum lipid concentrations and the expression of lipogenic genes. Previous studies on epididymal adipose tissue in mice revealed that 8 weeks of dietary biotin supplementation increased the protein abundance of the active form of AMPK and the inactive forms acetyl CoA carboxylase (ACC)-1 and -2, and decreased serum free fatty acid concentrations but did not affect lipolysis. These data suggest that pharmacological concentrations of the vitamin might affect fatty acid metabolism. In this work, we investigated the effects of pharmacological biotin concentrations on fatty acid synthesis, oxidation, and uptake in 3T3-L1 adipocytes. Similar to observations in mice, biotin-supplemented 3T3-L1 adipose cells increased the protein abundance of active ^{T172}-AMPK and inactive ACC-1 and -2 forms. No changes were observed in

the expression of the transcriptional factor PPAR α and carnitine-palmitoyltransferase-1 (CPT-1). Radiolabeled assays indicated a decrease in fatty acid synthesis; an increase in fatty acid oxidation and fatty acid incorporation rate into the lipid fraction between control cells and biotin-supplemented cells. The data revealed an increase in the mRNA abundance of the fatty acid transport proteins *Fatp1* and *Acs1* but not *Cd36* or *Fatp4* mRNA. Furthermore, the abundance of glycerol phosphate acyl transferase-3 protein was increased. Triglyceride content was not affected. Lipid droplet numbers showed an increase and their areas were smaller in the biotin-supplemented group. In conclusion, these data indicate that biotin supplementation causes a decrease in fatty acid synthesis and an increase in its oxidation and uptake. © 2018 BioFactors, 9999(9999):1–12, 2018

Keywords: 3T3-L1 adipocytes; biotin; free fatty acids; AMPK; fatty acid synthesis; fatty acid oxidation; fatty acid uptake

1. Introduction

The vitamin biotin acts as a covalently bound co-factor of pyruvate carboxylase, propionyl CoA carboxylase, β -methylcrotonyl CoA carboxylase, and acetyl CoA carboxylase (ACC)-1 and -2

[1]. At pharmacological concentrations, biotin has other actions associated with changes in gene expression at the transcription, translation, and post-translation levels [1–4]. Several investigations have documented that pharmacological concentrations of

Abbreviations: ACC-1, acetyl CoA carboxylase-1; ACC-2, acetyl CoA carboxylase-2; *Acs1*, acyl CoA synthetase long-chain family member-1 mRNA; ACSL1, acyl CoA synthetase long-chain family member-1 protein; ACTB, beta-actin mRNA; AMPK, AMP-activated protein kinase; BSA, bovine serum albumin; *Cd36*, fatty-acid translocase mRNA; CPT-1, carnitine-palmitoyltransferase-1; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; FAS, fatty acid synthase; *Fatp1*, long-chain fatty acid transporter-1 mRNA; FATP1, long-chain fatty acid transporter-1 protein; *Fatp4*, long-chain fatty acid transporter-4 mRNA; FATP4, long-chain fatty acid transporter-4 protein; FBS, fetal bovine serum; GPAT-3, glycerol-3-phosphate acyltransferase-3; LD, lipid droplet; PPAR α , peroxisome proliferator activated receptor alpha; SE, standard error; *Slc27a1*, solute carrier family 27 member-1; *Slc27a4*, solute carrier family 27 member-4

© 2018 International Union of Biochemistry and Molecular Biology

Volume 9999, Number 9999, Month 2018, Pages 1–12

*Address for correspondence: Cristina Fernández-Mejía, PhD, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Investigaciones Biomédicas Instituto Nacional de Pediatría, Unidad de Genética de la Nutrición, Ciudad de México, CDMX, Mexico. Tel.: (5255) 56063558; Fax: (5255) 56063489; E-mail: crisfern@biomedicas.unam.mx

Received 25 June 2018; accepted 13 November 2018

DOI 10.1002/biof.1480

Published online 00 Month 2018 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

biotin modify lipid homeostasis [5–12]. Studies on humans and rodents demonstrate that the administration of biotin at pharmacological doses decreases serum concentrations of triglycerides [7,12], cholesterol [5,6], and free fatty acid [10,11].

The mechanisms of these effects are still being elucidated. Previous studies [10–14] have found that the hypotriglyceridemic effects of pharmacological concentrations of biotin are associated with decreased mRNA expression of lipogenic genes, such as the beta-reduction pathway enzymes ACC-1 and fatty acid synthase (FAS). Other studies revealed that 8 weeks of dietary biotin supplementation increased the expression of the active ^{T172}AMPK protein levels in the liver and adipose tissue [10,13]. This enzyme functions as a fuel sensor protein for glucose and lipid metabolism and plays a central regulatory role in the metabolism by suppressing anabolic pathways while stimulating catabolic pathways.

AMPK phosphorylates the isoforms ACC-1 and -2 on S79 and S212, respectively [15]. This translates into a decrease in lipid synthesis rates and a relief malonyl CoA carnitine-palmitoyl-transferase-1 inhibition, which leads to a higher rate of fatty acid oxidation. Consistent with the biotin-induced increase of active AMPK, we found that biotin supplementation increased the abundance of phosphorylated ACC-1 and -2 in the liver and adipose tissue [10,13]. Furthermore, we found that serum fatty acid concentrations decreased, but it did not affect lipolysis [10].

Free fatty acids have long been acknowledged as an adipose-derived signal that links obesity, insulin resistance, and type-2 diabetes [16–18]. Chronically elevated serum fatty acid produces lipotoxic effects on other tissues [19,20]. Adipose tissue has a central role in fatty acid homeostasis. It releases fatty acids from triglyceride storage deposits by lipolysis and stores them as triglycerides [21]. Adipocyte triglyceride content results from the uptake and esterification of fatty acid, *de novo* synthesis, fatty acid oxidation, and lipolysis rates [22]. In this study, we investigated the effects of biotin supplementation on fatty acid synthesis, oxidation and uptake pathways in 3T3-L1 adipocytes, a cell line that is widely used to investigate the mechanisms that participate in adipocyte metabolism.

2. Experimental procedures

2.1. Chemicals

The following reagents were used. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), dialyzed FBS, and penicillin–streptomycin (10,000 U/mL; 10,000 µg/mL) were obtained from Gibco (Carlsbad, CA). Dexamethasone, 3-isobutyl-1-methylxanthine, bovine serum albumin (BSA), d-biotin, Compound C, sodium acetate, and palmitic acid were obtained from Sigma-Aldrich (Sigma, St. Louis, MO). Human regular insulin (Humulin[®]) was obtained from Eli Lilly (CDMX, Mexico), and a biotin ELISA analysis kit was obtained from mdbioproducts (MN).

TRIzol[®] reagent, M-MVL reverse transcriptase, oligo-dT primers, and random hexamers were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA). Sybr Green Master Mix (Foster City, CA). Anti-ACC-1 and -2, anti-phospho-acetyl CoA carboxylase-1

(S79), anti-phospho-acetyl CoA carboxylase-2 (S212), anti-AMPK, anti-phospho-AMPK (T172), and anti-FAS polyclonal antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Anti β-actin, anti-CPT-1, anti-PPARα, and the secondary antibodies anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) horseradish peroxidase, goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase, and donkey anti-goat IgG horseradish peroxidase were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Anti-glycerol-3 phosphate acyl transferase-3 (GPAT-3) was obtained from Thermo Fisher Scientific Inc. (Pittsburgh, PA), radio-labeled 1-¹⁴C-palmitic acid (56.1 mCi/mmol) and 1-¹⁴C-acetate (50.5 mCi/mmol) were obtained from Perkin Elmer (Boston, MA). All reagents were analytical grade.

2.2. Cell culture

3T3-L1 cells (ATCC[®] CL-173[™]) were plated at 2×10^4 per 35 mm² dish and grown in DMEM supplemented with 6.25 mM glucose, 0.25 mM sodium pyruvate, 1% antibiotics, and 10% dialyzed FBS. This medium was changed every 48 h. Two days post-confluence, adipocyte differentiation was promoted with differentiation medium containing DMEM supplemented with 10% FBS, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 1 µM dexamethasone, and 10 µg/mL of insulin (control media) or supplemented media with 1 µM of added biotin unless otherwise stated. The biotin concentration in the control media was 14.6 nM, which was quantified with a biotin ELISA kit according to the manufacturer's instructions. After 48 h, this medium was replaced with medium containing DMEM, 10% FBS, and insulin (10 µg/mL) with or without 1 µM of biotin or other indicated in the text. This medium was replaced every 2 days. Cells were maintained at 37 °C in a humidified incubator in 5% CO₂ and collected at day 8 after the induction of differentiation.

2.3. Western blot analysis

Cells were scraped with ice-cold lysis buffer containing 50 mM HEPES, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2 mM sodium orthovanadate, 25 mM sodium fluoride, 5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM dithiothreitol, 0.1% TritonX-100, and a protease inhibitor cocktail (Roche, IN). Cell suspensions were sonicated for 1 min and then centrifuged at 12,000g for 15 min at 4 °C to remove any insoluble material. Total protein was quantified by a Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Richmond, CA) using BSA as the standard. Next, 30 µg of total protein per sample was boiled in Laemmli sample buffer (Bio-Rad, Richmond, CA) for 5 min and then electrophoresed on preparative sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The proteins were transferred to nitrocellulose membrane.

We measured the relative abundance of proteins of ^{S79}-phospho-acetyl CoA carboxylase-1 and ^{S212}-phospho-acetyl CoA carboxylase-2, as well as the total amounts of both ACC-1 and -2. For phosphorylated isoforms of ACC, we utilized conditions that allow the determination of both separately, as described previously [13]. We used specific antibodies and western blot techniques to determine FAS, total AMPK, and ^{T172}-phosphorylated AMPK forms, CPT-1, PPARα, and GPAT-3, as described previously [10,13].

TABLE 1

List of q-RT-PCR primers

Gene	Accession number	Sequence 5'–3'	Product size (bp)
SLC27A1	NM_011977.3	F: AGTGCATCTACGGGTTG R: ACACAGTCATCCCAGAAGCG	73
CD36	NM_001159558.1	F: GGCAGGAGTGCTGGATTAGT R: TGAGGCTGTGAGCAGACGTA	95
ACTB	NM_007393.5	F: CCACCATGTACCCAGGCATT R: AGGGTGTA AACGCAGCTCA	253
SLC27A4	NM_011989.5	F: GGGGCCAATAAACTCTGCCT R: TCCCAAGGGCTAAGCGAAAG	96
ACSL1	NM_001302163.1	F: AGCCTCACTGCCCTTTTCTG R: TGGGTTGGTGGTTCTCTATGC	97

2.4. RNA isolation and qRT-PCR

Total RNA was isolated from 3T3-L1 adipocytes using TRIzol[®] Reagent according to the manufacturer's instructions. Single-strand cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA by reverse-transcription reaction with 500 units of M-MVL RT, oligodT, or random hexamers. cDNA was mixed with Sybr Green Master mix and a sequence of specific primers. Table 1 provides information on the primers used.

The mRNA was determined by real-time quantitative polymerase chain reaction using an ABI Prism 7700 Sequence Detector (Foster City, CA). The quantitative expression of the genes was calculated from the cycle threshold (C_T) value of each sample using the relative quantification method ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) [23]. All samples were assayed in triplicate. The mean value for the biotin-supplemented cells was normalized to the expression of control cells, as described previously [12,24].

2.5. Radiolabeled fatty acid synthesis assay

Fully differentiated 3T3-L1 adipocytes were washed three times with phosphate buffer at pH 7.4 and incubate for 3 h in 1 mL of Krebs-Ringer phosphate buffer at pH 7.4 and containing 0.01% BSA, ¹⁴C-acetate (50.5 µCi/mmol), non-labeled acetate (0.3 mM), and 10 µM of L-carnitine. The cells were then lysed with 0.05% sodium dodecyl sulfate. Lipids were extracted by a modified Folch procedure [25]. A mixture of methanol and chloroform (2:1 v/v) was added to the cell suspension and vigorously shaken for 1 min, and then one part chloroform (100%) was added and mixed for an additional minute, followed by the addition of NaCl (1 M). The lower chloroform phase was clarified by centrifugation at 4000 rpm for 10 min at room temperature. The upper phase containing water-soluble components was discarded. The chloroform phase was concentrated by evaporation under a stream of gaseous nitrogen. The residues were dissolved in 150 µL of chloroform and methanol (2:1). The radioactivity in the cell lysate was counted for β-emission in a

liquid scintillation counter (Wallac 1414; CA). Samples were run 3–4 times in three independent experiments.

2.6. Fatty acid oxidation

Fully differentiated adipocytes were washed three times with phosphate buffer at pH 7.4 and incubated for 3 h in 1 mL of Krebs-Ringer phosphate buffer at pH 7.4 and containing 0.01% BSA, ¹⁴C-palmitate (22.4 µCi/mmol), non-labeled palmitate (0.4 mM), and 10 µM of L-carnitine. This medium was then removed to measure fatty acid oxidation. Gaseous ¹⁴CO₂ produced from ¹⁴C-palmitate oxidation during the incubation was captured by transferring 1 mL of the incubation medium into a 12-well plate. Next, 100 µL of sulfuric acid concentrate was added to each flask to release ¹⁴CO₂. The liberated ¹⁴CO₂ was trapped in Whatman[®] Cellulose Filter Paper that had been moistened with ethylene glycol monoethyl ether and 1-aminoethanol (2:1) for 3 h while slowly stirring at room temperature. The filter paper was removed, added to 5 mL of liquid scintillation, and quantified for 60 sec. The total radioactivity incorporated in the CO₂ was measured by a scintillation counter (Wallac 1414; CA). Samples were run 3–4 times in three independent experiments.

2.7. Fatty acid incorporation

The incorporation of free fatty acid was measured through the incorporation of ¹⁴C-palmitate into intracellular lipids. 3T3-L1 cells were cultured in 35 mm² dishes in medium containing 14.61 nM or 1 µM of biotin and at day 8 and incubated with ¹⁴C-palmitate (22.4 µCi/mmol) as described above. The cells were then lysed and extracted the lipid fraction using a modified Folch procedure [25] as described in Section 2.5.

2.8. Triglyceride content analysis

Fully differentiated adipocytes from both groups were washed three times with ice-cold phosphate buffer at pH 7.4 and scraped with 400 µL of 5% Nonidet P-40 lysis buffer. The cell suspension was sonicated for 1 min. The samples were slowly heated in a water bath at 70 °C until the Nonidet P-40 became cloudy and

then centrifuged at 2000 g for 2 min. The triglyceride concentrations were determined spectrophotometrically with a commercial assay kit according to the manufacturer's instructions (Spinreact; Sant Esteve de Bas, Spain). The results are reported in micrograms of triglyceride per milligram of total protein.

2.9. Microscopy analysis

Control and biotin-supplemented cultured 3T3-L1 adipocytes were observed using phase contrast microscopy in an Olympus inverted 1X70 microscope (Tokyo, Japan) at 20× magnification with an attached Media Cybernetics Evolution VF (Georgia, MD). The images were taken with identical configurations and stored using Image J 1.40 software (Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD) on a personal computer. Five sections, each with an area of 5000 μm^2 , from six different photographs per dish were analyzed to measure the number, area and size distribution of the lipid droplet (LD).

2.10. AMPK inhibition

After 8 days of differentiation, the control and biotin-supplemented 3T3-L1 adipocytes were treated with vehicle or 50 μM of Compound C (AMPK inhibitor) for 24 h [26,27]. The neutral lipid content was then examined as described above.

2.11. Statistical analysis

All results are expressed as the mean \pm standard error (SE). Statistical evaluation was performed using a student's *t*-test when two sets of values were compared. When multiple comparisons were carried out, one-way analysis of variance and Tukey's multiple-comparisons test were performed using GraphPad Prism 6.0 software (Berkeley, CA). *P* values less than 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Effect of biotin supplementation on AMPK and lipogenic enzymes ACC-1 and FAS

We first determined whether 3T3-L1 cells exhibited the effects of biotin supplementation on AMPK and *de novo* lipogenic enzymes observed in mice that were fed a biotin-supplemented diet for 8 weeks.

Dose-response effect of biotin supplementation on AMPK.

As shown in Fig. 1a and b, the active form of AMPK ($^{172}\text{-AMPK}$) was increased in response to biotin treatment in a dose-dependent manner (control: 0.64 ± 0.06 ; 0.1 μM biotin: 0.64 ± 0.17 ; 0.5 μM biotin: 1.15 ± 0.26 ; 1 μM biotin: 1.69 ± 0.06 ; 10 μM biotin: 2.24 ± 0.35). No changes were found in the abundance of total AMPK or β -actin protein. For the following experiments, we used 1 μM of biotin in the media as the biotin-supplemented treatment.

Effect of biotin supplementation on regulatory enzymes of fatty acid synthesis: ACC-1 and FAS.

In 3T3-L1 adipocytes, biotin supplementation in the media increased the inactive protein form of the enzyme $^{879}\text{-phosphorylated acetyl}$

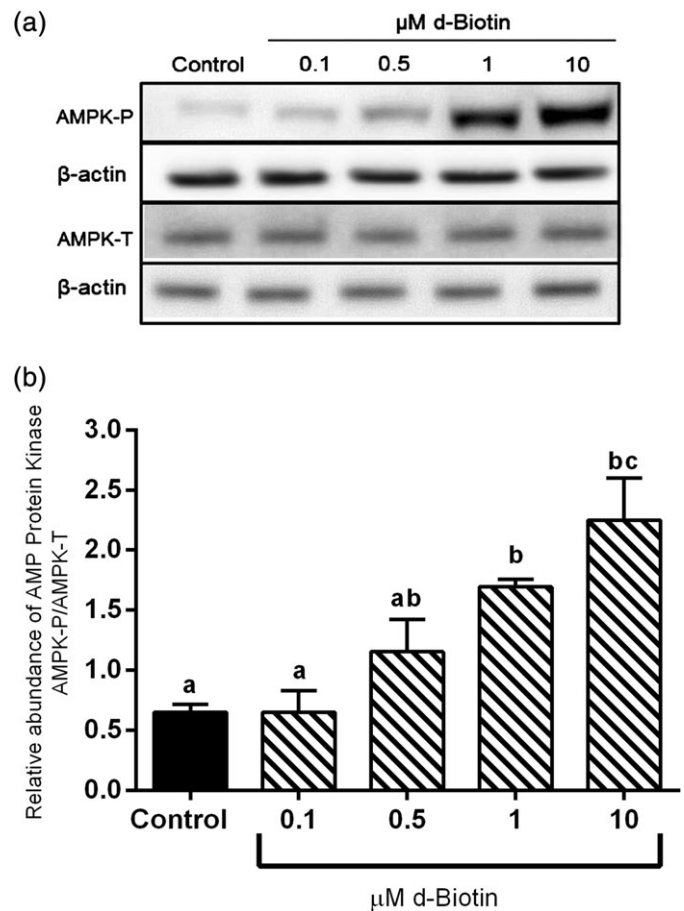


FIG 1

Dose-response effect of biotin supplementation on phosphorylated AMPK protein abundance. 3T3-L1 adipocytes were cultured in biotin-control media or different concentrations of biotin for 8 days. (a) Representative western blot analysis of total, $^{172}\text{-phosphorylated AMPK}$, and β -actin protein abundance. (b) Quantification of $^{172}\text{-phosphorylated AMPK}$ protein mass normalized to total AMPK expression levels. Graph data are the means \pm SE of values from three independent experiments. Different letters indicate statistical significance ($P < 0.05$).

CoA-1 (control: 1.92 ± 0.24 ; biotin-supplemented: 3.84 ± 0.54), as previously observed in the adipose tissue of mice fed a biotin-supplemented diet. This occurred without changes in the abundance of total protein or β -actin (Fig. 2a and b). Western blot analysis also revealed a significant decrease in the relative protein abundance of FAS (control: 0.91 ± 0.01 ; biotin-supplemented: 0.50 ± 0.07) (Fig. 2c and d).

3.2. Effect of biotin supplementation on fatty acid synthesis rate

We measured the rate of ^{14}C -acetate incorporation into the total lipid fraction. As shown in Fig. 2e, biotin-supplemented 3T3-L1 adipocytes showed a decrease in the incorporation rate

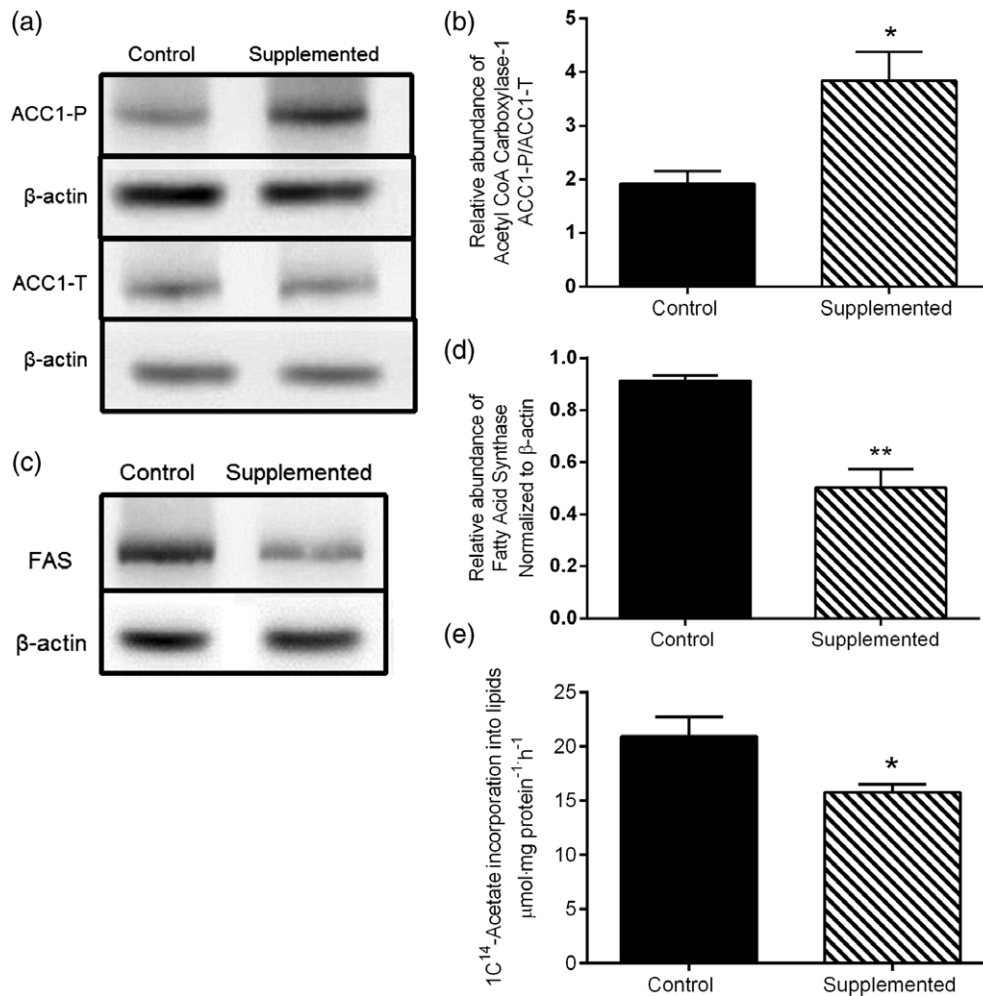


FIG 2

Effects of biotin supplementation on fatty acid lipogenic enzymes and on synthesis rate. 3T3-L1 adipocytes were cultured in biotin-control media or 1 μ M of biotin for 8 days. (a) Representative western blot analysis of: total and ⁵⁷⁹-phosphorylated acetyl CoA carboxylase-1; and β -actin protein abundance. (b) Quantification of ⁵⁷⁹-phosphorylated acetyl-CoA carboxylase-1 protein mass normalized to total acetyl CoA carboxylase-1 expression levels. (c) Representative Western blot analysis of FAS and β -actin protein abundance. (d) Quantification of FAS protein mass normalized to β -actin. (e) Incorporation of [¹⁴C]-acetate into total lipids from three independent experiments each performed in 3–4 replicates. Graph data are the means \pm SE of values from three independent experiments (* $P < 0.05$) (** $P \leq 0.005$).

of ¹⁴C-acetate compared to the control cells (control: 20.92 ± 1.79 ; biotin-supplemented: 15.79 ± 0.70 μ mol·mg protein⁻¹·hr⁻¹).

3.3. Effect of biotin supplementation on fatty acid oxidation regulatory proteins: ACC-2, peroxisome proliferator activated receptor alpha, and carnitine-palmitoyltransferase-1

Effect of biotin supplementation on ACC-2

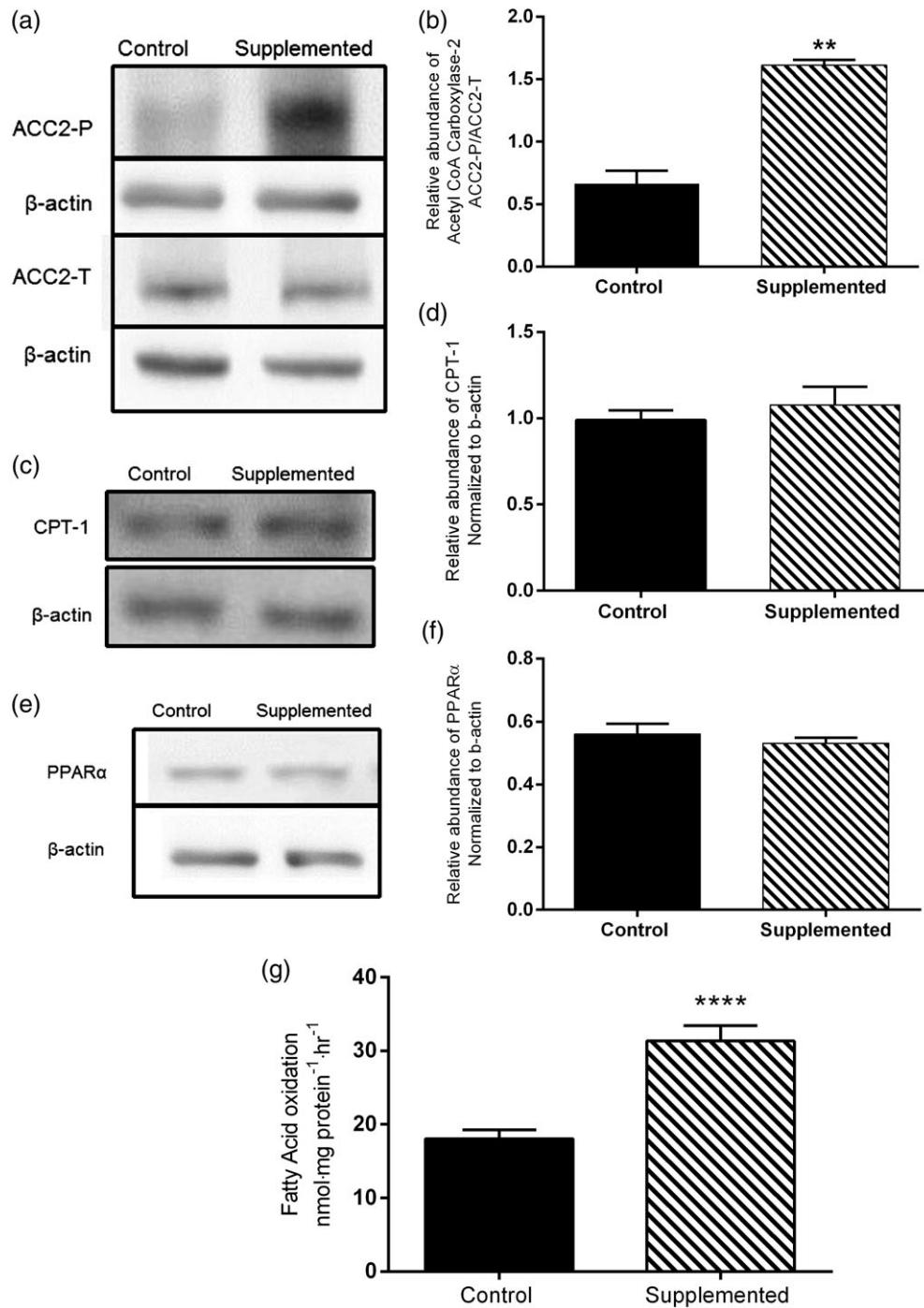
The data revealed that biotin supplementation in 3T3-L1 adipocytes increased the level of phosphorylation of ^{S212}-ACC-2 by 1.5-fold (control: 0.66 ± 0.11 ; biotin-supplemented: 1.61 ± 0.04 ; $P \leq 0.005$) without modifying the total abundance of ACC-2 or β -actin (Fig. 3a and b).

Effect of biotin supplementation on carnitine palmitoyltransferase-1.

We also investigated the protein levels of CPT-1, an enzyme that plays a regulatory role in fatty acid oxidation in association with ACC-2 in the outer mitochondrial membrane [28]. As shown in Fig. 3c and d, no change was observed in the expression of the protein levels of CPT-1 compared to control cells (control: 1.04 ± 0.03 ; biotin-supplemented: 1.01 ± 0.08).

Effect of biotin supplementation on peroxisome proliferator activated receptor alpha.

The activation of PPAR α transcription factor in the liver and adipocytes increases fatty acid oxidation [29,30]. The results showed no difference in their protein levels between groups


FIG 3

Effects of biotin supplementation on fatty acid oxidation proteins and on oxidation rate. 3T3-L1 adipose cells were cultured in biotin-control media or 1 μM of biotin for 8 days. (a) Representative western blot analysis of protein expression of total and ^{S212}-phosphorylated acetyl CoA carboxylase-2; (b) Quantification of ^{S212}-phosphorylated acetyl CoA carboxylase-2 protein mass normalized to total acetyl CoA carboxylase-2 expression levels. (c) Representative western blot analysis of protein expression of CPT-1 and β -actin. (d) Quantification of CPT-1 protein mass normalized to β -actin. (e) Representative western blot analysis of protein expression of PPAR α and β -actin. (f) Quantification of PPAR α normalized to β -actin. (g) Fatty acid oxidation rate from three independent experiments each performed in 3–4 replicates. Graph data are the means \pm SE of values from three independent experiments. **P \leq 0.005; ****P \leq 0.0001.

(control: 0.56 ± 0.03 ; biotin-supplemented: 0.53 ± 0.01), as shown in Fig. 3e and f.

3.4. Effect of biotin supplementation on fatty acid oxidation rate

We next assessed whether the biotin-induced inhibition of ACC-2 translates into increased in fatty acid oxidation [31]. To do so, we determined the rate of fatty oxidation. Biotin-supplemented adipocytes showed an increase of about 73% in the oxidation rate of ^{14}C -palmitate compared to the control cells (control: 18.1 ± 1.18 ; biotin-supplemented: 31.3 ± 2.06 nmol-mg protein $^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) (Fig. 3g).

3.5. Effect of biotin supplementation on fatty acid uptake and fatty acid transport-associated proteins

Effect of biotin supplementation on fatty acid uptake

Fatty acid uptake was determined by measuring ^{14}C -palmitate incorporation into the total lipid fraction (Fig. 4a). The data

revealed that the fatty acid uptake rate increased by 37% in 3T3-L1 adipocytes supplemented with $1 \mu\text{M}$ of biotin compared with the control group (control: 3.16 ± 0.27 ; biotin-supplemented: 4.35 ± 0.48 $\mu\text{mol}\cdot\text{mg protein}^{-1}\cdot\text{hr}^{-1}$).

Effect of biotin supplementation on fatty acid transport-associated proteins.

To examine the molecular mechanisms involved in the increase of fatty acid uptake, we investigated the mRNA expression of the fatty acid transport proteins: *Slc27a1* (also called *Fatp1*), *Slc27a4* (also called: *Fatp4*), *Acs11*; a member of the long-chain fatty acid coenzyme A ligase, and fatty acid translocase *Cd36*. As shown in Fig. 4b, biotin supplementation increased the abundance of *Fatp1* and *Acs11* mRNA by about 50% and 75%, respectively. No effects were observed on the expression of *Fatp4* or *Cd36* mRNA (Fig. 4b).

3.6. Effect of biotin supplementation on triglyceride and LD content

Despite the increase in acute radiolabeled palmitate incorporation into the total lipid fraction, we found that triglyceride accumulation remained unchanged between the control cells and the biotin-treated adipocytes (control: 743 ± 23.7 ; biotin-supplemented: 734 ± 19.6 $\mu\text{g triglyceride}\cdot\text{mg protein}^{-1}$) (Fig. 5a, b and c). The lipid droplet area (LD) analysis (Fig. 5d) revealed that the mean size of the biotin-supplemented adipocytes was smaller than that of the control cells (control: 13.62 ± 0.34 ; biotin-supplemented: 10.20 ± 0.26 μm^2). In the biotin-supplemented cells the frequency distribution of droplet size revealed an increased number of LDs with the smallest areas ($0.1\text{--}9.9 \mu\text{m}^2$) and a decrease in droplets with areas of $30.0\text{--}100.0 \mu\text{m}^2$ (Fig. 5e). In contrast, the biotin-treated adipocytes exhibited 17% more LDs number per section (Fig. 5f).

3.7. Effect of AMPK inhibition on triglyceride content

The contradictory effects found between increased palmitate incorporation into total lipid fraction and unchanged triglyceride accumulation might be explained by the co-occurrence with a decreased of *de novo* lipogenesis and increased fatty acid oxidation produced by biotin, which are two processes that are regulated by AMPK [32,33]. To test this hypothesis, we analyzed the results of AMPK blocking on the triglyceride content. In the presence of the AMPK inhibitor Compound C, an increase in the triglyceride content was observed in the biotin-treated adipocytes (control plus vehicle: $1,344 \pm 80.8$; control plus Compound C: $1,338 \pm 41.2$; biotin-supplemented plus vehicle: $1,260 \pm 108$; biotin-supplemented plus Compound C: $2,507 \pm 115$ $\mu\text{g triglyceride}\cdot\text{mg protein}^{-1}$). These results suggest that the effects of biotin on AMPK-regulated pathways affect the triglyceride content of adipose cells, but other AMPK-independent pathways could account for the triglyceride content of 3T3-L1 adipocytes.

3.8. Effect of biotin supplementation on glycerol-3-phosphate acyltransferase-3

Four isoforms of glycerol-3-phosphate acyltransferase initiate the synthesis of glycerolipids. GPAT-3 is a major contributor to

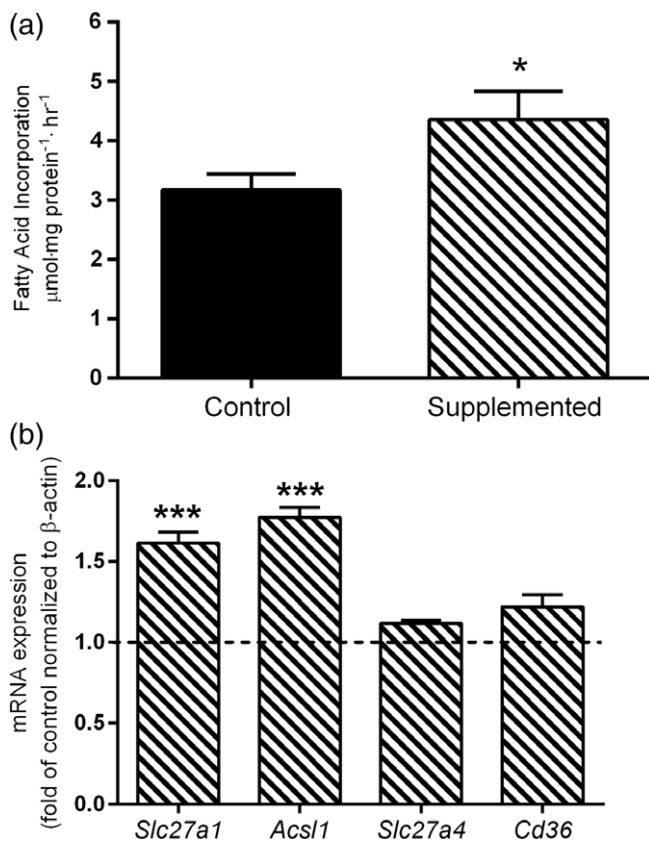


FIG 4

Effects of biotin supplementation on fatty acid incorporation and *Slc27a1*, *Acs11*, *Slc27a4*, and *Cd36* transport-associated proteins mRNA levels. 3T3-L1 adipocytes were cultured in biotin-control media or $1 \mu\text{M}$ of biotin for 8 days. (a) [^{14}C]-palmitate incorporation into total lipids three independent experiments, each performed in 3–4 replicates. (b) Quantification of *Slc27a1*, *Acs11*, *Slc27a4*, and *Cd36* mRNA levels presented as fold-changes for biotin-supplemented cells relative to control values (dashed line). Graph data are the means \pm SE of values from three independent experiments. * $P \leq 0.05$; *** $P \leq 0.001$.

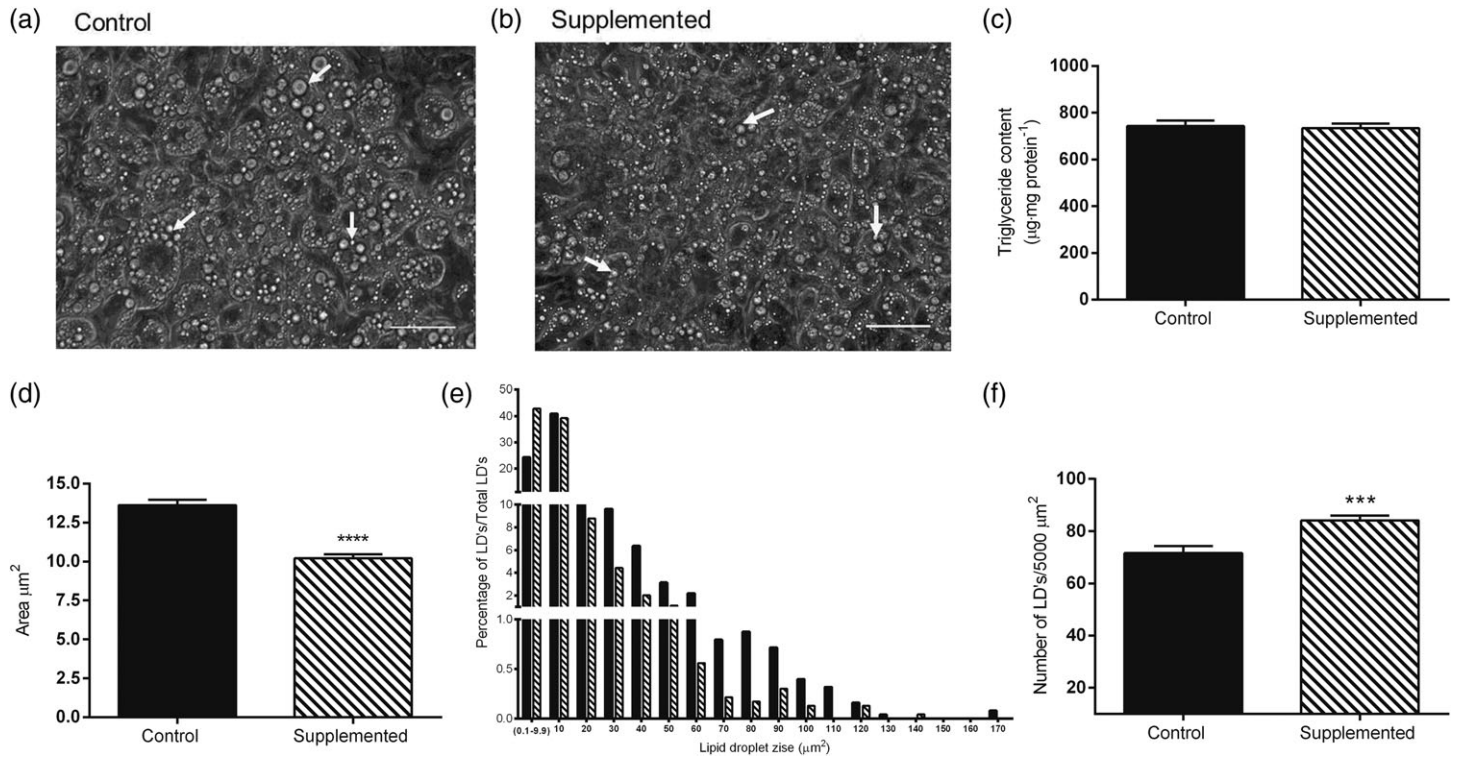


FIG 5 Effects of biotin supplementation on adipocyte morphology and triglyceride content. 3T3-L1 adipocytes treated with biotin-control media or 1 μM of biotin for 8 days. Upper panel. Representative photographs of adipocytes 3T3-L1 morphology: control (a) and biotin-supplemented (b). The arrows indicate lipid droplets. The scale bar corresponds to 50 μm . (c) Quantification of triglyceride content. Graph data are the means \pm SE of values from three independent experiments, each performed in duplicate. Lower panel: Lipid droplet (LD) morphometry: (d) Average droplet area. (e) Frequency distribution of droplet size expressed as a percentage of the total number of droplets. (f) Average number. Control cells (black bars), biotin-supplemented cells (dashed bars). Graph data are the means \pm SE of values for $n = 2182$ (control) and $n = 2322$ (biotin-supplemented) lipid droplets. *** $P \leq 0.001$; **** $P \leq 0.0001$.

the activity of glycerol transferase in 3T3-L1 adipocytes [34]. We determined the effect of biotin supplementation on the expression of GPAT-3 protein. As shown in Fig. 6a and b, the biotin-supplemented cells showed a significant increase in GPAT-3 expression (control: 0.56 ± 0.03 ; biotin-supplemented: 0.89 ± 0.09).

4. Discussion

Studies have shown that pharmacological concentrations of biotin decrease free fatty acid levels in the blood [10,11]. The mechanisms of the pharmacological concentrations of biotin on fatty acid metabolism are largely unknown. In this study, we investigated the effect of biotin on different fatty acid metabolic pathways. The data revealed that biotin supplementation increased the active form of AMPK, decreased fatty acid synthesis rate, and augmented the rate of fatty acid oxidation in 3T3-L1 adipose cells, which was related to increases in the inactive form of S212 -ACC-2 without changes in the protein expressions of transcription factor PPAR α or CPT-1. There were also increases in the fatty acid incorporation into total lipids,

the mRNA expression of fatty acid transport-associated proteins *Fatp1* and *Acs11*, as well as the abundance of GPAT-3. No changes were observed in the mRNA expression of the fatty acid transporters *Cd36* or *Fatp4*.

Several studies have demonstrated that pharmacological concentrations of biotin decrease the expression of *de novo* lipogenic genes [12,14]. This effect has been seen in diabetic [14] and normal mice [12]. Previous studies revealed increased expression of the active T172 -AMPK protein levels in the liver and adipose tissue of mice fed a biotin-supplemented diet for 8 weeks after weaning [10,13]. We also observed an increase in the protein abundance of the inactive form of ACC-1 and a decrease in FAS. Similarly, in the present study, we found that pharmacological concentrations of biotin increased the abundance of the active form of AMPK in 3T3-L1 adipocytes and the protein abundance of the inactive form of ACC-1, while decreasing the amount of FAS. The results indicate that pharmacological concentrations of biotin decrease lipogenic enzymes irrespectively of the experimental model. Furthermore, we showed that the effect of biotin supplementation in lipogenic enzymes, ACC-1 and FAS translates into decreased incorporation of radiolabeled acetate in the total lipid fraction.

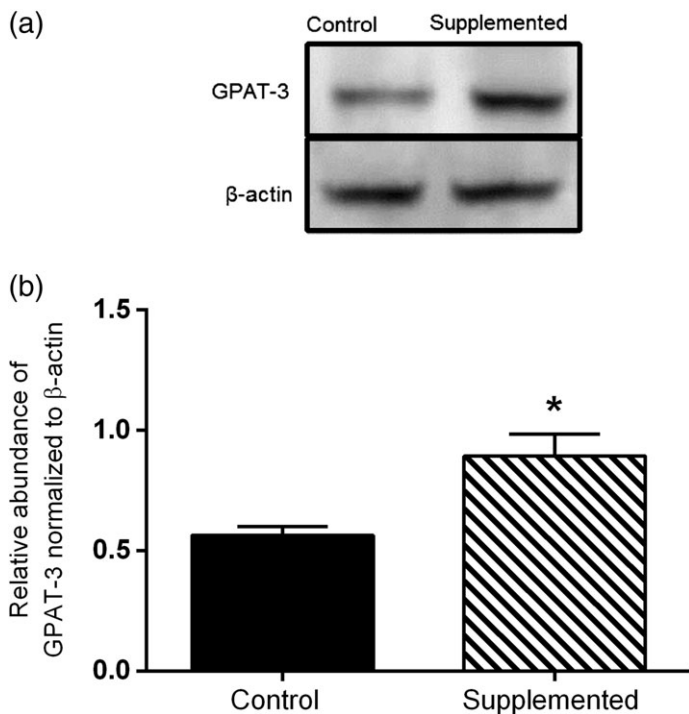


FIG 6

Effects of biotin supplementation on protein levels of glycerol-3-phosphate acyltransferase-3. 3T3-L1 cells were cultured in biotin-control media or $1 \mu\text{M}$ of biotin for 8 days. (a) Representative western blot analysis of GPAT-3 and β -actin protein mass. (b) Quantification of GPAT-3 protein mass normalized to β -actin levels. Graph data are the means \pm SE of values from three independent experiments. * $P < 0.05$.

We have demonstrated for the first time that pharmacological concentrations of biotin decrease fatty acid synthesis.

As in our prior studies on mice [10], the present study shows that biotin supplementation increase the phosphorylated inactive form of Ser^{212} -ACC-2, an enzyme that increases fatty acid oxidation [33]. In this study, we further explored the effects of biotin supplementation on other regulators of fatty acid oxidation pathway, such as the transcription factor PPAR α and CPT-1, an enzyme that is regulated by PPAR α [29]. Biotin supplementation did not affect the protein expression of either of these proteins or the total protein abundance of ACC-2. However, it did increase the rate of beta-oxidation. These data indicate that biotin-induced phosphorylation of ACC-2 is capable of translating into increased beta-oxidation. Furthermore, S^{212} -ACC-2 phosphorylation is selectively achieved by AMPK [35,36], which can regulate fatty acid oxidation [36,37]. Thus, the results suggest that biotin-induced AMPK participates in fatty acid oxidation in adipocytes.

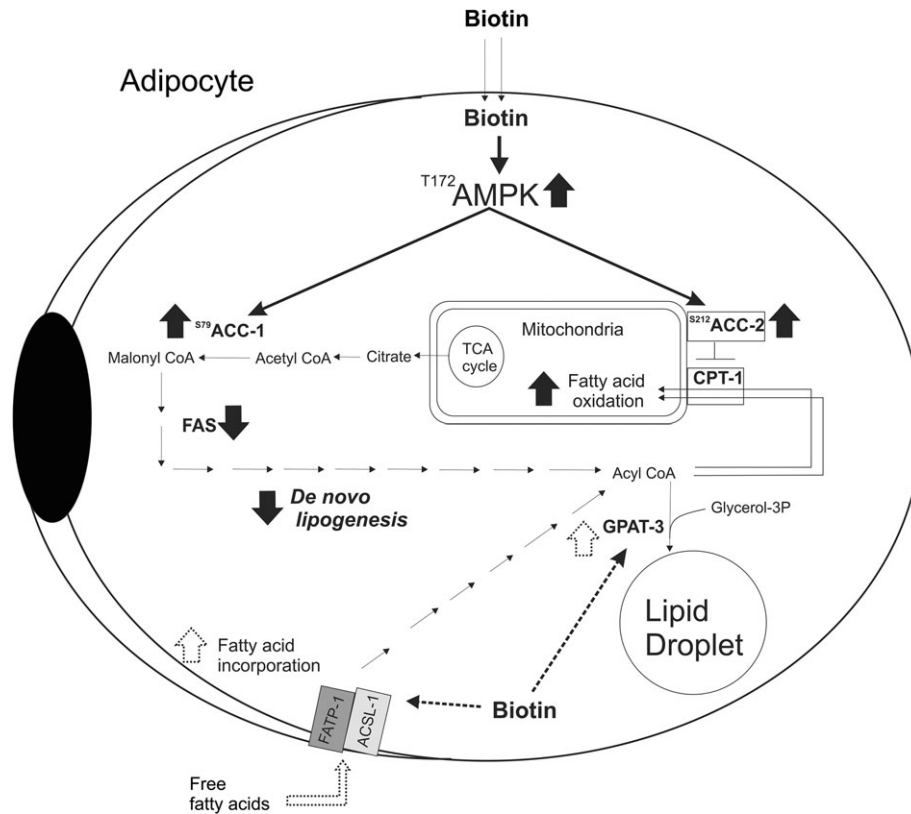
We also found that radiolabeled palmitate uptake into the lipid fraction increases in the biotin supplemented cells. This effect is associated with augmented mRNA expression of the fatty acid transport proteins *Fatp1* and *Acs11*, but not *Cd36* or *Fatp4* mRNA. FATP1 and ACSL1 are proteins that catalyze the

ATP-dependent esterification of long chain fatty acids to their acyl-CoA derivatives [38,39] that participate in fatty acid incorporation. The action of FATP1 is related to post-prandial removal of serum free fatty acid incorporation into triglyceride [40,41], and is regulated by insulin, which induces its translocation from an intracellular compartment to the plasma membranes adipose cells [40]. The over expression of fatty acid transport proteins in mammalian cells results in increased long-chain fatty acid influx [42,43]. Eight weeks of dietary biotin supplementation decreased serum free fatty acids [10] and increased post-prandial insulin release [24]. The biotin-induced increases in insulin secretion and *Fatp1* transporter suggest that adipose tissue FATP1 might be at least partially involved in the decreasing effect of biotin on serum fatty acid levels observed in prior studies. ACSL-1 is considered to be important in fatty acid activation for triacylglycerol synthesis [44]. However, studies have suggested that ACSL-1 participates in beta-oxidation [45] and in long-chain fatty acid re-acylation during lipolysis [46] and acts as an important control mechanism in fuel partitioning. Specifically designed studies will be required to determine the participation of the biotin-induced increase in ACSL-1 and FATP1 on adipocyte metabolism.

Interestingly, we found that LD area and number were modified by biotin supplementation. Lipid droplets consist of a monolayer of phospholipids, a neutral lipid core and various associated proteins that include cytoskeletal and triglyceride metabolic enzymes [47]. The size and number of LD are determined by triglyceride synthesis and catabolism and by mechanisms that involve cytoskeletal proteins [47]. We found that the expression of proteins that are present in LDs—such as FAS [48], ACSL-1 and GPAT-3 [49]—is modified by biotin supplementation and might play a role in the changes observed in the LDs. However, we cannot rule out the possibility that cytoskeletal proteins might also be affected by the vitamin; several studies have shown that pharmacological concentrations of biotin affect the cytoskeleton [50] and cell structure [51]. Furthermore, biotin influences vimentin redistribution of the nascent LD in 3T3-F442A adipocytes [48].

Obesity is characterized by the excessive accumulation of fat in the body [52]. The increased fatty acid incorporation into the total lipid fraction and increases in *Fatp1*, *Acs11*, and GPAT-3 expression might cause concern about increased lipid storage. Our study revealed that the triglyceride content is not increased in the biotin-treated adipocytes. A previous study [12] showed that the ratio of epididymal adipose weight to body weight was lower in mice fed a biotin-supplemented diet than in the control diet group. However, these studies did not assess the triglyceride content of adipose tissue or adipocyte morphology. Investigations are necessary to address the *in vivo* effects of biotin supplementation on fat deposits.

The increases in oxidation and uptake, and decreases in fatty acid synthesis observed in this study, along with changes in regulatory enzymes of these pathways observed in other studies [10,12–14] might account for the *in vivo* decrease in serum fatty acids observed with biotin administration [10,11].


FIG 7

Proposed model of pathways involved biotin-supplementation on adipocyte lipid metabolism. Biotin-supplementation increases the abundance of AMPK active form which decreases lipogenesis and raises fatty acid oxidation increasing the inactive form of acetyl CoA carboxylase-2. These changes do not translate into decreased 3T3-L1 adipocyte lipid content, possibly due to biotin-induced fatty acid incorporation rate and GPAT-3 mediated esterification. The increase observed in lipid content after AMPK inhibition suggests that fatty acid incorporation and esterification might be independent of the kinase action. Continuous line arrows: AMPK dependent pathways; dotted arrows: AMPK independent pathways.

Research is currently being done in our laboratory to analyze the effects of biotin supplementation *in vivo* on the actions studied in the present report.

Obesity and elevated serum free fatty acids are involved in metabolic syndrome [18,52,53]. The present study provides novel insights into the molecular mechanism of biotin's effects on fatty acid metabolism and adipose tissue triglyceride storage, as well as contributes to the understanding of biotin-mediated hypolipidemic effects. This research may lead to new strategies in the development of therapeutic agents for metabolic syndrome.

In summary (Fig. 7), biotin supplementation in 3T3-L1 adipocytes increased the active form of AMPK. Accordingly, the treatment modified the protein expression of the inactive form of phospho-S⁷⁹-ACC-1 and FAS; and decreased fatty acid synthesis. Furthermore, biotin-supplementation increased the fatty acid oxidation rate via phospho-S²¹²-ACC-2 without affecting the protein expression of CPT-1 and PPAR α . In addition, our data indicate that biotin supplementation increased fatty acid incorporation into the lipid fraction, fatty acid transport-associated proteins (*Fatp1* and *Acsl1*) mRNA levels, and GPAT-3 protein expression without affecting *Cd36* or *Fatp4*

mRNA levels. These actions could be mediated independently of AMPK activation.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr. Cesárea Bermúdez López and Dr. José Antonio Velázquez Aragón of the Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Pediatría. Dr. Miguel Tapia Rodríguez from the Unidad de Microscopía, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. We thank Juan Rosendo Contreras Ramos, Gustavo Adolfo Rojas Olave, Carlos Gudiño Hernández, Itzani Jiménez Ramos, Sofía Enciso Pinto and José Juan Jesús Vargas Domínguez for their technical assistance. This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 219787) and Fondos Federales 074/2013. M. en C. Ericka Moreno-Méndez is a doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, and was a recipient of fellowship CVU/Becario: 383325/255765 and Becario: 27664 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México.

Conflict of Interest

We acknowledge that the authors Moreno-Méndez Ericka, Hernández-Vázquez Alain, and Fernandez-Mejia Cristina have no financial interest or other contractual agreements that might cause conflicts of interest or be perceived as causing conflicts of interest in any company or organization sponsoring the research.

References

- [1] Zempleni, J., Wijeratne, S. S. K., and Hassan, Y. I. (2009) Biotin. *Biofactors* 35, 36–46.
- [2] Dakshinamurti, K. (2005) Biotin—a regulator of gene expression. *J. Nutr. Biochem.* 16, 419–423.
- [3] Fernandez-Mejia, C., and Lazo-de-la-Vega-Monroy, M.-L. (2011) Biological effects of pharmacological concentrations of biotin. *J. Evid. Based. Complementary Altern. Med.* 16, 40–48.
- [4] Riveron-Negrete, L., and Fernandez-Mejia, C. (2017) Pharmacological effects of biotin in animals. *Mini-Rev Med. Chem.* 17, 529–540.
- [5] Dokusova, O. K., and Krivoruchenko, I. V. (1972) The effect of biotin on the level of cholesterol in the blood of patients with atherosclerosis and essential hyperlipidemia. *Kardiologija* 12, 113.
- [6] Suchy, S. F., Rizzo, W. B., and Wolf, B. (1986) Effect of biotin deficiency and supplementation on lipid metabolism in rats: saturated fatty acids. *Am. J. Clin. Nutr.* 44, 475–480.
- [7] Revilla-Monsalve, C., Zendejas-Ruiz, I., Islas-Andrade, S., Báez-Saldaña, A., Palomino-Garibay, M. A., et al. (2006) Biotin supplementation reduces plasma triacylglycerol and VLDL in type 2 diabetic patients and in nondiabetic subjects with hypertriglyceridemia. *Biomed. Pharmacother.* 60, 182–185.
- [8] Albarracín, C., Fuqua, B., Geohas, J., Juturu, V., Finch, M. R., et al. (2007) Combination of chromium and biotin improves coronary risk factors in hypercholesterolemic type 2 diabetes mellitus: a placebo-controlled, double-blind randomized clinical trial. *J. Cardiometab. Syndr.* 2, 91–97.
- [9] Geohas, J., Daly, A., Juturu, V., Finch, M., and Komorowski, J. R. (2007) Chromium picolinate and biotin combination reduces atherogenic index of plasma in patients with type 2 diabetes mellitus: a placebo-controlled, double-blinded, randomized clinical trial. *Am. J. Med. Sci.* 333, 145–153.
- [10] Boone-Villa, D., Aguilera-Méndez, A., Miranda-Cervantes, A., and Fernandez-Mejia, C. (2015) Effects of biotin supplementation in the diet on adipose tissue cGMP concentrations, AMPK activation, lipolysis, and serum-free fatty acid levels. *J. Med. Food* 18, 1150–1156.
- [11] Sahin, K., Tuzcu, M., Orhan, C., Sahin, N., Kucuk, O., et al. (2013) Anti-diabetic activity of chromium picolinate and biotin in rats with type 2 diabetes induced by high-fat diet and streptozotocin. *Br. J. Nutr.* 110, 197–205.
- [12] Larrieta, E., Velasco, F., Vital, P., López-Aceves, T., Lazo-de-la-Vega-Monroy, M. L., et al. (2010) Pharmacological concentrations of biotin reduce serum triglycerides and the expression of lipogenic genes. *Eur. J. Pharmacol.* 644, 263–268.
- [13] Aguilera-Méndez, A., and Fernández-Mejía, C. (2012) The hypotriglyceridemic effect of biotin supplementation involves increased levels of cGMP and AMPK activation. *Biofactors* 38, 387–394.
- [14] Sugita, Y., Shirakawa, H., Sugimoto, R., Furukawa, Y., and Komai, M. (2008) Effect of biotin treatment on hepatic gene expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 1290–1298.
- [15] Davies, S. P., Sim, A. T., and Hardie, D. G. (1990) Location and function of three sites phosphorylated on rat acetyl-CoA carboxylase by the AMP-activated protein kinase. *Eur. J. Biochem.* 187, 183–190.
- [16] Boden, G. (1999) Free fatty acids, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus. *Proc. Assoc. Am. Physicians* 111, 241–248.
- [17] Capurso, C., and Capurso, A. (2012) From excess adiposity to insulin resistance: the role of free fatty acids. *Vascul. Pharmacol.* 57, 91–97.
- [18] Boden, G. (2011) Obesity, insulin resistance and free fatty acids. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 18, 139–143.
- [19] McGarry, J. D., and Dobbins, R. L. (1999) Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion. *Diabetologia* 42, 128–138.
- [20] Seghieri, M., Tricò, D., and Natali, A. (2017) The impact of triglycerides on glucose tolerance: lipotoxicity revisited. *Diabetes Metab.* 43, 314–322.
- [21] Pellegrinelli, V., Carobbio, S., and Vidal-Puig, A. (2016) Adipose tissue plasticity: how fat depots respond differently to pathophysiological cues. *Diabetologia* 59, 1075–1088.
- [22] Carobbio, S., Pellegrinelli, V., and Vidal-Puig, A. (2017) Adipose tissue function and expandability as determinants of lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Adv. Exp. Med. Biol.* 960, 161–196.
- [23] Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method. *Methods* 25, 402–408.
- [24] Lazo de la Vega-Monroy, M. L., Larrieta, E., German, M. S., Baez-Saldana, A., and Fernandez-Mejia, C. (2013) Effects of biotin supplementation in the diet on insulin secretion, islet gene expression, glucose homeostasis and beta-cell proportion. *J. Nutr. Biochem.* 24, 169–177.
- [25] Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G. H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- [26] Gauthier, M.-S., Miyoshi, H., Souza, S. C., Cacicedo, J. M., Saha, A. K., et al. (2008) AMP-activated protein kinase is activated as a consequence of lipolysis in the adipocyte. *J. Biol. Chem.* 283, 16514–16524.
- [27] Wu, W., Feng, J., Jiang, D., Zhou, X., Jiang, Q., et al. (2017) AMPK regulates lipid accumulation in skeletal muscle cells through FTO-dependent demethylation of N6-methyladenosine. *Sci. Rep.* 7, 41606.
- [28] Abu-Elheiga, L., Brinkley, W. R., Zhong, L., Chirala, S. S., Woldegiorgis, G., et al. (2000) The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 1444–1449.
- [29] Rakhshandehroo, M., Knoch, B., Müller, M., and Kersten, S. (2010) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *PPAR Res.* 2010, 1–20.
- [30] Braissant, O., Fougère, F., Scotto, C., Dauça, M., and Wahli, W. (1996) Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-α, -β, and -γ in the adult rat. *Endocrinology* 137, 354–366.
- [31] Choi, C. S., Savage, D. B., Abu-Elheiga, L., Liu, Z.-X., Kim, S., et al. (2007) Continuous fat oxidation in acetyl CoA carboxylase 2 knockout mice increases total energy expenditure, reduces fat mass, and improves insulin sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 16480–16485.
- [32] Ramnanan, C. J., McMullen, D. C., Groom, A. G., and Storey, K. B. (2010) The regulation of AMPK signaling in a natural state of profound metabolic rate depression. *Mol. Cell. Biochem.* 335, 91–105.
- [33] Smith, B. K., and Steinberg, G. R. (2017) AMP-activated protein kinase, fatty acid metabolism, and insulin sensitivity. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 20, 248–253.
- [34] Cao, J., Li, J.-L., Li, D., Tobin, J. F., and Gimeno, R. E. (2006) Molecular identification of microsomal acyl-CoA:glycerol-3-phosphate acyltransferase, a key enzyme in de novo triacylglycerol synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 19695–19700.
- [35] Munday, M. R., Campbell, D. G., Carling, D., and Hardie, D. G. (1988) Identification by amino acid sequencing of three major regulatory phosphorylation sites on rat acetyl-CoA carboxylase. *Eur. J. Biochem.* 175, 331–338.
- [36] Fullerton, M. D., Galic, S., Marcinko, K., Sikkema, S., Pulini, T., et al. (2013) Single phosphorylation sites in Acc1 and Acc2 regulate lipid homeostasis and the insulin-sensitizing effects of metformin. *Nat. Med.* 19, 1649–1654.
- [37] O'Neill, H. M., Lally, J. S., Galic, S., Thomas, M., Azizi, P. D., et al. (2014) AMPK phosphorylation of ACC2 is required for skeletal muscle fatty acid oxidation and insulin sensitivity in mice. *Diabetologia* 57, 1693–1702.
- [38] Thompson, B. R., Lobo, S., and Bernlohr, D. A. (2010) Fatty acid flux in adipocytes: the in's and out's of fat cell lipid trafficking. *Mol. Cell. Endocrinol.* 318, 24–33.
- [39] Hall, A. M., Smith, A. J., and Bernlohr, D. A. (2003) Characterization of the acyl-CoA synthetase activity of purified murine fatty acid transport protein 1. *J. Biol. Chem.* 278, 43008–43013.



- [40] Wu, Q., Ortegon, A. M., Tsang, B., Doege, H., Feingold, K. R., et al. (2006) FATP1 is an insulin-sensitive fatty acid transporter involved in diet-induced obesity. *Mol. Cell. Biol.* 26, 3455–3467.
- [41] Xu, N., Zhang, S. O., Cole, R. A., McKinney, S. A., Guo, F., et al. (2012) The FATP1-DGAT2 complex facilitates lipid droplet expansion at the ER-lipid droplet interface. *J. Cell Biol.* 198, 895–911.
- [42] Lobo, S., Wiczer, B. M., Smith, A. J., Hall, A. M., and Bernlohr, D. A. (2007) Fatty acid metabolism in adipocytes: functional analysis of fatty acid transport proteins 1 and 4. *J. Lipid Res.* 48, 609–620.
- [43] Schaffer, J. E., and Lodish, H. F. (1994) Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell* 79, 427–436.
- [44] Weiner, F. R., Smith, P. J., Wertheimer, S., and Rubin, C. S. (1991) Regulation of gene expression by insulin and tumor necrosis factor alpha in 3T3-L1 cells. Modulation of the transcription of genes encoding acyl-CoA synthetase and stearoyl-CoA desaturase-1. *J. Biol. Chem.* 266, 23525–23528.
- [45] Ellis, J. M., Li, L. O., Wu, P.-C., Koves, T. R., Ilkayeva, O., et al. (2010) Adipose acyl-CoA synthetase-1 directs fatty acids toward beta-oxidation and is required for cold thermogenesis. *Cell Metab.* 12, 53–64.
- [46] Lobo, S., Wiczer, B. M., and Bernlohr, D. A. (2009) Functional analysis of long-chain acyl-CoA synthetase 1 in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 284, 18347–18356.
- [47] Fujimoto, T., and Parton, R. G. (2011) Not just fat: the structure and function of the lipid droplet. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, a004838–a004838.
- [48] Padilla-Benavides, T., Velez-delValle, C., Marsch-Moreno, M., Castro-Muñozledo, F., and Kuri-Harcuch, W. (2016) Lipogenic enzymes complexes and cytoplasmic lipid droplet formation during adipogenesis. *J. Cell. Biochem.* 117, 2315–2326.
- [49] Brasaemle, D. L., Subramanian, V., Garcia, A., Marcinkiewicz, A., and Rothenberg, A. (2009) Perilipin a and the control of triacylglycerol metabolism. *Mol. Cell. Biochem.* 326, 15–21.
- [50] Zemleni, J., Liu, D., Teixeira Camara, D., and Cordonier, E. L. (2014) Novel roles of holocarboxylase synthetase in gene regulation and intermediary metabolism. *Nutr. Rev.* 72, 369–376.
- [51] Riverón-Negrete, L., Sicilia-Argumedo, G., Álvarez-Delgado, C., Coballase-Urrutia, E., Alcántar-Fernández, J., et al. (2016) Dietary biotin supplementation modifies hepatic morphology without changes in liver toxicity markers. *Biomed. Res. Int.* 2016, 1–9.
- [52] Bremer, A. A., Devaraj, S., Afify, A., and Jialal, I. (2011) Adipose tissue dysregulation in patients with metabolic syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96, E1782–E1788.
- [53] Moreno-Indias, I., and Tinahones, F. J. (2015) Impaired adipose tissue expandability and lipogenic capacities as ones of the main causes of metabolic disorders. *J. Diabetes Res.* 2015, 970375.