



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

AREA TEMÁTICA: BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA BIOTINA EN LA ESTEATOSIS HEPÁTICA

TESIS

QUE PRESENTA

I.B.Q. ALFONSO CHARACU RUEDA ROCHA

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIRECTOR DE TESIS: DR. ASDRÚBAL AGUILERA MÉNDEZ

Morelia, Michoacán, México. Agosto 2018.

Este trabajo se realizó en el
Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas
Laboratorio de Bioquímica de la Nutrición
Edificio B3, Ciudad Universitaria
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

La realización de la tesis fue posible gracias al apoyo de la beca
otorgada por el Consejo Nacional de la Ciencia y la Tecnología
(CONACYT) No. Becario 599244, CVU 733965

AGRADECIMIENTOS

Al Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas, por haberme albergado como estudiante.

Al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca brindada.

A mi director de Tesis el Dr. Asdrúbal Aguilera Méndez por recibirme en su Laboratorio, por darme la oportunidad de ser parte de su equipo y por la gran orientación en mi formación.

A los miembros de mi comité tutorial: el Dr. Rafael Salgado Garciglia, Dra. Patricia Ríos Chávez, Dr. Renato Nieto Aguilar y Dr. Daniel Godínez Hernández por su invaluable apoyo y asesoría.

Agradezco también al Dr. Héctor Eduardo Martínez Flores, Dra. Clotilde Guajardo López y MC. Blanca Nateras por su asesoría y su valiosa ayuda.

Al Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas en especial al personal del Bioterio y laboratorios que me brindaron apoyo para la realización del presente trabajo.

A mis compañeros del laboratorio: María G. Hernández Equihua y Ricardo Espino García por su colaboración en el desarrollo de este proyecto.

Un especial agradecimiento a mi familia, en particular a mi esposa Araceli e hijos; Ana Catalina, Alfonso Manuel y Juan Miguel por su gran apoyo, comprensión y amor son mi mayor inspiración, a mis padres Silvino y Catalina ejemplos de trabajo y superación a seguir, a mis hermanos Cristina y Aniceto por sus buenos consejos.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	6
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
1.-INTRODUCCIÓN	11
1.1.-Síndrome metabólico	11
1.1.1.-Componentes del síndrome metabólico	12
1.1.1.1.-Resistencia a la insulina	13
1.1.1.2.-Obesidad	15
1.1.1.3.-Dislipidemia	16
1.1.1.4.-Hipertensión	17
1.1.1.5.-Higado Graso	18
1.1.2.-Prevalencia del síndrome metabólico	19
1.2.-El Hígado	20
1.2.1.-Funciones	20
1.2.1.1.-Metabolismo de carbohidratos	20
1.2.1.2.-Metabolismo de lípidos	21
1.2.2.-Fisiología	21
1.2.3.-Esteatosis hepática	23
1.2.3.1.-Teoría del doble impacto	27
1.2.3.2.-Epidemiología	30
1.2.3.3.-Manifestaciones clínicas y diagnóstico	32
1.2.3.4.-Tratamiento farmacológico	33
1.3.-Fructosa	36
1.3.1.-Metabolismo de la fructosa	37
1.3.2.-Uso de la fructosa en modelos animales para producir NAFLD	39
1.4.-Biotecnología alimentaria y nutraceuticos	41
1.5.-Vitaminas en el tratamiento de enfermedades	43
1.5.1.-Biotina	44
1.5.2.-Función de la biotina	46
1.5.3.-Ciclo de la biotina	48
1.5.4.-Biotina en el metabolismo de lípidos	48
1.5.5.-Efecto de la biotina en la expresión de genes	50
1.5.6.-Teorías propuestas sobre el efecto de la biotina en la expresión génica	51
1.5.6.1.-Activación de la guanilato ciclasa soluble	51
1.5.6.2.-Biotinilación de Histonas	52

2.-ANTECEDENTES DIRECTOS	54
2.1.-Planteamiento del problema.....	55
3.-JUSTIFICACIÓN	57
4.-HIPÓTESIS	57
5.-OBJETIVOS	57
5.1.-OBJETIVO GENERAL	57
5.2.-OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	57
6.-MATERIALES Y MÉTODOS	58
6.1.-Modelo animal	58
6.2.-Solución de fructosa al 15 %.....	59
6.3.-Solución de biotina y <i>buffer</i> PBS.....	59
6.4.-Curva de tolerancia a la glucosa.....	59
6.5.-Curvas de tolerancia a la insulina.....	59
6.6.-Extracción de tejido hepático y muestras de sangre de vena porta	60
6.7.-Perfil de lípidos, triglicéridos, colesterol total, HDL y LDL	60
6.8.-Medición de glucosa y ácido úrico en suero	61
6.9.-Determinación de enzimas, ALT, AST, DHL, FA y GGT	61
6.10.-Cuantificación de triglicéridos y colesterol total en tejido hepático	61
6.11.-Cuantificación de la lipoperoxidación lipídica	62
6.12.-Cuantificación de óxido nítrico	62
6.13.-Análisis histomorfológicos	63
6.14.-Análisis estadístico	63
7.-RESULTADOS	64
7.1.-Cuantificación del consumo de agua, alimento y peso	64
7.2.-Curva de tolerancia a la glucosa.....	66
7.3.-Curva de resistencia a la insulina.....	67
7.4.-Perfil de lípidos	68
7.5.-Contenido de trigliceridos y colesterol de tejido hepático	69
7.6.-Determinación de glucosa, ácido úrico séricos y pruebas de función hepática	70
7.7.-Lipoperoxidación de tejido hepático	73
7.8.-Cuantificación de óxido nítrico de tejido hepático	74
7.9.-Análisis histomorfológicos	75
8.-DISCUSIÓN.....	77
9.-CONCLUSIONES.....	82
10.-BIBLIOGRAFÍA.....	83
11.-ANEXOS	101

ABREVIATURAS

ACC-1	Acetil-CoA carboxilasa-1
ACC-2	Acetil-CoA carboxilasa-2
AGL	Ácidos grasos libres
ALT	Amino lactato transaminasa
AMPK	Proteína cinasa activada por AMP
Apo B	Apolipoproteína B
AST	Amino aspartato transaminasa
ATP	Trifosfato de adenosina
CETP	Proteína transferidora de ésteres de colesterol
ChREBP	Proteína de unión al elemento de respuesta a hidratos de carbono
CPT1	Carnitina palmitoiltransferasa
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DM 2	Diabetes mellitus tipo 2
FAS	Ácido graso-sintasa
FFK	Fosfofructoquinasa
GCs	Guanilato ciclasa soluble
GLUT-4	Proteína transportadora-4
GLUT-5	Proteína transportadora-5
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
HCS	Holocarboxilasa sintetasa
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HFCS	Jarabe de maíz enriquecido con fructosa
HTA	Hipertensión arterial
IL-6	Interleucina-6
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
L-PK	Enzima pirúvato-quinasa
LPO	Lipoperoxidación
LXR	Receptor X hepático
MDA	Malondialdehido
NAFLD	Enfermedad de hígado graso no alcohólico
NASH	Esteatohepatitis
NCEP ATP III	Panel III del tratamiento del adulto programa nacional de educación del colesterol
OMS	Organización mundial de la salud
PAI-1	Activador del plasminógeno-1
PI3-K	Cinasa de fosfoinositol trifosfato
PKC	Proteína cinasa C
PPAR	Receptores del peroxisoma proliferante activado
RI	Resistencia a la insulina
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPI	Resistencia periférica a la insulina
SAM	S-adenosil metionina
SM	Síndrome Metabólico
SREBP-1c	Elemento regulador de esterol
IR	Receptor de insulina
TG	Triglicéridos
TNF	Factor de necrosis tumoral
UCP	Proteína desacoplante

VLDL
GGT

Lipoproteína de muy baja densidad
Gama glutamil transpeptidasa.

RESUMEN

La esteatosis hepática NAFLD, es una enfermedad caracterizada por acumulación de lípidos en el hígado y es parte del síndrome metabólico, el cual es un problema de salud pública. Las vitaminas son usadas para el tratamiento de enfermedades del síndrome metabólico; la biotina es una vitamina que, a concentraciones farmacológicas, modifica la expresión de varios genes y proteínas del metabolismo de carbohidratos y lípidos. Las ratas desarrollan NAFLD por el consumo de fructosa y son un modelo para el estudio del síndrome metabólico. El objetivo del presente trabajo fue estudiar los efectos de la biotina en la NAFLD, en un modelo de ratas alimentadas con fructosa. Ratas Wistar macho, se dividieron en 4 grupos: al primero y segundo se les dio fructosa 30% (p/v) en el agua de beber *ad libitum* por 3 meses. Al primero se le inyectó biotina (2mg/kg)/día durante el último mes de administración con fructosa y al segundo (PBS)/día. Al tercero y cuarto no se les dio fructosa. Al tercero se le inyectó biotina (2mg/kg)/día un mes y al cuarto ningún tratamiento. Se realizaron curvas de tolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina, El grupo de Fructosa-pbs presentó hiperglicemia y resistencia a la insulina y los tratados con biotina presentaron sensibilización a la glucosa y menor resistencia a la insulina; se determinaron los lípidos y transaminasas, el grupo Fructosa-pbs presentó hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia y transaminasas elevadas y los tratados con biotina disminución de la hipertrigliceridemia, transaminasas y aumento de HDL. Los triglicéridos y la liperoxidación hepáticos, en el grupo Fructosa-pbs tuvo valores altos y los tratados con Biotina disminuyeron; en los análisis histomorfológicos del hígado se observó NAFLD en el grupo Fructosa-pbs y los tratados con Biotina hubo disminución. Por lo que la biotina tiene efectos hipolipidémicos, mejorando la esteatosis hepática no alcohólica.

Palabras clave: biotina, fructosa, esteatosis hepática, síndrome metabólico.

ABSTRACT

Hepatic steatosis NAFLD is a disease characterized by accumulation of lipids in the liver and is part of the metabolic syndrome, which is a public health problem. Vitamins are used for the treatment of metabolic syndrome diseases; pharmacological concentrations of biotin modifies the expression of several genes and proteins of carbohydrate and lipid metabolism. Rats develop NAFLD due to fructose intake, which has been used as an adequate animal model for human metabolic syndrome. Therefore, the present study was designed to investigate the effect of biotin in NAFLD, in a model of rats fed with fructose. Male Wistar rats were divided into 4 groups: the first and second were given fructose 30% (w / v) in their drinking tap water *ad libitum* for 3 months. The first group was injected biotin (2mg / kg) / day during the last month of administration with fructose and the second group (PBS) / day. The third and fourth were not given fructose. The third was injected with biotin (2mg / kg) / day one month and the fourth was not treated. Glucose tolerance and insulin resistance curves were performed. Fructose-pbs group showed hyperglycemia and insulin resistance and the groups treated with biotin showed glucose sensitization and lower insulin resistance; serum lipids and transaminases were determined, where the fructose-pbs group presented hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia and elevated transaminases and those treated with biotin were decreased -hypertriglyceridemia, transaminases and were an increase in HDL. Hepatic triglycerides and liperoxidation were also measured, where the fructose-pbs group had high values and those treated with biotin decreased; in the histomorphological analyses of the liver, NAFLD was observed in the fructose-pbs group and in those treated with biotin there were a marked decrease. The results obtained suggest that biotin has hypolipidemic effects, improving non-alcoholic hepatic steatosis.

Keywords: biotin, fructose, hepatic steatosis.

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1. Síndrome metabólico.....</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.3</i>
<i>Figura 2. Componente celular del hígado.....</i>	<i>222</i>
<i>Figura 3. Histología de hígado.....</i>	<i>244</i>
<i>Figura 4. Hipótesis del doble impacto.....</i>	<i>29</i>
<i>Figura 5. Fórmula de la fructosa.....</i>	<i>366</i>
<i>Figura 6. Metabolismo de la fructosa.....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 7. Formula de la biotina.....</i>	<i>444</i>
<i>Figura 8. Ingesta diaria recomendada.....</i>	<i>445</i>
<i>Figura 9. Regulación del metabolismo lipídico.....</i>	<i>49</i>
<i>Figura 10. Activación de la guanilato ciclasa soluble.....</i>	<i>52</i>
<i>Figura 11. Consumo de agua de los grupos experimentales.....</i>	<i>64</i>
<i>Figura 12. Consumo de alimento de los grupos experimentales.....</i>	<i>65</i>
<i>Figura 13. Peso de los grupos experimentales.....</i>	<i>65</i>
<i>Figura 14. Curva de tolerancia a la glucosa.....</i>	<i>66</i>
<i>Figura 15. Curva de resistencia a la insulina.....</i>	<i>67</i>
<i>Figura 16. Perfil de lipidos.....</i>	<i>69</i>
<i>Figura 17. Trigliceridos y colesterol de tejido hepático.....</i>	<i>700</i>
<i>Figura 18. Determinación de glucosa.....</i>	<i>71</i>
<i>Figura 19. Determinación de ácido úrico.....</i>	<i>71</i>
<i>Figura 20. Transaminasa glutámico oxalacetica, transaminasa glutámico pirúvica y fostasa alcalina.....</i>	<i>72</i>
<i>Figura 21. Deshidrogenasa láctica y gama glutamil transpeptidasa.....</i>	<i>73</i>
<i>Figura 22. Lipoperoxidación.....</i>	<i>74</i>
<i>Figura 23. Óxido nítrico.....</i>	<i>75</i>
<i>Figura 24. Microfotografías histopatológicas.....</i>	<i>76</i>

1.-INTRODUCCIÓN

1.1.-Síndrome metabólico

En los últimos años ha habido un aumento exponencial de la disponibilidad de alimentos que aportan una gran cantidad de calorías, ya sea por su alto contenido de azúcares, como de grasas animal y vegetal; esto ha provocado también un aumento en las enfermedades relacionadas con el metabolismo, entre ellas tenemos la resistencia a la insulina (RI), la dislipidemia, la obesidad, la hiperglicemia, las enfermedades cardiovasculares, el hígado graso, etc. Estas enfermedades se han relacionado con el término “Síndrome Metabólico” (Vázquez, 2007; Alberti et al., 2009). El síndrome metabólico (SM) se ha convertido actualmente en un problema de salud en México y en todo el mundo, su aumento y creciente prevalencia la ha mostrado como la pandemia del siglo XXI en conjunto con las enfermedades que la conforma (Ford et al., 2010; Rojas y Aguilar, 2010), siendo desde hace mucho tiempo un tema de estudio en el área de salud, debido a la relación que tiene con las enfermedades que causan mayor mortalidad a nivel mundial (Escobedo et al., 2009; Aguilar et al., 2004).

El síndrome metabólico ha tenido varias definiciones, aunque ha sido descrito desde 1923 por el sueco Kylin y el español Marañón (Kylin, 1923; Marañón, 1922) como alteraciones metabólicas, que involucran la aparición de hipertensión, hiperglicemia, obesidad e hiperuricemia; posteriormente se ha debatido sobre el nombre, la fisiopatología y sus componentes. Vague (Vague, 1956) sugiere que la obesidad abdominal puede predisponer a la diabetes y a enfermedades cardiovasculares. Albrink y Meigs (Albrink y Meigs, 1964) mencionaron que la obesidad es un factor decisivo con la dislipidemia e hiperglucemia. Ruderman y colaboradores en 1981 señalaron la existencia de individuos metabólicamente obesos con pesos normales, caracterizados por hiperinsulinemia y posiblemente con aumento de tamaño en sus células adiposas. La primera definición fue propuesta por Reaven (Reaven, 1988) denominándolo “*síndrome X*” para describir el fenómeno en el cual los individuos presentan resistencia a la insulina e hiperinsulinemia compensatoria, niveles altos de triglicéridos y bajos de colesterol HDL e

hipertensión, los cuales significaban factores de riesgo para enfermedades cardiovasculares. Kaplan y colaboradores (Kaplan, 1989) sugirió que la asociación de obesidad central, intolerancia a la glucosa, hipertrigliceridemia e hipertensión arterial recibiera el nombre de “*el cuarteto de la muerte*”. En 1991, Serjeantson y Zimmet (Serjeantson y Zimmet, 1991) propusieron el término “síndrome X plus”, cuando además existe hiperuricemia, sedentarismo y edad avanzada. El término “*síndrome de resistencia a la insulina*” es la recomendación de DeFronzo y Ferrannini (DeFronzo y Ferrannini, 1991) y de Haffner (Haffner et al., 1992). Desde entonces varias organizaciones de salud han definido el síndrome metabólico y propuesto criterios para su diagnóstico entre ellos tenemos: En 1999 la Organización mundial de la salud (OMS) introdujo el nombre de “*Síndrome Metabólico*” basado en la resistencia a la insulina. Para 2001 El Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol para adultos Panel de tratamiento III (NCEP ATP III, por sus siglas en inglés, The National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III) de Estados Unidos de América, acuñó el nombre de síndrome metabólico a criterios propuestos que no incluían la resistencia a la insulina. Posteriormente en el 2003 la Asociación Americana de Clínicos Endocrinólogos regresó al nombre de Síndrome de Resistencia a la Insulina.

1.1.1.-Componentes del síndrome metabólico

Tomando en cuenta las definiciones, el SM tiene varios componentes para ser diagnosticado y coinciden entre sí en cuanto a los factores y enfermedades que lo componen, estas alteraciones que se presentan debido a desencadenantes genéticos, ambientales y asociados al estilo de vida, se acompañan de factores de riesgo como el sedentarismo, la alimentación rica en carbohidratos, que en conjunto aumentan el riesgo de padecer síndrome metabólico. Entre las patologías más importantes están: la resistencia a la insulina (RI), la obesidad, la dislipidemia, la hipertensión, la hiperglicemia y la esteatosis hepática (Figura 1).

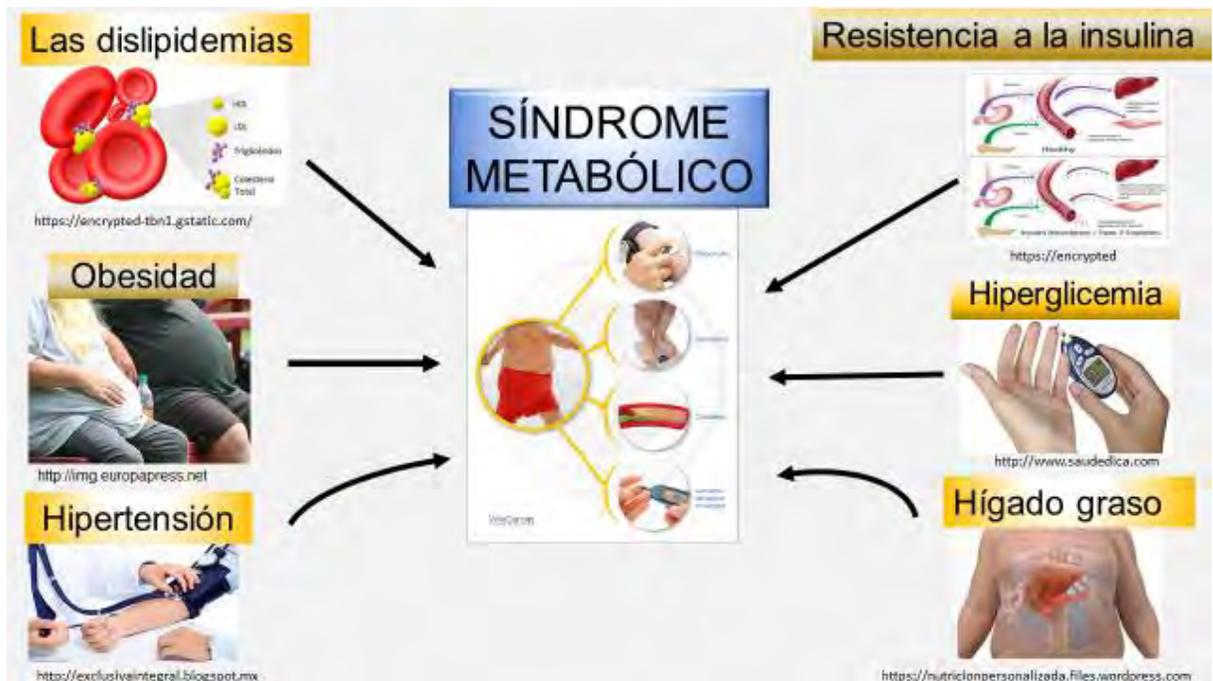


Figura 1.-Síndrome metabólico. La presencia de por lo menos tres de estas cinco alteraciones determina la presencia del síndrome metabólico.

1.1.1.1.-Resistencia a la insulina

En 1922 Banting y Best (Banting y Best, 1922), descubrieron una hormona llamada insulina a partir de páncreas de animales, Banting estudiando los trabajos de Shafer y otros sobre la enfermedad llamada diabetes, observaron que era producida por la carencia de una proteína originada en las células de los islotes de Langerhans. Posteriormente, se estableció que la principal función de la insulina es la de mantener la concentración de glucosa en sangre en un rango normal, entre 80-105 mg/dl. La insulina permite la entrada de la glucosa al tejido adiposo y músculo y en el hígado inhibe su producción. Por varios mecanismos regula el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas y promueve la división y el crecimiento celular. La insulina se libera en respuesta al ingreso de glucosa a su vez regulada por la absorción intestinal, la producción y liberación hepática de glucosa y el metabolismo de los tejidos periféricos. A partir del estudio de la diabetes y el descubrimiento de la insulina se comenzó a definir un nuevo síndrome llamado “*Síndrome X*” (Reaven,

1988), que hacía referencia a una anomalía que se presentaba en la cantidad de insulina en la sangre la cual posteriormente se le llamo “Resistencia a la Insulina” (RI). La cual se definió como la disminución de la acción de la insulina a nivel celular, lo que produce alteraciones en el metabolismo glucémico, lipídico y proteico. El mecanismo principal de resistencia a la insulina fue propuesto por Cline y colaboradores (Cline et al., 1999), donde el transporte de glucosa tiene una anomalía por defectos de la expresión de enzimas intracelulares y de la translocación de GLUT-4, por alteraciones en la actividad del receptor de insulina (IR por sus siglas en inglés Insulin Receptor), los sustratos del IR (SRI)-1 y SRI-2 y la cinasa de fosfoinositol trifosfato (PI3-K, por sus siglas en inglés). La RI puede ser de dos tipos; fisiológica (embarazo, pubertad, adulto mayor) o patológica. En el caso patológico la causa de la RI pueden ser múltiples factores, incluyendo genéticos, ambientales y secundarios a fármacos o algunas patologías específicas. La unión de la insulina a su receptor se mantiene conservada, mostrando una alteración en la señal post-receptor por efecto de los mediadores inflamatorios mencionados. Finalmente, si bien la vía “metabólica” de la acción insulínica se encuentra comprometida, la vía “anabólica”(o mitótica), donde las MAPK cinasas (por sus siglas en inglés, Mitogen-Activated Protein Kinases) juegan un rol fundamental, no está afectada, pudiendo incluso exacerbarse (Gallagher et al., 2008; Cusi, 2010; Cusi et al., 2000). La RI es parte importante de la fisiopatología de varias enfermedades como es de la diabetes mellitus tipo 2 (DM 2), la dislipidemia aterogénicas (colesterol HDL bajo, hipertrigliceridemia y partículas de colesterol LDL pequeñas y densas), la hipertensión arterial esencial (HTA), el síndrome de ovario poliquístico (SOP) y la enfermedad por hígado graso no alcohólico (NAFLD). A través del SM y el estado proinflamatorio generado por adipocinas aumenta el riesgo cardiovascular (Bloomgarden, 2011). Por último y no menos importante debemos hacer mención que RI en el músculo esquelético y en el hígado es la principal causa de hiperglucemia en el SM (Rask y Kahn, 2012).

1.1.1.2.-Obesidad

La obesidad fue considerada por muchos años símbolo de salud y fortaleza durante las primeras civilizaciones, donde la constante lucha por obtener alimentos requería tener reserva energética durante las fases de hambruna, así como en los inviernos prolongados lo que hacían necesario tener energía almacenada en el tejido adiposo. Por otra parte, el desarrollo de la agricultura, la ganadería y la conservación del alimento, la disponibilidad de alimento y la menor necesidad de actividad física, se favoreció el desarrollo de la obesidad. La obesidad es definida por la OMS como *“La acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud”*. El crecimiento del volumen del tejido adiposo es consecuencia a un consumo energético elevado por un largo tiempo. Los triglicéridos producidos o consumidos, se depositan en el citoplasma de una célula especializada para almacenar lípidos denominada adipocito. Dos son los tipos de tejido adiposo, así también de adipocitos que lo conforman; el tejido adiposo blanco, el más abundante del organismo humano adulto y de reservorio energético en forma de triglicéridos. Este tejido es un órgano productor de sustancias con acción endocrina, paracrina y autocrina (Siiteri, 1987), como son: adiposina (Flier et al., 1987), adipocinas o adipocitocinas (Sánchez et al., 2005). El tejido adiposo pardo, encargado de la termogénesis (disipación de calor), su color se debe a la gran irrigación sanguínea y a la gran cantidad de mitocondrias. También presentan a la proteína desacoplante (UCP), lo que genera disipación de energía (Ali et al., 2011; Gómez et al., 2013). Otras funciones que tiene el tejido adiposo es la fuente importante de señales moleculares que van a regular la acción de la insulina (Moreno y Martínez, 2002; Loten y Sneyd, 1970).

La patología de la obesidad se centra en varias teorías, una de ellas postula que el tejido adiposo tiene la capacidad de almacenar grasas hasta cierto límite; sin embargo, cuando este límite es sobrepasado el exceso de lípidos y triglicéridos pasa al plasma lo que provoca niveles elevados en sangre también llamada dislipidemia y por consiguiente la mayoría de los órganos tienen una gran cantidad de lípidos que

causa alteraciones metabólicas, vía toxicidad inducida por lípidos o lipotoxicidad, la cual puede también contribuir a la pérdida de las células β pancreáticas, fenómeno que ocurre en la diabetes tipo 2, así como también generar enfermedad cardiovascular e hígado graso (Kenneth, 2010; van Herpen y Schrauwen, 2008; Malhi y Gores 2008). Otra teoría propone que la obesidad es un factor de riesgo bien establecido para desarrollar resistencia a la insulina, el tejido adiposo segrega cantidades mucho más elevadas de adipocinas y citocinas proinflamatorias, como TNF- α , interleucina 6 (IL-6), resistina y visfatina, que hacen que dicho tejido se vuelva resistente a la acción de la insulina y promueven un estado proinflamatorio crónico (Pittas et al., 2004).

1.1.1.3.-Dislipidemia

La dislipidemia se define como el aumento de triglicéridos plasmático, mayor a 200 mg/dl en ayuno para el humano; el descenso de lipoproteínas de alta densidad HDL-colesterol; el aumento de la concentración de la apolipoproteína B (Apo B), que provoca un aumento de partículas aterogénicas circulantes; un aumento de las partículas lipoproteínas de baja densidad (LDL) pequeñas y densas; el aumento de la síntesis de lipoproteína de muy baja densidad VLDL y alteración del catabolismo (aclaramiento) de las lipoproteínas (Misra y Shrivastava, 2013; Ginsberg et al., 2005; Yuan et al., 2007; Vaziri, 2009). La dislipidemia se encuentra asociada a padecimientos crónicos degenerativos como diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares y otros componentes del síndrome metabólico. La dislipidemia puede ser provocada por el desarrollo de las enfermedades antes mencionadas y por herencia (Hegele, 2001). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que la resistencia a la insulina en el tejido adiposo visceral y en el hígado es la principal causa de las dislipidemias en el síndrome metabólico (Kaur, 2014), al encontrarse inducidas las tres principales fuentes de ácidos grasos, la dieta, el tejido adiposo y la síntesis *de novo* hepática. El exceso de volumen abdominal provoca un aumento de la liberación de ácidos grasos libres (AGL) que provienen de los adipocitos resistentes a la insulina y éstos ácidos migran a los principales órganos responsables de su oxidación. En el hígado la llegada de AGL se liga, además, a la

presencia de un exceso de energía por alimentación hipercalórica. Como la acumulación de AGL es citotóxica, los hepatocitos los procesan incorporándolos en lípidos complejos y oxidándolos en mitocondrias y peroxisomas (β -oxidación) y en el retículo endoplasmático (ω -oxidación) (Mannaerts et al., 2000; Reddy y Hashimoto, 2001). En ausencia de resistencia hepática a la insulina, la principal vía oxidativa de ácidos grasos, la mitocondrial, estará bloqueada por el malonil-CoA y habrá un flujo elevado de ácidos grasos hacia su incorporación en triglicéridos, ésteres de colesterol y fosfolípidos. Sin embargo, en el síndrome metabólico este mecanismo se ve alterado por la resistencia a la insulina que estimula la síntesis hepática de TG. La sobrecarga hepática de AGL induce una sobreproducción de partículas VLDL ricas en TG, lo que explica la hipertrigliceridemia. La hipertrigliceridemia aumenta la actividad de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP) que permite el intercambio de lípidos entre lipoproteínas, los TAG de las VLDL hacia las LDL y HDL en intercambio por ésteres de colesterol de estas dos lipoproteínas. En este intercambio se forman partículas de HDL y LDL ricas en TAG, que son sustrato tanto para la lipoproteína lipasa periférica como para la lipasa hepática que hidroliza sus TG, originando partículas de LDL pequeñas, densas y altamente aterogénicas y de HDL también pequeñas que son aclaradas de la circulación con mayor facilidad que sus homólogas, por lo que aumenta su catabolismo, provocando bajas concentraciones de colesterol-HDL y de la apo A (ambas antiaterogénicas) (Athiros et al., 2011).

1.1.1.4.-Hipertensión

La hipertensión (HTA) se considera un componente más del síndrome metabólico, ya que en todas las definiciones se incluye la HTA como uno de los criterios de diagnósticos del SM. La hipertensión, también conocida como tensión arterial alta, es un trastorno en el que los vasos sanguíneos tienen una tensión persistentemente alta, lo que puede dañarlos. El valor del HTA que se toma debe ser igual o mayor a 130/85 mmHg, el cual fue seleccionado luego de muchos estudios de cohortes, asociados a la mayor prevalencia de SM; además, aproximadamente el

50% de los pacientes con SM tienen HTA y el 35% de los pacientes hipertensos tiene SM (Safar et al., 2013; Pineda, 2008). Su fisiopatología es multifactorial, pero se ha demostrado que influyen principalmente en su etiología la resistencia a la insulina, la hiperglucemia, la alteración del metabolismo hepático y la obesidad. Estas patologías son las responsables de disfunción endotelial, el aumento de la actividad simpática que produce aumento de las resistencias vasculares y retención de sodio por el riñón entre otras (Kaur, 2014). Son varios los mecanismos propuestos para explicar el HTA en el SM; sin embargo, los de mayor importancia y que han sido demostrados son los ligados a la hiperglicemia y la hiperinsulinemia, las cuales activan el sistema renina-angiotensina que incrementan la expresión de angiotensinógeno, de angiotensina II y del receptor AT1 que regulan la HTA (Ferrario, 2006), la hiperinsulinemia también aumenta la reabsorción de sodio a nivel renal, provoca desequilibrio en el balance óxido nítrico/endotelina I en las células del endotelio vascular provocando disfunción endotelial y aumento de endotelina tipo I que produce vasoconstricción (Hitomi et al., 2007; Leopoldo, 2007), esto forma resistencia vascular periférica sanguínea. Estos mecanismos se presentan también en la resistencia a la insulina como en la obesidad.

1.1.1.5.-Hígado Graso

Una enfermedad que en las primeras definiciones del SM no se tomó en cuenta pero que en los últimos años ha tomado gran importancia por la gran prevalencia que se ha descubierto y que se está asociando al SM es el Hígado Graso no Alcohólico o también definido como Esteatosis Hepática (**NAFLD**, por sus siglas en inglés, *Nonalcoholic Fatty Liver Disease*). Aunque fue descrito desde el año 1958 por Westwater y Fainer (Westwater y Fainer, 1958), no fue hasta 1999 que fue definida por la OMS, siendo descrita por Marceau (Marceau et al., 1999) como un componente más del SM.

1.1.2.-Prevalencia del síndrome metabólico

A nivel mundial la prevalencia del SM va a variar dependiendo de los criterios utilizados y también de factores como género, edad, etnia, pero a nivel mundial se ubica entre 7 % a 84 % (Shin et al., 2013), siendo mayor en la población de origen hispano (Ford et al., 2002) mientras que en México se han reportado cifras entre el 13 % al 60 % (Rojas et al., 2010). La prevalencia del síndrome metabólico aumenta muy especialmente a medida que aumenta el índice de masa corporal. Los hombres y mujeres con sobrepeso tienen un riesgo de 6 y 5,5 veces mayor de cumplir los criterios de SM en comparación con los individuos con peso normal (Kassi et al., 2011). Un estudio realizado recientemente en México donde se estudiaron 417 pacientes (170 hombres y 247 mujeres) obtuvieron que 105 pacientes padecían DM +HTA, la frecuencia del SM fue de 80%. Más del 90% presentaron sobrepeso, 80% con HTA descontrolada, 70% obesidad central, 40% tuvieron cifras de glucosa mayores de 180mg/dL, 30% con hiperlipidemia. La frecuencia del SM de 87 pacientes sin DM e HTA fue de 28.2% y más del 90% presentaron sobrepeso (Trujillo et al., 2017). Los componentes del SM en orden descendente fueron obesidad central, hipertrigliceridemia, colesterol-HDL disminuido, hiperglicemia e hipertensión, por lo anterior una gran proporción de mexicanos presenta SM, el cual es considerado como predictor de diabetes tipo 2 y enfermedad cardiovascular, dos de las principales causas de mortalidad en población adulta en México.

1.2.-El Hígado

1.2.1.-Funciones

El hígado es el órgano más grande del organismo humano aproximadamente el 2% del peso corporal total, realiza una gran cantidad de funciones, regula, distribuye, recicla y almacena nutrientes para que otros tejidos los usen, por lo que se involucra en la mayoría de los procesos metabólicos del organismo, por citar los más importantes como el metabolismo de los carbohidratos, lípidos, proteínas, etc. Otras funciones importantes son las relacionadas con la vascularidad, el catabolismo de hormonas, el sistema inmune, la función excretora y secretora de múltiples compuestos entre ellos, los factores de coagulación, la síntesis de urea, de proteínas plasmáticas, almacenamiento de vitaminas, metales y la detoxificación, ya sea de compuestos resultantes del propio metabolismo celular, como de aquellos ajenos al organismo con los que entra en contacto a través de los alimentos o el medio ambiente (Koeppen y Stanton, 2017; Kasper et al., 2015).

1.2.1.1.-Metabolismo de carbohidratos

El hígado es el principal responsable de la homeostasia de los carbohidratos, y de mantener la glucemia regulada, consumiendo, almacenando y produciendo glucosa (glucogenolisis/génesis). Los azúcares ingeridos en la dieta en forma de polisacáridos (almidón) o como disacáridos (sacarosa, lactosa), se transforman por medio de enzimas en monosacáridos (glucosa, fructosa, galactosa, ribosa), llegando al hígado por la vena porta, donde los hepatocitos metabolizan cerca de 50% de la ingesta, para formar glucógeno. Este proceso es mediado por la insulina y permite almacenar una cantidad limitada de glucógeno (10% del peso del hígado) y por la otra, gracias a su rápida respuesta a estímulos hormonales puede movilizar el glucógeno. Por otra parte, cuando se satura el sistema de almacenamiento de glúcidos se forman ácidos grasos a partir de la glucosa (lipogénesis). Así mismo, en ausencia de glucosa cuando los niveles son muy bajos, el hígado es capaz de transformar los aminoácidos y los lípidos en glucógeno (glucogenogénesis) y usarlo

para producir glucosa y regular la glucemia (Newsholme y Start, 1973; Ashmore et al., 1956; Jungermann y Thurman, 1992).

1.2.1.2.-Metabolismo de lípidos

El hígado interviene en el metabolismo de lípidos tanto en funciones excretoras, de síntesis, degradación y captación. Estas características permiten que un organismo pueda tanto almacenar como producir energía y tener siempre disponible para cuando así lo requiera. Por medio de la lipólisis en el tejido adiposo ocurre la degradación de triglicéridos en glicerol y ácidos grasos libres que llegan al hígado y sirven para la síntesis de triglicéridos, que posteriormente pueden ser excretados en forma de lipoproteínas. Otra función es la lipogénesis o síntesis de ácidos grasos a partir de acetil coenzima A y de triglicéridos a partir de ácidos grasos y glicerolfosfato. Por otra parte, la β -oxidación de los ácidos grasos proporciona a los hepatocitos el suministro de energía que éstos necesitan para el desarrollo de sus funciones sintéticas. Cabe mencionar que el hígado es el principal órgano de síntesis del colesterol, que se destina a la formación de la estructura de las membranas celulares (Frimmer y Ziegler, 1988)

1.2.2.-Fisiología

La unidad funcional básica es el “lobulillo hepático”, una estructura cilíndrica de varios milímetros de longitud, que se constituye alrededor de una vena central o centrolobulillar que desemboca en las venas hepáticas y luego en la vena cava (Figura 2). Los lóbulos están unidos por un tejido areolar extremadamente fino en el cual se ramifican la vena porta, la arteria hepática, las venas hepáticas, conductos linfáticos y nervios, estando todo el conjunto revestido por una túnica fibrosa y una serosa. El lobulillo se compone en esencia de múltiples placas de células llamadas hepatocitos que se disponen en forma de cordones unicelulares o trabéculas entre los sinusoides (planos ramificados, ubicados entre las placas hepáticas y hacia la vena central). Los hepatocitos son células poliédricas con 1 o 2 núcleos esféricos poliploides y un nucléolo prominente. Presentan el citoplasma acidófilo con cuerpos

basófilos, y son muy ricos en orgánulos. Además, en su citoplasma contienen inclusiones de glucógeno y grasa. Aparte de los hepatocitos los sinusoides venosos están conformados por otros tipos de células: las células estrelladas, o células de Ito, que tienen el papel de depósito de grasa y, principalmente de vitamina A, siendo el principal almacenador de esta vitamina (Sarem et al., 2006).

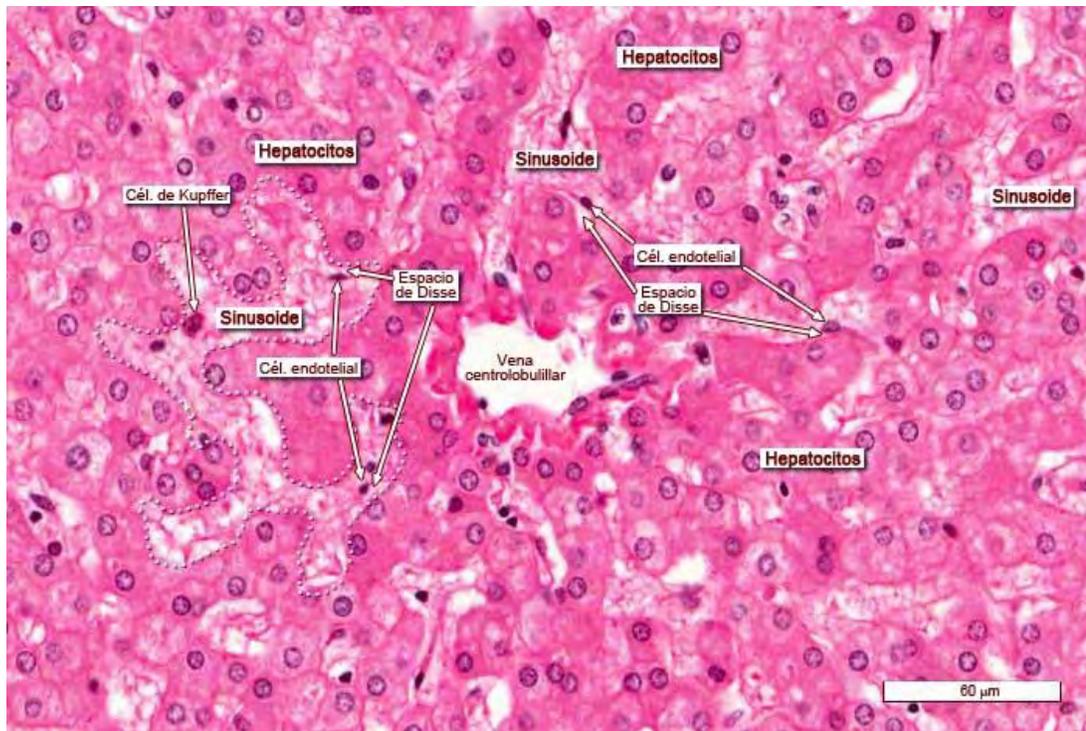


Figura 2. Componente celular del hígado. Se muestran los hepatocitos, sinusoides, células endoteliales, vena centrolubillar, espacio de Disse y las células de Kupffer (Zaragoza, 2018).

La pared de los conductos biliares está constituida por células llamadas colangiocitos, que participan en la formación de la bilis y que forman un sistema de canales por donde circula la bilis hasta llegar al intestino. Las otras células se llaman de Kupffer, son células macrofágicas, móviles, ligadas a las células endoteliales, situados en la pared de los sinusoides, tienen como función fagocitar patógenos extraños al organismo, pero también eliminan antígenos solubles circulantes, inmunocomplejos y endotoxina; intervienen en el metabolismo de los esteroides y de diversos fármacos; pueden sintetizar urea, aclarar colesterol del plasma, secretar proteasas y factores estimulantes de la leucopoyesis, así como radicales de oxígeno

activos y diversos mediadores, como interferón gama y ecosanoides (Koeppen et al., 2017; Kasper et al., 2015).

1.2.3.-Esteatosis hepática

La esteatosis hepática es una patología clínica caracterizada por un acumulo de grasa en los hepatocitos, que puede asociarse con procesos necroinflamatorios con o sin fibrosis, a la esteatosis hepática se le denomina enfermedad del hígado graso no alcohólico (**NAFLD**, por sus siglas en inglés, *Nonalcoholic Fatty Liver Disease*) y es la enfermedad hepática crónica más común (Clark, 2006; Coleman y Lee, 2004); además, es la patología hepática asociada al síndrome metabólico que con mayor frecuencia se presenta. Descrita desde el año 1958 por Westwater y Fainer (Westwater et al., 1958) y propuesta en 1980 por Ludwig y colaboradores tras encontrar esteatosis hepática en un grupo de pacientes que no consumieron alcohol (Ludwig et al., 1980; Foufelle y Ferr 2010; Marceau et al., 1999), pero con datos bioquímicos e histológicos similares con hepatitis alcohólica. La NAFLD se caracteriza histológicamente como una acumulación de lípidos macro o microvesicular mayor al 5% del peso total del hígado (Paredes et al., 2012; Tiniakos et al., 2010). La NAFLD abarca una amplia gama de alteraciones hepáticas: como esteatosis hepática simple, con pocas complicaciones, pero si no es tratada puede progresar a esteatohepatitis (NASH, por sus siglas en inglés, *Nonalcoholic Steatohepatitis*), la cual si no es controlada puede continuar a fibrosis, cirrosis y hasta cáncer (Contos y Sanyal 2002; Matteoni et al., 1999; Paredes et al., 2012).

En la esteatosis simple, se suele observar un leve infiltrado inflamatorio lobulillar o portal, con depósito de lípidos en el citoplasma del hepatocito en forma de vacuolas lipídicas de tipo microvesicular o macrovesicular, pero no hay signos de daño hepatocelular ni fibrosis (Figura 3A y 3B). El excesivo acúmulo de lípidos en el hígado se debe generalmente a un aporte aumentado de ácidos grasos no esterificados del tejido adiposo periférico, al aumento de la lipogénesis hepática *de novo* en el propio hígado, a la disminución de la oxidación grasa y a la disminución de la secreción hepática de lipoproteínas de muy baja densidad (Donnelly et al.,

2005). Esto provocado generalmente por enfermedades como la obesidad, la resistencia a la insulina, hiperlipidemia y diabetes tipo 2 (Lewis et al., 2002). Los cuerpos lipídicos son similares a las lipoproteínas en cuanto a composición y movimiento, tienen un núcleo formado por lípidos hidrofóbicos, principalmente triglicéridos (Adams y Angulo, 2006; Browning et al., 2004) y colesterol esterificado, y una monocapa de lípidos polares, fosfolípidos y colesterol libre, a la cual se asocian una serie de proteínas constitutivas y facultativas. Para conocer el estadio histológicamente de la NAFLD se han propuesto varios parámetros, entre los más usados están el propuesto por Brunt, donde se mide la extensión de la esteatosis por medio de una evaluación semicuantitativamente, dividiendo al lobulillo en tercios y diferenciando grado 1 o esteatosis leve cuando el porcentaje de hepatocitos esteatósicos oscila entre el 6 y el 32%; grado 2 o esteatosis moderada, del 33 al 66%, y grado 3 o esteatosis intensa cuando ocupa más del 66% del lobulillo hepático (Tiniakos et al., 2010).

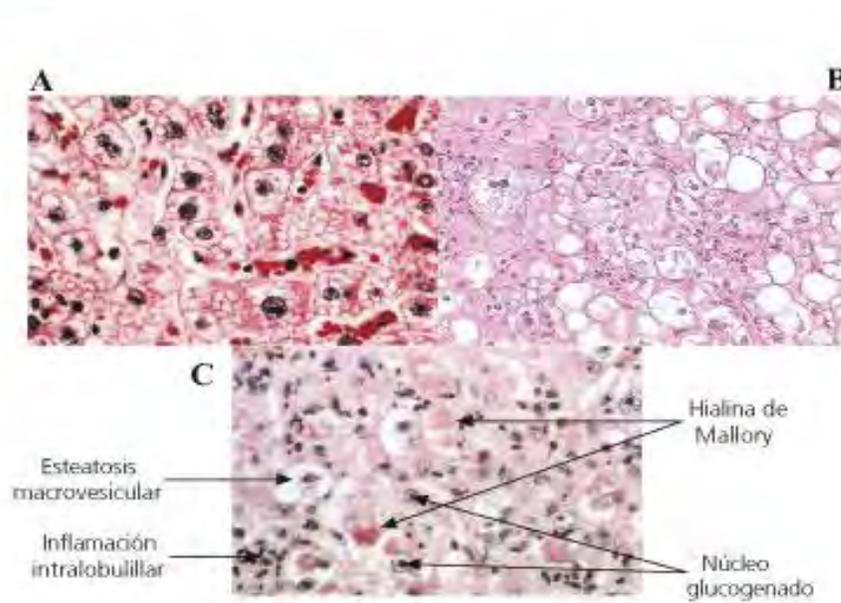


Figura 3. Histología de hígado. (A) NAFLD microvesicular, depósito de lípidos en el citoplasma del hepatocito en forma de vacuolas lipídicas, (B) NAFLD macrovesicular (C) NASH se muestran las principales alteraciones histológicas (Buque et al., 2008).

La NASH es una complicación necroinflamatoria de una esteatosis hepática crónica que se caracteriza por un depósito de lípidos en el citoplasma del hepatocito

en forma de vacuolas lipídicas de tipo microvesicular o grandes gotas de grasa macrovesicular (Haque y Sanyal, 2002; Burt et al., 1998; Ford et al., 2010), que se desplazan del núcleo hacia la periferia celular (Wei et al., 2008) Se observan también infiltrados inflamatorios de leucocitos polimorfonucleares y/o neutrófilos; además cuerpos de Hialina de Mallory, núcleos glucogénados, degeneración hepatocitaria balonzante, inflamación intralobulillar y muerte celular en aumento (Brunt et al., 1999; Diehl et al., 1988; Ludwig et al., 1997), (figura 3C). Esta inflamación crónica del hígado produce fibrosis que va en aumento, principalmente, en zonas perivenosas y perisinusoidales de la zona 3 del acino hepático (Contos et al., 2002), distorsionando la estructura hepática. Uno de los mecanismos propuestos para la patogénesis de la esteatohepatitis es la alteración en la homeostasis de los ácidos grasos, ya que son inductores del citocromo P450 2 E1 (CYP2E1). La expresión del RNA mensajero de CYP2E1 está invariablemente incrementada en el hígado de pacientes con esteatohepatitis y origina un aumento en la producción de radicales libres que inducen la lipoperoxidación de los lípidos de membrana del hepatocito y un decremento en la expresión del glutatión (Ibdah et al., 2005; Aguilera, 2018). Esta oxidación origina la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y es responsable de la progresión de esteatosis a esteatohepatitis por medio de tres posibles mecanismos: a) peroxidación lipídica; b) inducción de citocinas y/o adipocinas; c) inducción de ligandos para la vía de señalización de Fas (receptores que activan la cascada de señalización de las caspasas en la apoptosis (Attar y Van Thiel, 2013; Bugianesi, et al., 2005; Buque et al., 2008). En las etapas finales de NASH la fibrosis puede degenerar en cirrosis y hepatocarcinoma (Figura 3C).

De acuerdo a su origen la NAFLD se divide en: 1) *Primaria*, está asociada a los padecimientos del síndrome metabólico, como la obesidad, la diabetes tipo 2, la dislipidemia y la resistencia a la insulina, y se puede considerar a su vez una manifestación hepática del síndrome metabólico (Medina et al. 2013; Paschos y Paletas 2009; Souza et al. 2012; Kim y Younossi 2008). 2) *Secundaria*, incluye una causa inmediata como la cirugía yeyunoileal de *bypass*, el efecto de ciertos medicamentos (glucocorticoides, antiestrógenos), enfermedades metabólicas

(lipodistrofia, enfermedad de Weber-Christian) o por otras causas diversas (infección por el VIH, hepatotoxinas). A la esteatosis hepática se le había considerado desde su descripción como una enfermedad benigna, reversible, asintomática y con pocas complicaciones clínicas asociadas (Neuschwander y Caldwell, 2003; Cave et al., 2007; Solga y Diehl, 2003). Sin embargo, es una condición obligada para el desarrollo de la NASH. En un estudio realizado por The NASH Clinical Research Network (Tiniakos et al., 2010) concluyeron que la esteatosis microvesicular aparece en aproximadamente el 10 % de las biopsias de pacientes con NASH, conforme aumenta el grado de esteatosis, se relaciona con la inflamación lobular, la fibrosis y se establece la esteatohepatitis (Takahashi y Fukusato, 2014) (Neuschwander et al., 2003). Debido a su asociación con el síndrome metabólico, la NAFLD, se encuentra frecuentemente en pacientes con obesidad, diabetes, hiperlipidemia, hipertensión y resistencia a la insulina. Por lo anterior, también se considera una enfermedad multifactorial con una compleja fisiopatología. Además, de que los mecanismos patogénicos que dan lugar a su aparición aún no están totalmente definidos, de modo que algunos de ellos son hipótesis (Trauner et al., 2010). Una de las hipótesis con mayor aceptación es la relación entre la acumulación de lípidos en el hígado, la resistencia a la insulina en el músculo y el tejido adiposo (Puri et al. 2008; Goldenstein et al. 2013; Utzschneider y Kahn 2006; Bertolani y Marra, 2008). El deterioro en la señalización de la insulina en el tejido adiposo provoca un aumento de la lipólisis, generando así un flujo de ácidos grasos(AG) hacia el hígado que promueven la RI hepática, con el consiguiente aumento de la lipogénesis *de novo* y acumulación de triglicéridos(TG) en este (Anderson y Borlak, 2008; Postic y Girard, 2008). Sin embargo, a pesar de la estrecha correlación entre la acumulación de TG y la resistencia a la insulina, no queda claro si la resistencia es responsable de la excesiva deposición de grasa en el hígado o si el aumento en el contenido de TG es un requisito previo para la desarrollo de la resistencia a la insulina (Ferre y Fofelle, 2010; Aguilera, 2018) La esteatosis hepática puede ser el resultado entonces del desequilibrio entre el aporte y la degradación de los lípidos. Los lípidos almacenados en el tejido adiposo blanco (TAB) que fluyen al hígado como ácidos grasos libres (AGL), los sintetizados en el hígado mediante la lipogénesis *de novo* y los AG

procedentes de la dieta, son las fuentes lipídicas que, en condiciones fisiológicas, forman la grasa hepática principalmente. Después de la esterificación, los TG pueden ser almacenados como gotas lipídicas en los hepatocitos, secretados a la sangre como partículas VLDL o hidrolizados de nuevo a AG para su oxidación. Por consiguiente, la infiltración grasa del hígado puede producirse por alguna de las siguientes causas: el aumento de la cantidad de AGL que alcanzan el hígado por la porta, el incremento de la lipogénesis *de novo* y la disminución de la β -oxidación de los AG y/o de la secreción de TG en forma de VLDL (Donnelly et al., 2005).

1.2.3.1.-Teoría del doble impacto

En 1998, Day y colaboradores proponen un mecanismo que explica la patología de la esteatosis hepática, llamada “hipótesis del doble impacto” (Day y James, 1998). Esta es la más aceptada entre la comunidad científica para explicar la individualidad en la respuesta y cómo, según avanza la enfermedad se potencia la predisposición del individuo a complicaciones de la NAFLD (Neuschwander y Caldwell, 2003; Chitturi y Farrell, 2001)

En el “**PRIMER IMPACTO**”, la resistencia a la insulina induce un aumento de la lipólisis en el tejido adiposo y crea un mayor flujo de ácidos grasos libres hacia el hígado. La sobreoferta de ácidos grasos contribuye al incremento de diacilgliceridos, los cuales activan la proteína quinasa C (PKC), la cual fosforila en residuos de serina y treonina de varias proteínas intracelulares denominadas sustratos del receptor de insulina (SRI), del cual el más estudiado es el sustrato del receptor insulínico-1(IRS-1), que induce la translocación del transportador de glucosa 4 (GLUT-4) y así incrementa la captación de glucosa, disminuyendo la señalización insulínica (Ginsberg et al. 2005; Utzschneider y Kahn, 2006). En estado de insulinoresistencia se incrementa la expresión de las enzimas lipogénicas, vía la proteína de unión a esteroides SREBP, esto provoca un aumento en la reesterificación y la lipogénesis hepática *de novo*. En el NAFLD, como en otros modelos de RI, el hígado se hace resistente a la acción de la hormona, incrementando la gluconeogénesis y la

glucogenólisis (Bugianesi et al., 2005) mientras que, responde a la hiperinsulinemia aumentando la transcripción de los genes lipogénicos. El aumento en la producción de glucosa hepática acoplada a su menor captación periférica acentúa la hiperglucemia e incrementa la secreción de insulina, aumentando todavía más la lipogénesis hepática y, por ende, un aumento en la expresión de los factores transcripcionales como SREBP-1c, receptor X hepático (LXR), proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (ChREBP), receptores del peroxisoma proliferante activado (PPAR) (López et al., 2014).

La NAFLD, con sus elevadas concentraciones de ácidos grasos libres, es susceptible de un “**SEGUNDO IMPACTO**”, en el que mediante estrés oxidativo y peroxidación lipídica, a través de un hiperflujo de electrones a la cadena respiratoria mitocondrial produciría un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que sería el causante de las lesiones inflamatorias típicas de la NASH. El estrés oxidativo es un desequilibrio entre sustancias oxidantes y antioxidantes. Los principales oxidantes son el ion superóxido, el peróxido de hidrógeno y el ion hidróxilo (OH^-) que provienen de las mitocondrias, microsomas y peroxisomas y puede considerarse como una causa directa de la disfunción de las mitocondrias, puesto que interfieren con la cadena respiratoria y la integridad del DNA mitocondrial (García y Fernández, 2006). Recíprocamente, la disfunción de la cadena de la fosforilación oxidativa y del transporte de electrones puede contribuir al desarrollo de la esteatosis, al inducir la inhibición de la β -oxidación (Pessayre, 2007).

El aumento de productos de la lipoperoxidación (LPO), como el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxi-nonenal (4HNE) (Grieco et al., 2005) dañan las membranas mitocondriales permeándolas, lo que provoca que la membrana externa mitocondrial libere al citosol proteínas proapoptóticas, que inducen la muerte de los hepatocitos y favorecen el desarrollo de la inflamación y la fibrosis (Wieckowska et al., 2006). Otras proteínas que se liberan son las citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), el factor de crecimiento tumoral beta 1 (TGF- β 1), la interleucina IL-6 y IL-8 y los ligandos Fas (Carter et al., 2008). Se considera que estas citocinas producen daño hepático y perpetúan la RI y una

mayor producción de TNF- α . El TNF- α y el TGF- β 1 activan las cascadas responsables de la apoptosis (Aguilera, 2018). La interleucina 8 activa los neutrófilos y TGF- β 1 interviene en la formación de cuerpos de Mallory, la formación del infiltrado inflamatorio y la activación de las células de Kupffer y colágeno por parte de las células estrelladas (Wieckowska et al., 2006)(Figura 4).

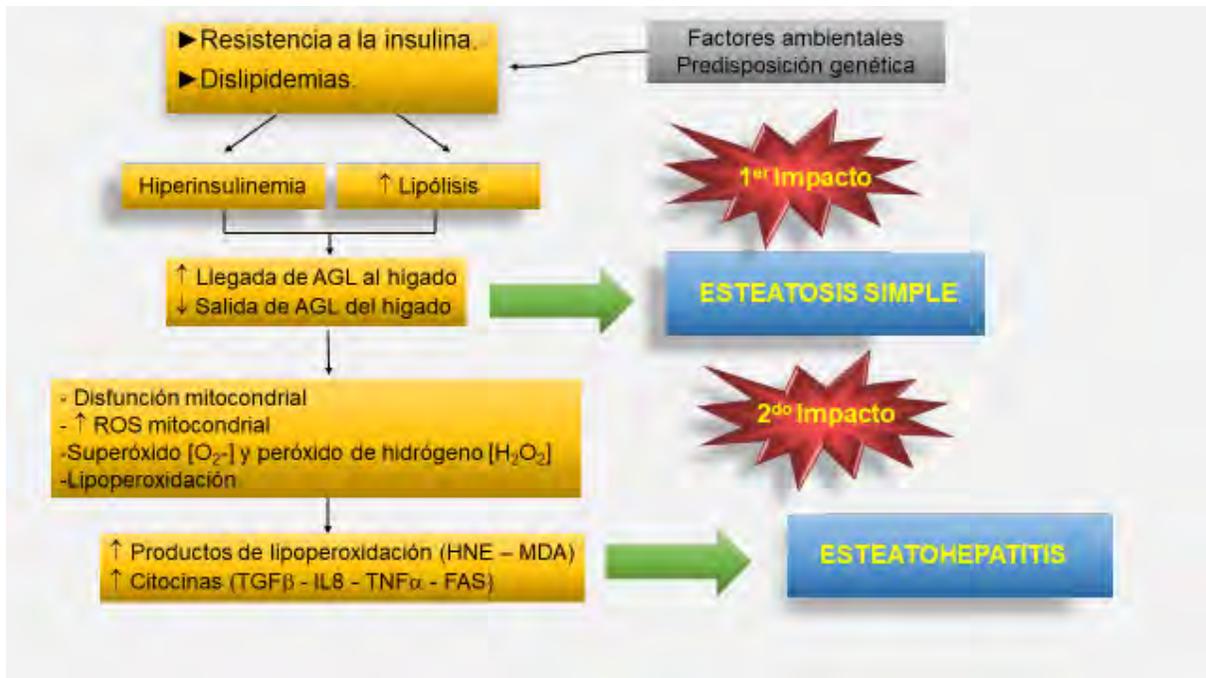


Figura 4. Hipótesis del doble impacto. Factores ambientales, así como la predisposición genética pueden ser los causantes de la resistencia a la insulina y dislipidemias, que provocan una hiperinsulinemia y aumento de la lipólisis, esto a su vez provoca que en el hígado tenga un aumento de la llegada de AGL, provocando NAFLD y a todo este proceso se le denomina primer impacto. Si esto no es controlado, la siguiente fase es la presencia de disfunción mitocondrial, aumento de ROS, entre los más importantes el superóxido y el peróxido de hidrógeno, provocando lipoperoxidación y aumento de HNE-MDA y citocinas, produciendo daño celular y esteatohepatitis, a esta fase se le denomina segundo impacto.

Los productos derivados del daño de las membranas celulares también están implicados en las lesiones de la NAFLD. Entre otros efectos disminuyen la exportación de VLDL, con acumulación de triglicéridos en el hígado, producen toxicidad directa con aumento de TNF- α , que promueven el flujo de células inflamatorias al hígado. Además, disminuyen los antioxidantes naturales tipo glutatión; inducen la formación de cuerpos de Mallory, activan a las células estrelladas (células de Ito) y la deposición de colágeno en las sinusoides hepáticos.

Todo ello induce necrosis hepatocitaria, con inflamación y fibrosis (Day et al., 1998). También el estrés oxidativo origina la liberación de catepsinas lisosomales, la disfunción mitocondrial, el estrés del retículo endoplásmico y la apoptosis celular, produciendo así la inflamación, siendo muy variable la posibilidad del hígado de recuperarse de éste (Bray et al., 2004; Wang et al., 2006; Ren et al., 2012). Esto puede resultar en muerte celular necrótica, apoptosis y conducir a esteatohepatitis y posteriormente fibrosis. Lo cual predispone fuertemente a la aparición de cirrosis y en muchos casos derivar a hepatocarcinoma (Macfarlane et al., 2011; Ratziu et al., 2002). Ozcan y colaboradores (Ozcan et al., 2004) observaron que en ratones alimentados con grasa saturada incrementa el estrés en el retículo endoplásmico de los hepatocitos y conduce a la activación de la cinasa c-Jun (JNK1), la cual es un factor importante en la inflamación y altera la señalización de la insulina (Ozcan et al., 2004). En otro estudio demostraron que una alteración en la respuesta a proteínas no plegadas participa en el desarrollo de la NAFLD (Puri et al., 2008). Existe otra hipótesis sobre la etiología de la NAFLD, la cual relaciona al incremento en la proliferación y la permeabilidad de la microbiota intestinal. Proponiendo que la endotoxemia es un factor que contribuye a la NASH, a través de la cascada del receptor-4 parecido a Toll (Machado y Cortez, 2012).

1.2.3.2.-Epidemiología

La prevalencia estimada varía de acuerdo a la población estudiada y al método usado para detectarla. El origen étnico juega una función importante en su desarrollo, siendo los hispanos el de mayor riesgo, seguido de blancos y luego afroamericanos. A pesar de que hacen falta más estudios epidemiológicos, la NAFLD es la enfermedad hepática más frecuente y la causa más común de alteraciones en las pruebas de funcionamiento hepático en Estados Unidos (Aguilera, 2018).

La NAFLD afecta tanto a niños como a adultos, pero es más prevalente en pacientes en la cuarta a sexta décadas de la vida, de género masculino, con SM y la sexta década en mujeres (Ong y Younossi, 2007). Su prevalencia en países occidentales se ha estimado entre el 20% y el 30% y en países asiáticos del 15%, y de 1.2 a 6.3%, de esteatohepatitis no alcohólica, pero podría estar subestimada ya que las aminotransferasas pueden aparecer normales en algunos individuos con la NAFLD de acuerdo con las estimaciones del National Health and Nutrition Examination Survey III de Estados Unidos (Angulo, 2007; Masuoka y Chalasani, 2013; Tsuneto et al., 2010; Williams et al., 2011). En México la prevalencia no se conoce con exactitud, pero se puede tener una aproximación a partir de la prevalencia de la obesidad y la diabetes tipo 2 (Almeda et al., 2009). Un estudio reciente de Cuevas y colaboradores (Cuevas et al., 2016) basado en la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) de 2016, reveló que casi el 72.5 % de la población (75.6% de mujeres y 69.4% de los hombres) adultos mayores de 20 años de edad es obeso. También, este estudio estima que la esteatosis se encuentra en alrededor del 25% de la población obesa. Dentro de las poblaciones obesas se ha comprobado que la prevalencia de la NAFLD aumenta con el índice de masa corporal, pues la prevalencia se incrementa conforme aumenta el IMC: dos tercios de los pacientes con IMC igual o mayor de 30 kg/m² y más de 90% de los casos con IMC mayor de 39 kg/m² padecen esteatosis (Corrado et al., 2014; Bayard et al., 2006).

También se ha observado que pacientes con NAFLD tienen algún componente del síndrome metabólico (El-Kader et al., 2015; Bugianesi, et al., 2005)

y en el 36% de ellos puede diagnosticarse este síndrome. A su vez, en los sujetos en quienes se establece el diagnóstico de síndrome metabólico el hígado graso se ha observado en proporciones variables, desde 30% hasta 74.3% (Bugianesi et al., 2005; Musso et al., 2008; Tsai et al., 2008). En estudios prospectivos se ha apreciado que el hígado graso se presenta entre cuatro y once veces más en individuos con síndrome metabólico (Centis et al., 2010).

1.2.3.3.-Manifestaciones clínicas y diagnóstico

Entre 48-100% de los pacientes con NAFLD incluyendo aquellos con NASH permanecen asintomáticos, pero algunos pueden referir dolor leve en el cuadrante superior derecho, astenia y adinamia (Masuoka et al., 2013). La exploración física puede ser normal o encontrarse datos de hepatopatía crónica o hipertensión portal, dependiendo del estadio al momento del diagnóstico, aunque no siempre es palpable y es secundaria a la obesidad. Frecuentemente, el paciente con NAFLD es diagnosticado a partir del hallazgo incidental de anomalías en estudios de laboratorio o pruebas radiológicas. Una elevación de 2 a 4 veces el límite superior normal de los niveles de ALT y AST, con o sin una relación AST/ALT menor a 1 (Palekar et al., 2006; Aguilera, 2018). La fosfatasa alcalina se encuentra ligeramente elevada en 30% de los pacientes, mientras que 25% presentan anticuerpos antinucleares positivos a títulos bajos (menores a 1:320), anti-músculo liso y entre 20 y 50% de los pacientes presentan niveles de ferritina elevados (Alisi et al., 2009). También pueden presentar los niveles de albúmina, bilirrubina y el tiempo de protrombina normales a menos que exista cirrosis, pero si es frecuente la hipertrigliceridemia. Los auto anticuerpos se han observado en el 20% de los pacientes con NAFLD; sin embargo, su presencia no parece correlacionarse con la aparición de la NASH y con su gravedad (Vuppalanchi et al., 2012). Definir claramente entre esteatosis simple y esteatohepatitis dentro de la NAFLD todavía es complicado a pesar de las nuevas tecnologías de diagnóstico. La importancia para diagnosticar NASH es crucial, debido a que estos pacientes están en riesgo alto de progresar a fibrosis y en estados avanzados a cirrosis (Vuppalanchi et al., 2012; Kleiner y Brunt, 2012; Paredes et al., 2012). La biopsia de hígado es la prueba más usada y de mayor

confiabilidad para el diagnóstico de la NASH (Tuyama y Chang, 2012), pero tiene el problema de ser muy invasivo lo que muchas veces genera complicaciones para el paciente, además de tener un elevado costo (Janes y Lindor, 1993; Aguilera, 2018).

1.2.3.4.-Tratamiento farmacológico

La NAFLD es una enfermedad multifactorial, donde interviene una compleja interacción genética, nutricional, ambiental y de estilo de vida, todos los cuales combinados forman el fenotipo de NAFLD. La NAFLD es un componente más del SM (C. Kim et al., 2008; Medina et al., 2013), la mayoría de los esfuerzos clínicos se enfocan a tratar las comorbilidades, ya que actualmente no existe un tratamiento efectivo para la NAFLD y ninguna de sus complicaciones (Conlon et al., 2013; Paredes et al., 2012; Tuyama et al., 2012; Younossi et al., 2014). El primer énfasis en el manejo del SM es modificar los factores de riesgo (FR) modificables como son la obesidad, la inactividad física y la dieta aterogénica, a través de cambios de estilo de vida. Con un efectivo cambio de estilo de vida es posible reducir todos los FR metabólicos. Aunque, si el riesgo es lo suficientemente alto habrá que considerar incorporar algún tratamiento farmacológico. Muchos estudios que evaluaron los efectos de la dieta y el ejercicio en el tratamiento de la NAFLD, en sujetos con NASH demostraron que perder peso del 3% al 7% está asociado con un decremento en la NAFLD (Attar et al., 2013; Aguilera, 2018). Sin embargo, el cambio en la alimentación y el hábito del ejercicio que a veces dependen de la edad, no siempre son permanentes por lo que muchos pacientes requieren la farmacoterapia o la cirugía. Por lo tanto, las investigaciones actuales están enfocadas en mejorar la esteatohepatitis de forma farmacológica, debido a las complicaciones que pueden tener los pacientes si no es tratada a tiempo y progresar a fibrosis, cirrosis y hepatocarcinoma (Attar et al., 2013; Masuoka et al., 2013; Nseir et al., 2012). Los agentes farmacológicos que inducen pérdida de peso han sido investigados como opciones potenciales de tratamiento (Corrado et al., 2014). El Orlistat (Zelber et al., 2006), un inhibidor de la lipasa entérica y la sibutramina (Sabuncu et al., 2003), un inhibidor de recambio de serotonina y norepinefrina, demostraron potencial produciendo una disminución en los niveles de transaminasas y una mejora en la

esteatosis. Sin embargo, en el estudio de Harrison et al (Harrison et al., 2009) el Orlistat no mejoró ni el peso ni la histología hepática (Aguilera, 2018).

Otros estudios utilizando tiazolidinedionas, agonistas de los PPAR, se observó una reducción en la NAFLD (Cernea et al., 2017) pero no disminuyen consistentemente la fibrosis (Sanyal et al., 2010; Ratziu et al., 2008; Boettcher et al., 2012). El uso de ácidos grasos poliinsaturados como los omega-3 (activan a los PPARs y a la cinasa AMPK), demostraron ser benéficos en estudios clínicos reduciendo la NAFLD y mejorando la NASH (Spadaro et al., 2008; Higuchi et al., 2008). Los ácidos grasos omega 3, usados como terapia de segunda línea para el tratamiento de la hipertrigliceridemia, han sido investigados para tratar NAFLD en animales y en humanos. Sin embargo, todavía no son recomendados para el tratamiento específico de NAFLD o NASH, pero podrían ser considerados como primera línea de tratamiento de la hipertrigliceridemia (Di Minno et al., 2012). El uso de biguanidas como la metformina en el tratamiento de la NAFLD no ha producido resultados fiables y consistentes. Un estudio reciente concluyó que no mejora las aminotransferasas o la histología de hígado (Sanyal et al., 2010; Masuoka et al., 2013). Los agentes hipolipemiantes (estatinas, fenofibratos y ezetimiba), han sido usados comúnmente para tratar las dislipidemias por lo que, en una revisión de Nseir y colegas de los últimos 32 años encontraron que, son seguros en pacientes con la NAFLD y pueden mejorarla (Nseir et al., 2012). Los efectos del estrés oxidativo asociadas a las citocinas proinflamatorias, son consideradas como desencadenantes de la esteatohepatitis (Conlon et al., 2013; Ren et al., 2012; Wang et al., 2006; Buque et al., 2008). La vitamina E (α -tocoferol) ha sido muy usado en pacientes con NASH con buenos resultados. En una investigación donde 49 individuos fueron tratados diariamente con 1000 IU de Vitamina E y 1000 mg de vitamina C, se observaron mejorías en la fibrosis (Harrison et al., 2003). La betaína (metabolito de la colina) es un antioxidante, que incrementa los niveles de la s-adenosil metionina (SAM) y disminuye el estrés oxidativo. Los niveles elevados de SAM en estudios con animales sugieren una mejora de la esteatosis (Kim et al., 2008). El estrés oxidativo provocado por el crecimiento de bacterias gastrointestinales ha sido propuesto como un factor que contribuye al desarrollo de NAFLD (Machado et al., 2012). Por lo

anterior, han sido investigados los probióticos que en un estudio donde probióticos fueron administrados a ratones con NAFLD mejoraron la histología del hígado y disminuyeron las aminotransferasas (Ford et al., 2010). Sin embargo, a pesar de la gran variedad de medicamentos hasta el momento no existe una monoterapia efectiva al cien por ciento para el tratamiento de la NAFLD (Aguilera, 2018).

1.3.-Fructosa

Los carbohidratos son uno de los tres macronutrientes básicos necesarios para mantener la vida (los otros dos son las proteínas y las grasas). Las frutas, los vegetales, los alimentos de grano y muchos productos lácteos contienen naturalmente carbohidratos en distintas cantidades, también se les denomina técnicamente azúcares a los glúcidos que generalmente tienen sabor dulce, como son los diferentes monosacáridos, disacáridos y polisacáridos. Los endulzantes más utilizados en la actualidad son: sacarosa, fructosa (Figura 5) y glucosa. En los últimos años, se ha observado un incremento notable en el uso de estos por la industrialización de los alimentos y más en particular de la fructosa, como sustancia edulcorante en muchos alimentos procesados de nuestra dieta diaria, provocando un aumento en la ingesta de calorías provenientes de este azúcar. Este fenómeno se ha relacionado con un incremento en la aparición de enfermedades como obesidad, dislipemia, hígado graso y DM 2, entre otras (Gross et al., 2004; Welsh et al., 2010). Además, la fructosa es un componente del disacárido sacarosa (conocido comúnmente como azúcar de mesa) que proviene principalmente de la caña de azúcar y la remolacha, en el cual una molécula de fructosa se encuentra unida a una molécula de glucosa.

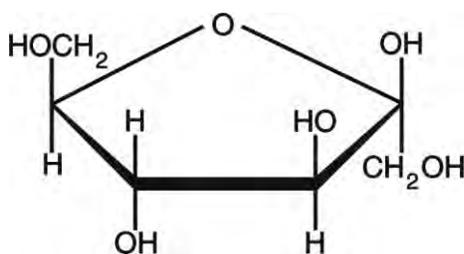


Figura 5. Fórmula de la fructosa. La fructosa, también conocida como levulosa, es un monosacárido con fórmula empírica $C_6H_{12}O_6$ que se encuentra de forma natural en la miel y en la fruta (Tom Manzano, 2018).

La fructosa, al igual que la glucosa y la sacarosa, contiene un poder calórico de 4 kcal por gramo. Sin embargo, la fructosa destaca por su elevado poder edulcorante. Estudios comparativos, en los cuales el poder edulcorante de la

sacarosa se estableció en 100, se pudo determinar que la fructosa presentaba un poder edulcorante de 173, mientras que la glucosa sólo de 74 (Bray et al., 2004). A principios de la década de los 70, cuando se empezó a introducir en la industria alimentaria un nuevo edulcorante conocido como jarabe de maíz enriquecido con fructosa (High Fructose Corn Syrup, HFCS por sus siglas en inglés), provocó a partir de entonces la presencia de fructosa en productos tales como cereales, postres, zumos, bebidas carbonatadas y jugos. El HFCS se elabora a partir de almidón de maíz, el cual es hidrolizado enzimáticamente hasta obtener moléculas de glucosa libre que, posteriormente, son convertidas a moléculas de fructosa mediante la acción del enzima glucosa isomerasa. El jarabe de fructosa, está constituido por 45% de glucosa y 55 % de fructosa, mientras la glucosa puede ser metabolizada por cualquier órgano, la fructosa solo es metabolizada por el hígado (Hein et al., 2005) En la actualidad, el HFCS ha reemplazado a la sacarosa en muchos alimentos y bebidas debido a su gran poder edulcorante, bajo costo, propiedades funcionales y estabilidad (Tappy y Le, 2010; Johnson et al., 2009).

1.3.1.-Metabolismo de la fructosa

La fructosa libre consumida como tal o presente en los alimentos, no requiere de transformación química para ser absorbida. La fructosa ingresa en la última parte del duodeno y en el yeyuno del intestino delgado (Schorin, 2005). Se absorbe al interior del enterocito por difusión facilitada a través de una proteína transportadora denominada GLUT 5, en un proceso no dependiente de sodio (Bray et al., 2004; Douard y Ferraris, 2008). Dentro del interior del enterocito, la fructosa pasa a nivel portal mediante el transportador GLUT 2, localizado en la membrana basolateral del enterocito (Tappy et al., 2010). Por medio de la vía portal, la fructosa llega al hígado y después al resto de células de los tejidos. El metabolismo de este azúcar se da principalmente en el hígado, órgano que metaboliza entre el 60-75% de la fructosa ingerida (Johnson et al., 2009; Álvarez et al., 2012). La fructosa se absorbe más despacio que la glucosa, aunque es captada y metabolizada de manera más rápida por el hígado, además de que no depende de la insulina para ser introducida a las células. En el hígado, se encuentra presente una fosfotransferasa altamente

específica para la fructosa, la fructoquinasa (FK) (cetohecoquinasa) (Johnson et al., 2009; Nelson et al., 2004), que fosforila la fructosa para producir la fructosa 1-fosfato. Debido a la baja K_m y a la elevada V_{max} que posee la FK, el metabolismo de la fructosa en el hígado es más rápido. La fructosa 1-fosfato se rompe por la acción de la aldolasa B y se convierte en gliceraldehído y dihidroxiacetona fosfato (DHAP), metabolitos intermediarios de la glicólisis (Figura 6).

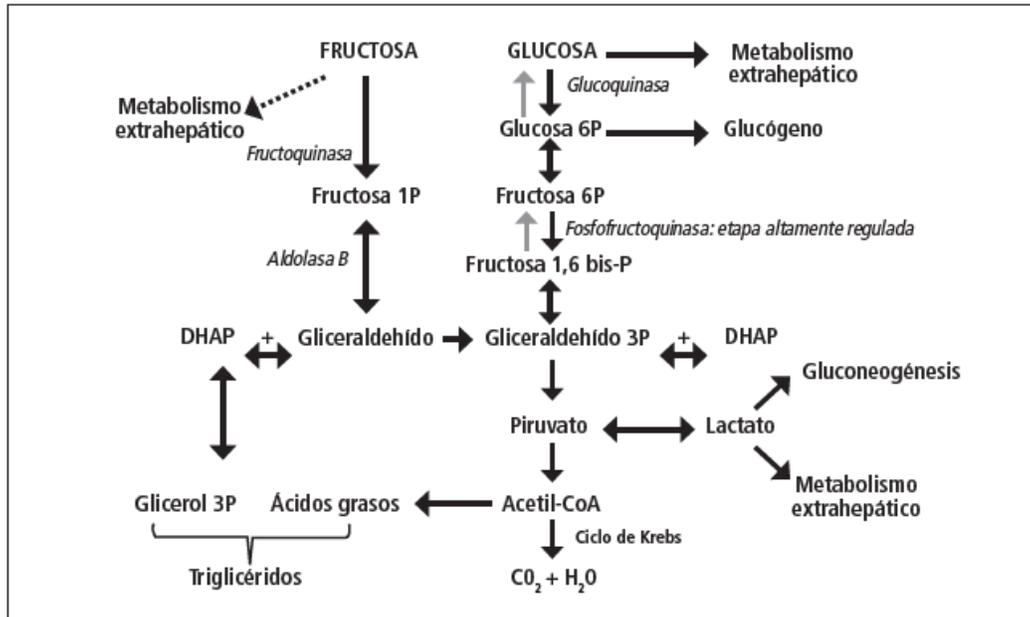


Figura 6. Metabolismo de la fructosa. La fructosa es transportada al hígado, donde es fosforilada por la enzima fructoquinasa a fructosa 1 fosfato, que se convierte en gliceraldehído 3 fosfato o dihidroxiacetona fosfato. Estas triosas fosfato podrán entrar en la vía glicolítica hasta formar piruvato y oxidarse posteriormente a Acetil CoA, la cual proporciona carbonos para la síntesis de ácidos grasos, triglicéridos y colesterol (Liliana et al., 2017).

En el hígado, la fructosa tiene dos destinos: Ambos productos se transforman por vías distintas en gliceraldehído 3-fosfato que puede seguir distintas vías: la ruta de la glucólisis transformándose en glucosa y ser almacenada como glucógeno o consumido por los hepatocitos como energía o dando lugar como productos finales al piruvato, lactato y acetilCoA, que pasa a citrato y libera ATP y CO_2 , tomando en cuenta que el ATP como el citrato ejercen regulación negativa sobre la fosfofructoquinasa (FFK), controlando la glucólisis. La otra vía parte del principio que la FK no posee mecanismos regulatorios, por lo que el gliceraldehído 3-fosfato

puede ser convertido en piruvato, provocando una gran acumulación de las triosas que sigue la vía de la síntesis de acilglicerol y acetilcoA, la cual dependiendo del estado energético puede ser oxidada para obtener energía o almacenar la energía formando ácidos grasos, fosfolípidos y triglicéridos mediante lipogénesis *de novo* (Elliott et al., 2002; Havel, 2005; Schaefer, Gleason, y Dansinger, 2009). Esta última vía se ha demostrado que es la que más se lleva a cabo en el hígado, el acetil CoA proporciona carbonos para la síntesis ácidos grasos de cadena larga, que posteriormente son esterificados para formar triglicéridos (Havel, 2005; Elliott et al., 2002).

1.3.2.-Uso de la fructosa en modelos animales para producir NAFLD

El consumo de grandes cantidades de fructosa estimulan las vías glicolíticas y lipogénicas en la célula del hígado y se ha demostrado que tanto en humanos como en animales las dietas altas en energía a partir de fructosa o sacarosa inducen a la hiperlipidemia, enfermedades cardiovasculares, la RI y la NAFLD, todos estos componentes del SM (Basciano et al., 2005; Bray et al., 2004; Elliott et al., 2002; Dekker et al., 2010). Éstos efectos no se han observado con la administración de otros carbohidratos simples como la glucosa (Tappy et al., 2010). Por otra parte, la fructosa al no estimular la secreción de insulina en la célula beta pancreática, provoca niveles menores de insulina, leptina y menor supresión de grelina, estas hormonas están relacionadas con la regulación de la saciedad lo que provoca que el consumo de fructosa en grandes cantidades tenga efecto en el aumento del apetito y no una inhibición, como si lo realiza la glucosa (Melanson et al., 2007; Lustig, 2010; Lustig, 2013; Teff et al., 2004). También se ha demostrado que el consumo de fructosa en modelos animales provoca NAFLD por lo que el uso de este modelo es actualmente usado para comprender los procesos fisiopatológicos asociados a la NAFLD, así como sus características histológicas y ensayar nuevas terapias (Ayala et al., 2008; Postic et al., 2007).

Se demostrado que la lipogénesis hepática provocada por el consumo de fructosa provoca incremento de la concentración citoplasmática de malonil-CoA, que

inhibe la entrada de ácidos grasos a la mitocondria y por consiguiente su oxidación, por lo que el incremento de los lípidos hepáticos produce la disponibilidad de ácidos grasos endógenos (Stanhope et al., 2009; Dekker et al., 2010), esto sería provocado por la disminución de la actividad de las lipasas citosólicas en el hígado y tejido adiposo (Rodrigues et al., 2016), aumentando a un más la NAFLD. Asimismo, en ratas alimentadas con una dieta alta en fructosa durante 8 semanas se observaron una reducción en la expresión de PPAR- α y de las enzimas lipo-oxidativas; en contraste a un aumento en la expresión de SREBP-1c y de las enzimas lipogénicas (Dekker et al., 2010; Nagai et al., 2009). Histopatológicamente la fructosa produjo aumento en el volumen de las gotas de lípidos en hepatocitos y en niveles séricos de triacilglicerol. Estudios realizados en ratas desarrollaron fácilmente NAFLD macro y microvesicular hepática con aumento en los triglicéridos, ALT, adiponectina, TNF-a, glucosa y obesidad (Fakhoury et al., 2015; Ross et al., 2009; Ackerman et al., 2005; Neuschwander, 2013).

Por otra parte, las dosis más apropiadas de fructosa van a depender del modelo experimental en el que se realiza y de la cepa a usar. Estudios realizados sugieren que la concentración de fructosa debe ser del 10% al 50% para obtener resultados positivos en la modificación metabólica (Thorburn et al., 1989). Sin embargo, cada laboratorio deberá ensayar su propia dieta, esto porque se ha observado que concentraciones altas disminuyen la patabilidad de la fructosa, tanto en dietas solidas como liquidas de animales en tratamiento.

1.4.-Biotecnología alimentaria y nutraceuticos

Una de las ramas que más ha evolucionado y modificado en la obtención de bienes bióticos es la Biotecnología que según el Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica define la biotecnología moderna como: *“La tecnología genética recombinante, que permite que plantas, animales y microorganismos sean genéticamente modificados con características novedosas más allá de lo que es posible mediante las técnicas de reproducción y selección tradicionales”* (Sendashonga et al., 2005). La aplicación de la biotecnología moderna a la producción de alimentos ha sido clave en el desarrollo y crecimiento de la población del ser humano y las sociedades modernas, gracias a los descubrimientos obtenidos tanto en la producción, reproducción, como la conservación de alimentos y el esfuerzo que conlleva ha favorecido la aplicación de técnicas novedosas para mayores usos de la biotecnología alimentaria.

Una de las investigaciones que recientemente presenta nuevas oportunidades y desafíos es el tratamiento de la salud a partir de la alimentación. En los últimos años se ha demostrado que varios nutrimentos de la dieta actúan regulando diversas funciones biológicas y pueden servir para el tratamiento de enfermedades. Actualmente se les denomina nutraceuticos y son objeto de varios estudios. La introducción formal del término nutraceutico fue planteada por Stephen De Felice en 1989 (Kalra, 2003) y consta simplemente de la fusión de dos elementos básicos: un componente nutricional y otro farmacéutico. Los nutraceuticos son compuestos cuyo consumo ha sido asociado con la prevención y el tratamiento de enfermedades. Como ejemplos de este tipo de compuestos están la fibra dietética insoluble y soluble, calcio, ácido fólico, fitoesteroles, proteína de soya, sorbitol, las vitaminas, etcétera. En algunos casos los compuestos son utilizados como aditivos de alimentos y son, por lo tanto, agregados en productos que inicialmente no los contenían. Actualmente existen varias clasificaciones dependiendo de su funcionalidad, origen y beneficios que proporcionan, entre las más importantes tenemos tres grupos (Rojas et al., 2015):

- Nutrientes: azúcares y grasas
- Compuestos químicos: fibras, antioxidantes, carotenos, ácidos grasos Omega 3
- Probióticos: microorganismos benéficos (lácteos).

Los principales criterios que se deben tomar en cuenta para considerar un alimento sea considerado nutracéutico son (Rojas et al., 2015):

- Productos de origen natural.
- Aislados y purificados por métodos no desnaturalizantes.
- Beneficia una o más funciones fisiológicas, en la acción preventiva y/o curativa.
- Aportar estabilidad temporal.
- Estudios reproducibles de sus propiedades bioactivas en animales de experimentación y en humanos.

Actualmente existen una gran cantidad de alimentos nutracéuticos y se siguen descubriendo más sobre todo aquellos usados en las enfermedades crónico degenerativas, esto debido a que han demostrado que pueden ser más seguros de usar por su origen natural y que además presentan propiedades farmacológicas que mejoran su asimilación en el organismo (Nasri et al., 2014). Los componentes del SM y más en particular la NAFLD son un problema de salud pública en México y a nivel mundial, por la elevada incidencia y prevalencia de éstas enfermedades lo que hace necesario el estudio sobre nutracéuticos que puedan ser utilizados para su prevención o tratamiento. Tomando en cuenta que hasta el momento no existe una monoterapia que pueda controlar la esteatosis hepática simple y aún menos la esteatohepatitis, es necesario el uso de coadyuvantes de origen natural como se ha descubierto recientemente, las vitaminas a dosis farmacológicas han demostrado propiedades importantes para el tratamiento de estas enfermedades.

1.5.-Vitaminas en el tratamiento de enfermedades

Las vitaminas son sustancias indispensables en la alimentación ya que intervienen en numerosas reacciones bioquímicas que acontecen en el organismo (Hopkins, 1912). Aunque estas sustancias no proporcionan energía al organismo, intervienen en reacciones que permiten la liberación de la energía química de los hidratos de carbono, los lípidos y las proteínas y son indispensables en la síntesis de aminoácidos, ácidos grasos, ácidos nucleicos, neurotransmisores, hormonas y numerosas sustancias indispensables para mantener la homeostasis del organismo (Voss, 1956). En los alimentos se encuentran en cantidades muy pequeñas, que van de unos cuantos microgramos hasta 200 mg por kilogramo, lo que representa desde 1/10,000 hasta 1/100,000,000 de la dieta. Sin embargo, su ausencia se acompaña de enfermedades con cuadros clínicos que pueden ser de leves a graves (Dwyer et al., 2018).

El estudio de la función y los mecanismos moleculares de las vitaminas, ha permitido el desarrollo de análogos de las vitaminas que actualmente son usados como medicamentos para el tratamiento de diversas enfermedades (Bodor y Offermanns, 2008; Cheung et al., 2012; Hinds et al., 1997), por ejemplo, derivados del ácido retinoico son usados en diversas afecciones como el cáncer, trastornos hematológicos, dermatológicos, dislipidemias, diabetes tipo 2 y tipo 1 y últimamente para el tratamiento del síndrome metabólico (Hinds et al., 1997; Rhee y Plutzky, 2012). La vitamina hidrosoluble niacina, es usada desde 1955 en el tratamiento de dislipidemias (Bodor et al., 2008), existiendo en la actualidad amplios conocimientos sobre sus mecanismos de acción, lo que ha permitido el desarrollo de fármacos y estudios para el tratamiento de aterosclerosis y la función vascular (Lee et al., 2009). Otro ejemplo es la vitamina D, estudios revelaron que las mujeres con deficiencia de vitamina D tuvieron más frecuentemente hiperglucemia, hipertensión, aumento de la circunferencia de la cintura e hipertrigliceridemia (Cheung et al., 2012; González et al., 2014), por lo que existen estudios clínicos utilizándola como agente terapéutico en el tratamiento de estas enfermedades y recientemente en el tratamiento de la esteatosis simple y la esteatohepatitis (Corrado et al., 2014).

1.5.1.-Biotina

La biotina (vitamina B7 o H), es una vitamina hidrosoluble perteneciente al complejo B, es estable al calor, soluble en agua, alcohol y susceptible a la oxidación, interviene en el metabolismo de los hidratos de carbono, grasas, aminoácidos y purinas (Figura 7). Recientemente se ha descubierto que es un regulador clave de la expresión de genes (Fernandez y Lazo de la Vega, 2011; Alban et al., 2000).

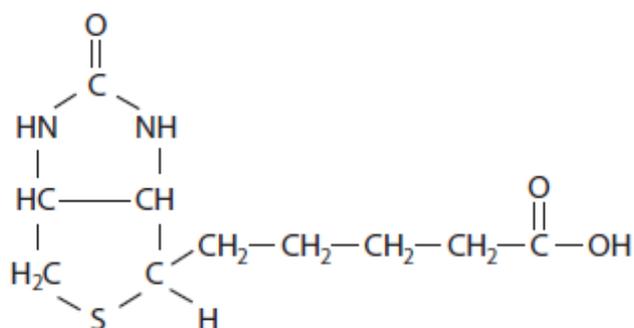


Figura 7. Formula de la biotina. La biotina tiene una estructura conformada de un ácido carboxílico (ácido valérico) del heterociclo de la condensación de los anillos de imidazol y de tiofeno hidrogenados (anillo de tetrahidrotiofeno)(Badui, 2006).

Puede existir en ocho isómeros diferentes, debido a que tiene tres átomos de carbono quirales pero sólo el D, que se encuentra en la naturaleza, tiene actividad biológica (Streit y Entcheva, 2003). Tiene una masa molecular de 244.31 g/mol y al cristalizar es ortorrómbica e incolora, su punto de fusión es de 232° C. El compuesto puro es estable en soluciones moderadamente ácidas, neutras y en soluciones moderadamente alcalinas. Tiene poca solubilidad en agua (22 mg en 100 ml de agua a temperatura ambiente) y alcohol, es insoluble en algunos solventes orgánicos como el cloroformo y es susceptible a la oxidación (Streit et al., 2003).

Su historia comienza aproximadamente 1901 cuando se descubrió como un factor de crecimiento requerido por levaduras a los cual se nombró “*bios*” (Wildiers, 1901), posteriormente en 1916, Bateman observó un cambio en la salud de las ratas que eran alimentadas con clara de huevo cruda, caracterizado por descamación, dermatitis intensa, alopecia (pérdida del pelo) y trastornos neuromusculares (Ellery,

1921) En esa misma década se encontró en la clara cruda del huevo una glicoproteína llamada avidina que tenía la característica de unirse de manera irreversible con la biotina y este complejo tiene la particularidad de no poder ser absorbido por el tracto gastrointestinal de los mamíferos. Por lo cual Bateman había observado, por primera vez en un medio controlado, un déficit grave de biotina y sus consecuencias. No fue sino hasta 1936 que dos investigadores, Kogl y Tonnis, aislaron la biotina de la yema de huevo (Kogl y Tonnis, 1932).

Se le encuentra en tres formas químicas: como vitamina libre, como coenzima; esta última, unida al grupo ϵ -amino de una lisina que recibe el nombre de biocitina y como péptidos biotinilados (Vilches y Fernández, 2005; Wolf et al., 1985). Estas formas se encuentran en una amplia variedad de alimentos: son estables al calor, solubles en el agua y el alcohol y susceptibles a la oxidación. Los mamíferos no sintetizan la biotina, por lo que requieren consumirla en la dieta o también por la acción de bacterias de la flora intestinal, además que se encuentra una extensa variedad de alimentos entre ellos por mencionar algunos, las vísceras, la yema de huevo, el pescado, los guisantes secos, las setas, la levadura de cerveza y los frutos secos principalmente en riñón, hígado, algunas verduras (coliflor, patata) y frutas, (plátano, uva, sandía, aguacate y fresas), cacahuete, levadura, leche, almendras, nueces, pollo y en la jalea real, etc. El Consejo de Alimentación y Nutrición estadounidense en 1998 estableció un nivel de ingesta adecuada que debería satisfacer las necesidades dietéticas (Yates et al., 1998)(Figura 8).

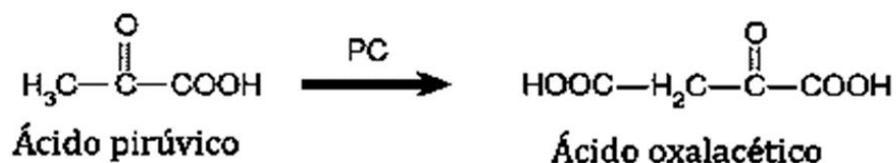
Etapa de la Vida	Edad	Hombres ($\mu\text{g}/\text{día}$)	Mujeres ($\mu\text{g}/\text{día}$)
Infantes	0-6 meses	5	5
Infantes	7-12 meses	6	6
Niños	1-3 años	8	8
Niños	4-8 años	12	12
Niños	9-13 años	20	20
Adolescentes	14-18 años	25	25
Adultos	19 años y más	30	30
Embarazo	Todas las edades	-	30
Período de lactancia	Todas las edades	-	35

Figura 8. Ingesta diaria recomendada. Dependiendo de la edad la ingesta va a variar, la biotina se expresa en microgramos por día ($\mu\text{g}/\text{día}$) (Yates et al., 1998).

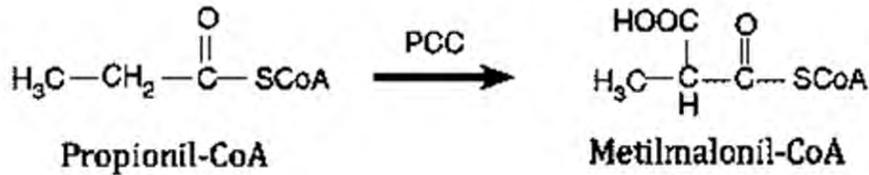
1.5.2.-Función de la biotina

La biotina que se encuentra unida a péptidos debe ser hidrolizada para su absorción, rompiendo el enlace semipeptídico por la acción de la biotinidasa pancreática (Hymes y Wolf, 1996; Vilches et al., 2005). La biotina libre se absorbe por los enterocitos de la porción distal del duodeno y la proximal del yeyuno. A pH fisiológico, el grupo carboxilo de la biotina se encuentra cargado negativamente, por lo que la biotina requiere de un transportador para cruzar las membranas plasmáticas de las células llamado transportador múltiple de vitaminas dependientes de sodio (SMVT, por sus siglas en inglés Sodium dependent Multivitamin Transporter), que reconoce principalmente la porción del ácido valérico de la biotina (Said, 2012). El SMVT es una proteína transmembranal que funciona como importador electroneutro, introduciendo a la biotina y al ácido pantoténico junto con el sodio, a favor de un gradiente de concentración (Cohen y Thomas, 1982; Chatterjee et al., 1999; Mock, 2013). Una vez en el intestino, la biotina pasa a la corriente sanguínea, en el cual se puede encontrar libre en un 81%, unida a proteínas de manera covalente en un 12% o reversible en 7% (Mock y Malik, 1992; Vilches et al., 2005). La biotina es absorbida la mayor parte por el hígado en el citoplasma y en las mitocondrias. Una gran cantidad de biotina es endógena producida por la reutilización en el denominado ciclo de la biotina. La función más conocida es la de participar como grupo prostético de las carboxilasas, por medio de la unión covalente entre la biotina y las carboxilasas. En mamíferos existen cinco carboxilasas (Dakshinamurti et al., 1994; Knowles, 1989; Fernandez y Lazo de la Vega, 2011).

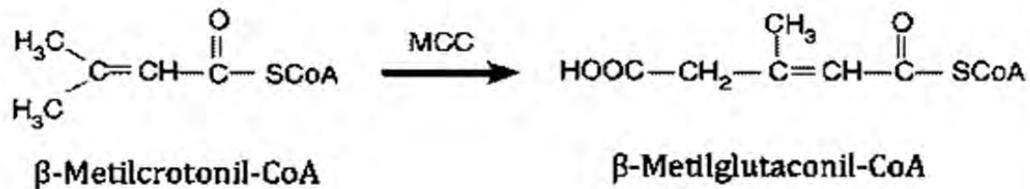
PIRUVATO CARBOXILASA (PC), convierte piruvato a oxalacetato, siendo crítica en la gluconeogénesis y en las reacciones anapleróticas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos:



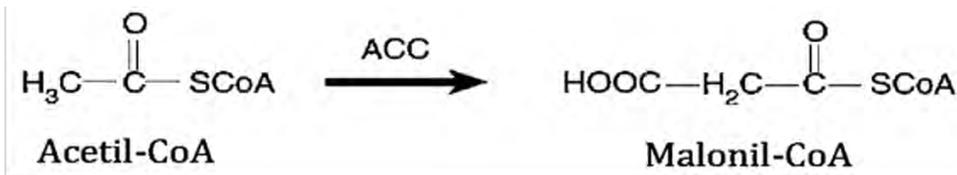
PROPIONIL-COA CARBOXILASA (PCC), cataliza los pasos esenciales en el metabolismo de aminoácidos, colesterol y ácidos grasos de cadena impar:



B-METILCROTONIL-COA CARBOXILASA (MCC), participa en el metabolismo de la leucina:



ACETIL-COA CARBOXILASA (ACC), de la cual hay dos formas genéticamente distintas, la ACC1 que se localiza en el citosol y cataliza la unión de bicarbonato a acetil-CoA generando malonil-CoA para la síntesis de ácidos grasos y la ACC2 que se encuentra en la mitocondria y participa en la regulación de la oxidación de los ácidos grasos:



Estas enzimas catalizan la incorporación de bicarbonato, en forma de un grupo carboxilo, a sus respectivos sustratos.

1.5.3.-Ciclo de la biotina

Se conoce como "ciclo de la biotina" a su reutilización mediante la liberación de la biotina de carboxilasa después de la degradación proteolítica. Las carboxilasas son sintetizadas como apocarboxilasas, sin actividad enzimática, en el citoplasma. Al unírseles la biotina covalentemente al grupo ϵ -amino de la lisina por acción de la holocarboxilasa sintetasa, se forma la proteína activa u holoenzima en una reacción de dos etapas dependiente de trifosfato de adenosina (ATP), generando monofosfato de biotinil-5'-adenosina como intermedio. En la segunda etapa, el grupo biotinilo se transfiere a apoenzimas carboxilasa formando un enlace semipeptídico con lisina, localizado dentro de la secuencia Ala-Met-Lys-Met, altamente conservada en las apocarboxilasas (Fernandez y Lazo de la Vega, 2011). Posteriormente, la biotina puede ser reciclada e integrarse como grupo prostético a nuevas carboxilasas sintetizadas, o bien puede catabolizarse formando otros productos derivados y excretarse, a partir de holocarboxilasas degradadas proteolíticamente por la biotinidasa en el intestino, que escinde la biotina de la biotinil-lisina (biocitina) o pequeños péptidos que contienen biotina (Vilches et al., 2005). La biotina se excreta principalmente a través de la orina. Aproximadamente el 95% de la biotina de una dosis de 5mg/Kg es excretada en la orina de 24 hr. Sin embargo, la mayoría de la biotina fecal es de origen microbiano, ya que las bacterias del intestino producen biotina y ésta también puede ser absorbida por el organismo (Aguilera y Fernández, 2012).

1.5.4.-Biotina en el metabolismo de lípidos

La mayor implicación de que la biotina regula el metabolismo de lípidos se establece con la participación como coenzima de la carboxilasa ACC1 y ACC2, la enzima más importante en la regulación del metabolismo de los ácidos grasos. La ACC1 cataliza el primer eslabón (etapa limitante) en la síntesis de los ácidos grasos. Limita el aporte de malonil~CoA, la molécula que dona la unidad de dos átomos de carbono a la cadena de ácido graso en crecimiento. La ACC2 localizada en la

membrana mitocondrial, regula a la baja la β -oxidación de ácidos grasos en la mitocondria al inhibir la CPT1. La actividad de acetilCoA carboxilasa, está determinada por el estado energético del organismo que se controla de manera conjunta y coordinada por tres señales: insulina (estimulando la síntesis), glucagón (induciendo la β -oxidación) y la adrenalina (favoreciendo la lipogénesis). Otras moléculas también tienen efectos significativos sobre el balance “lipogénesis vs lipólisis”. Así, el citrato incrementa la actividad de la carboxilasa; el palmitil-CoA y el AMP, inhiben la actividad carboxilasa (Dakshinamurti y Cheah, 1968; Saggerson, 2008; Suchy y Wolf, 1986)(Figura 9).

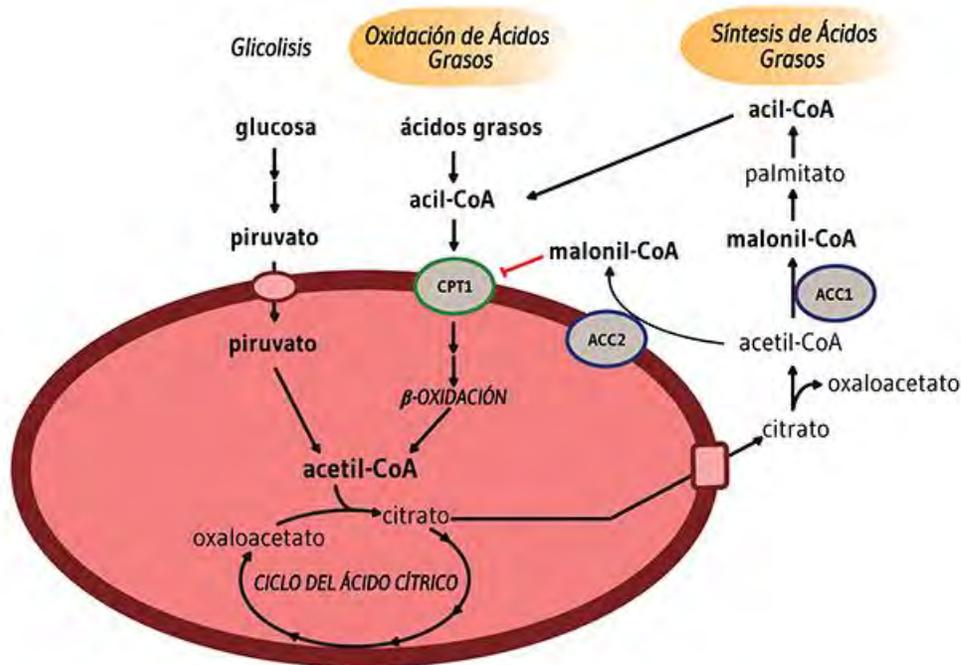


Figura 9. Regulación del metabolismo lipídico. La ACC1 cataliza la conversión de acetil-CoA a malonil-CoA usando bicarbonato, Biotina y ATP; el malonil-CoA generado vía ACC1 es un sustrato limitante para la síntesis de ácidos grasos en el citosol, y el malonil-CoA generado vía ACC2 inhibe la CPT1, una enzima de la membrana mitocondrial externa importante en la oxidación de ácidos grasos. La ACC1 se encuentra en todos los tejidos y es particularmente activa en tejidos lipogénicos (es decir, hígado, tejido adiposo blanco, y glándulas mamarias), el corazón, e islotes pancreáticos. La ACC2 es especialmente abundante en el músculo esquelético y corazón (Saggerson, 2008).

1.5.5.-Efecto de la biotina en la expresión de genes

Recientemente se ha demostrado e investigado que, además de su función como grupo prostético y como sustrato, la biotina a concentraciones farmacológicas es capaz de modificar la expresión de (Vilches et al., 2005; Wiedmann et al., 2004; Zempleni, 2005), mediante la regulación de la abundancia de RNA mensajeros de varias proteínas como: interleucina 2, receptor de interleucina 2 (Rodriguez et al., 2003), de factores transcripcionales (NF-kB, N-myc, c-myb, N-ras y raf) (Scheerger y Zempleni, 2003), de la ATPasa-3 del retículo sarco/endoplásmico dependiente de calcio (SERCA3) (Rodriguez et al., 2006) y de varios genes y proteínas claves en la regulación del metabolismo de carbohidratos (Vilches et al., 2005; Lazo de la Vega et al., 2013; Vilches et al., 2010) y de lípidos (Farid et al., 2013; Larrieta et al., 2010; Aguilera et al., 2012).

La biotina también afecta la expresión de genes a nivel postranscripcional. Investigaciones efectuadas por Stocker y colaboradores, encontraron que la vitamina modifica la expresión del receptor de asialoglicoproteínas y del receptor de insulina a nivel traduccional y postraduccional (R J Stockert y Morell, 1990; Richard J Stockert y Ren, 1997; De la Vega y Stockert, 2000). Trabajos realizados por Wiedmann en células mononucleadas de sangre periférica humana, mostro que la biotina aumenta la expresión de 139 genes, mientras que disminuye la de otros 131 genes (Wiedmann et al., 2004). Entre los procesos biológicos que también se modifican incluyen la proliferación celular, el desarrollo embrionario, funciones inmunológicas y el metabolismo de carbohidratos y lípidos (Vilches et al., 2005). Estudios recientes reportaron que la biotina a concentraciones farmacológicas puede regular la síntesis de lípidos a nivel postraduccional a través de la fosforilación de proteínas (Aguilera et al., 2012).

1.5.6.-Teorías propuestas sobre el efecto de la biotina en la expresión génica

Hasta el momento solo se han propuesto dos mecanismos para explicar el efecto de la biotina sobre la expresión génica (Fernandez y Lazo de la Vega, 2011)

1) A través de la vía de señalización de la guanilato ciclasa soluble (GCs)/proteína cinasa G (PKG).

2) La biotinilación de histonas

1.5.6.1.-Activación de la guanilato ciclasa soluble

La biotina ha mostrado que tiene la capacidad de activar a la guanilato ciclasa soluble (GCs) que desencadena un mecanismo de señalización a través de la vía de señalización GC/GMPc/PKG, favoreciendo así una serie de fosforilaciones que modifican la expresión de genes. Estudios pioneros por Vesely en 1982 demostraron que la adición de biotina a extractos celulares aumentaba la actividad de la guanilato ciclasa soluble (GCs) (Vesely, 1982), proponiéndose posteriormente que en el mecanismo de activación de la GCs participa el biotinil-5'-AMP, producto catalítico de la holocarboxilasa sintetasa, quién por un mecanismo aún desconocido aumenta la actividad de la GCs (Pacheco et al., 2002). En otros estudios de Spence y Koudelka, encontraron que en hepatocitos de ratas aumentó la actividad de la glucocinasa hepática, precedido por un incremento en las concentraciones intracelulares de guanosín monofosfato cíclico (GMPc) intracelular, activa a la proteína cinasa G (PKG), la cual puede fosforilar diferentes proteínas y genes que participan en la regulación de la expresión genética (Vilches et al., 2010; Vilches et al., 2005), (Figura 10), lo que sugiere que la biotina ejerce su efecto génico a través de este segundo mensajero y a concentraciones farmacológicas.

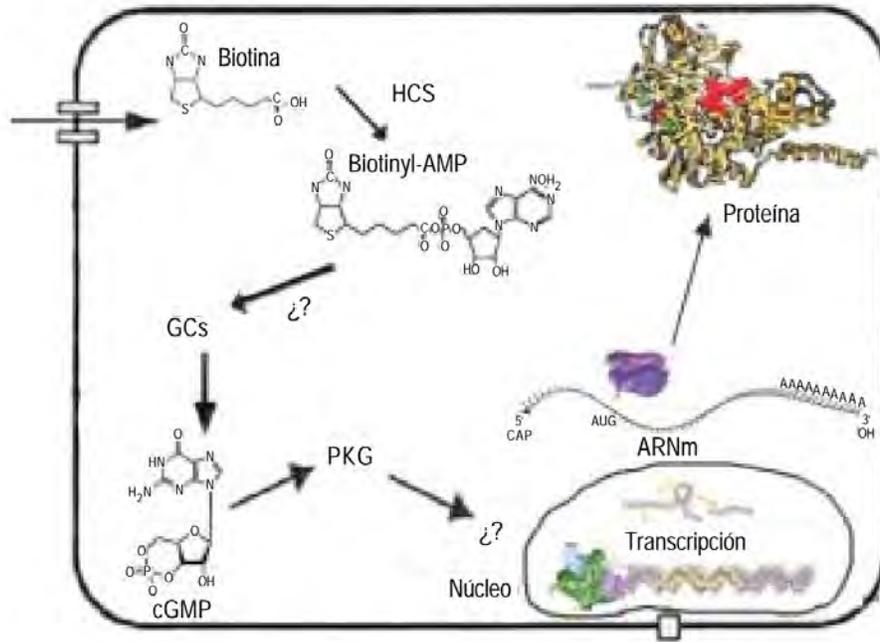


Figura 10. Activación de la guanilato ciclasa soluble. El biotilil-AMP formado por la HCS, aumenta la actividad de la GCs por un mecanismo desconocido, incrementando los niveles de cGMP, el cual activa a la PKG que participa en la fosforilación de proteínas involucradas en la expresión génica (Vilches et al., 2005).

1.5.6.2.-Biotinilación de Histonas

En eucariontes, el DNA genómico está empaquetado y forma la cromatina, cuya condensación impacta en procesos tales como la transcripción, replicación, recombinación y reparación del ADN (Macías et al., 2008). Los nucleosomas son las unidades estructurales básicas de la cromatina y están formados por una familia de proteínas llamadas histonas (H2A, H2B, H3 y H4). Las diversas modificaciones de las colas de las histonas, incluyendo la acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, SUMOilación, ADP-ribosilación, carbonilación, deiminación, hidroxilación, tienen diferentes funciones regulatorias mediante el cambio de la conformación de la cromatina y la actividad transcripcional de los genes. Estudios realizados en las décadas de los 60's y 70's sugerían acciones nucleares de la biotina: la presencia de biotina en el núcleo (Dakshinamurti y Mistry, 1963), las alteraciones en animales deficientes en biotina en la fosforilación, metilación y acetilación de las histonas y en la asociación de estas últimas con el DNA (Petrelli et al., 1978) indicaban un posible efecto de la vitamina sobre la cromatina.

Posteriormente, estudios *in vitro* demostraron que las histonas son susceptibles a ser biotiniladas (Hymes et al., 1996), lo que otorgaba una explicación a la presencia de biotina en el núcleo y a la relación entre biotina e histonas. Además se observó la presencia en el núcleo de dos enzimas claves en el metabolismo de la biotina, la biotinidasa y la holocarboxilasa sintetasa (Hymes y Wolf, 1999; Stanley et al., 2001). Se ha propuesto la modificación covalente, donde la biotina se une por una reacción catalizada por la HCS a los residuos de lisina en el extremo amino terminal de las histonas H2A, H3 y H4 (Janos et al., 2012), entre ellas, la biotinilación de la histona H4 en la lisina (K) se ha identificado principalmente en la heterocromatina pericentromérica y se ha asociado con el silenciamiento de genes, la condensación mitótica de la cromatina y con la respuesta celular al daño del ADN (Zempleni et al., 2012). Entre las funciones relacionadas con la biotinilación de histonas está un decremento de linfocitos polimorfonucleares durante la proliferación celular (Aguilera et al., 2013).

2.-ANTECEDENTES DIRECTOS

El síndrome metabólico se ha convertido actualmente en un problema de salud en México y a nivel mundial (Méndez et al., 2004). Recientemente se ha descrito la relación del síndrome metabólico y su impacto con las enfermedades hepato biliares, especialmente el hígado graso, definido como esteatosis hepática no alcohólica o NAFLD, a esta enfermedad se le considera una manifestación del síndrome metabólico (Medina et al., 2013). La esteatosis hepática simple se caracteriza histológicamente como una acumulación de lípidos mayor al 5 %. La enfermedad puede abarcar una amplia gama de alteraciones sino es tratada adecuadamente, comenzando por esteatosis hepática simple, progresando a esteatohepatitis (NASH), fibrosis, cirrosis y hasta cáncer hepático (Paredes et al., 2012). Los estudios en modelos animales son una valiosa herramienta para comprender los procesos fisiopatológicos asociados a la NAFLD, así como sus características histológicas y ensayar nuevas terapias. Las ratas machos Wistar desarrollan fácilmente hígado graso inducido por el consumo de fructosa (Ayala et al., 2008). La administración de fructosa a ratas da lugar a esteatosis macro y microvesicular hepática con aumento en los triglicéridos y el colesterol hepáticos (Ouyang et al., 2008). El estudio de la función y los mecanismos moleculares de las vitaminas ha permitido el desarrollo de medicamentos que actualmente son usados como agentes terapéuticos para el tratamiento de diversas enfermedades. La biotina es una vitamina hidrosoluble del complejo B, esencial para la homeostasis metabólica y el crecimiento celular (Wallace, 2003). La función más conocida es la de participar como grupo prostético de las carboxilasas. Independientemente de ésta función, se encontró que, a concentraciones farmacológicas, es capaz de modificar la expresión de varios genes y proteínas claves en la regulación del metabolismo de carbohidratos y de lípidos (Fernandez y Lazo de la Vega, 2011) (Fernandez et al., 2011; Vilches et al., 2005).

Dado que la biotina interviene como cofactor de las carboxilasas ACC 1 y 2, enzimas cruciales en la síntesis y oxidación de ácidos grasos respectivamente, existe una relación directa entre la vitamina y el metabolismo de lípidos (Suchy et al.,

1986). La administración de biotina (5 mg/días) durante 4 semanas en pacientes con aterosclerosis e hipercolesterolemia, produjo un decremento en las concentraciones de colesterol total (Medina et al., 2013). En voluntarios sanos se encontró que la administración de 0.9 mg/día de biotina produjo modificaciones en los niveles de lípidos plasmáticos, los cuales variaron dependiendo del tiempo de administración y hubo una disminución en los individuos que presentaron hiperlipemia (Marshall et al., 1980). Báez y colaboradores encontraron que el tratamiento con 5 mg tres veces al día de biotina en pacientes diabéticos y no diabéticos, disminuyeron las concentraciones de triglicéridos plasmáticos (Báez et al., 2004). Recientemente se reportó por primera vez, que en ratones sanos la biotina a concentraciones farmacológicas disminuye la síntesis de triglicéridos hepáticos, modificando la fosforilación de las carboxilasas ACC1, ACC2 y del factor SREBP-1c, por medio de la activación de la cinasa AMPK (Aguilera et al., 2012), la cual es clave en el control energético y está relacionada de manera importante en varias enfermedades asociadas al síndrome metabólico (Hardie et al., 2012).

Los efectos que produce la biotina sobre el metabolismo de la glucosa y de los lípidos ha llevado a la elaboración de compuestos comerciales que contienen concentraciones farmacológicas de biotina libre o en combinación con picolinato de cromo para el tratamiento de enfermedades como la diabetes tipo 2 (Albarracín et al., 2007) y las dislipidemias (Albarracín et al., 2008). Estos productos contienen concentraciones farmacológicas de biotina que representan de 40 a 166 veces más que la ingesta diaria recomendada de biotina de (30 µg/día)(Schlicker et al., 1998).

2.1.-Planteamiento del problema

Varios estudios han demostrado que dosis farmacológicas de biotina reducen los lípidos séricos en humanos y modelos murinos. En un estudio reciente se demostró (Aguilera et al., 2013) que la biotina disminuye la síntesis de triglicéridos hepáticos en ratones sanos, a través de la regulación de factores transcripcionales y enzimas que regulan la lipogénesis hepática. Sin embargo, se desconoce si la biotina tiene efecto en un modelo de esteatosis hepática, reduciendo la acumulación de lípidos. Por lo que en este proyecto se propuso estudiar el efecto y (los

mecanismos moleculares que la biotina pudiera tener sobre la NAFLD), en un modelo con un reto metabólico de síndrome metabólico.

Para el desarrollo del Proyecto se determinó si una vez establecida la esteatosis por consumo de fructosa, la biotina puede reducir la esteatosis simple. De manera análoga a la trayectoria del estudio de varias vitaminas sobre enfermedades, los resultados de este proyecto permitirán el avance en el conocimiento de los efectos y mecanismos moleculares de acción de la biotina, conocimiento de ciencia básica que permitirá determinar su posible uso en monoterapia o como coadyuvante junto con otros agentes terapéuticos para tratar la esteatosis hepática, abriendo la posibilidad de desarrollar nuevos medicamentos.

3.-JUSTIFICACIÓN

La esteatosis hepática está asociada con varios padecimientos, como la resistencia a la insulina, la dislipidemia, la obesidad y la diabetes tipo 2, componentes del síndrome metabólico, los cuales son un problema de salud pública en México y a nivel mundial. Las estimaciones consideran que la NAFLD se encuentra en alrededor del 25% de la población con síndrome metabólico, por lo que hace necesario, el estudio sobre vitaminas que sean utilizadas como nutraceuticos. Además, no existe una monoterapia que pueda controlar la NAFLD. Por lo que en el presente proyecto proponemos estudiar el efecto hipotrigliceridémico que la biotina pudiera tener en la disminución de la NAFLD.

4.-HIPÓTESIS

La biotina reduce la esteatosis hepática no alcohólica en un modelo animal de síndrome metabólico.

5.-OBJETIVOS

5.1.-OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de una dosis farmacológica de biotina en la esteatosis hepática no alcohólica en un modelo de síndrome metabólico en ratas alimentadas con fructosa.

5.2.-OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estandarizar un modelo de síndrome metabólico en ratas alimentadas con fructosa.
2. Caracterizar en el modelo de síndrome metabólico la esteatosis hepática por análisis histomorfológicos, el contenido hepático de triglicéridos, colesterol, perfil sérico de lípidos y enzimas séricas hepáticas.
3. Evaluar el estrés oxidativo hepático mediante la lipoperoxidación.
4. Cuantificar el contenido hepático de óxido nítrico.

6.-MATERIALES Y MÉTODOS

6.1.-Modelo animal

Se utilizaron 8 ratas Wistar macho por grupo experimental con un peso promedio inicial de 200 ± 20 gr. Se mantuvieron en jaula rectangular con aserrín 4 individuos en cada una, en una sala adaptada con ciclos de luz y oscuridad de 12h, temperatura estándar (25 ± 2 °C), con disponibilidad *ad libitum* de agua y alimento además de humedad controlada. Posterior a la adaptación las ratas se dividieron al azar en cuatro grupos experimentales (Control, Biotina, Fructosa-pbs y Fructosa-biotina). Se siguieron las recomendaciones del Comité Institucional para el uso de animales de la UMSNH y se cumplió con los lineamientos establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, referente a especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Todos los grupos fueron alimentados con alimento de mantenimiento Rodent Laboratory Chow 5001 (Purina) *ad libitum*, al grupo Fructosa-pbs y al grupo Fructosa-biotina se les administró fructosa al 15 % (p/v) en el agua de beber *ad libitum*, durante 2 meses. Al comienzo del segundo mes, al grupo Fructosa-pbs se le inyectó vía intraperitoneal (I.P.) vehículo solución de fosfatos (PBS) pH 7.4, diariamente durante 1 mes; al grupo Fructosa-biotina se le inyectó vía I.P. biotina (2mg/kg de peso) diariamente durante 1 mes. Al grupo Control y Biotina no se le dio fructosa y al primero se le administró I.P. PBS durante 1 mes y al grupo biotina se le administró biotina (2mg/kg peso) durante un mes. Se midió cada semana el peso de los animales, el consumo de agua y alimento. Al final de los tratamientos, los animales fueron sacrificados con un ayuno previo de 12h, se tomaron muestras de sangre de vena porta y se extrajo el hígado. Se realizaron dos experimentos independientes con el mismo número de ratas y grupos.

6.2.-Solución de fructosa al 15 %

Se prepararon la cantidad de 2 litros cada tercer día, pesando 300g de fructosa cristalina marca Krystar de Tate & Lyle y disolviendo en 2000 ml de agua destilada, para obtener una solución de fructosa al 15 %.

6.3.-Solución de biotina y *buffer* PBS

Primero se preparó la solución de PBS (*Phosphate Buffer Saline*) a un pH 7.4 que tiene como componentes: NaCl 80%, KCl 2%, Na₂HPO₄ 14.5% y KH₂PO₄ 2.5% en agua destilada (Sambrook y Russell, 2001). Posteriormente se filtró por membrana en campana estéril, para esterilizar la solución, se realizaron alícuotas y se guardaron en refrigeración a 10°C. Se preparó la biotina a una concentración de 2 mg/ml de biotina en solución PBS, se mezclaron lentamente ajustando el PH a 7.4 con el potenciómetro HANNA modelo HI 223 y finalmente se filtró por membrana en campana estéril, se realizaron alícuotas y se guardaron en refrigeración a 10°C.

6.4.-Curva de tolerancia a la glucosa

Mantuvimos las ratas en ayuno durante 8 h previas, retirando alimentación y la fructosa y se colocó con agua pura a los 4 grupos experimentales. Medimos las concentraciones de glucosa en muestras de sangre de la cola, utilizando un glucómetro modelo Accu-Chek Performace que usa método enzimático electroquímico de química seca. Primeramente, se tomó una muestra inicial a los 0 minutos y posteriormente se le aplicó la inyección de glucosa por vía intraperitoneal (2g/kg peso) y se tomaron muestras de sangre a los 15, 30, 45, 60 y 90 minutos posteriores. La medición se realizó al final de los tratamientos de fructosa y biotina días antes del sacrificio. Los resultados se obtuvieron en mg/dL.

6.5.-Curva de resistencia a la insulina

Realizamos la curva en ratas alimentadas *ad libitum* a los 4 grupos experimentales. Medimos las concentraciones de glucosa en muestras de sangre de

la cola, utilizando un glucómetro modelo Accu-Chek Performace. Primeramente, se tomó una muestra de inicio a los 0 minutos y posteriormente se le aplicó una inyección intraperitoneal (1 IU/kg) de insulina regular humana (Humulin, Laboratorios Eli Lilly) y se tomaron muestras de sangre a los 15, 30, 45, 60 y 90 minutos posteriores, la medición se realizó al final de los tratamientos de fructosa y biotina días antes del sacrificio. Los resultados se obtuvieron en mg/dL.

6.6.-Extracción de tejido hepático y muestras de sangre de vena porta

Las ratas se mantuvieron en ayuno de 12 horas, se pesaron y se les administro una dosis de pentobarbital sódico (55mg/kg de peso corporal) vía I.P. para provocar sedación profunda. Una vez verificado la sedación se procedió a realizar una toracotomía, tomando primeramente muestra de sangre de la vena porta y dejando coagular a temperatura ambiente por 20 minutos para su posterior separación en centrífuga a 5000 rpm durante 10 minutos, posteriormente se separó el suero del paquete globular y se mantuvo en refrigeración para su posterior análisis. Enseguida se procedió a retirar el lóbulo lateral izquierdo del hígado y se sumergió en solución salina para retirar la sangre. Posteriormente, se cortó una muestra transversalmente y se fijó en paraformaldehído 4% para realizar posteriormente la histología, la otra parte del lóbulo hepático se almacenó a -80°C hasta el momento de la determinación de triglicéridos hepáticos, lipoperoxidación y óxido nítrico.

6.7.-Perfil de lípidos, triglicéridos, colesterol total, HDL y LDL

Realizamos la determinación en suero, obtenido al final de tratamiento y se determinaron en el equipo VITROS de Ortho-Clinical Diagnostic por método de colorimetría en química seca, usando 10µL de muestra más 10µL de reactivo. Los resultados se obtuvieron en mg/dL.

6.8.-Medición de glucosa y ácido úrico en suero

Realizamos la determinación en suero, el cual se obtuvo al final de tratamiento y se determinaron en el equipo VITROS de Ortho-Clinical Diagnostic por el método de colorimetría en química seca, usando 10µL de muestra más 10µL de reactivo. Los resultados se obtuvieron en mg/dL.

6.9.-Determinación de enzimas, ALT, AST, DHL, FA y GGT

Realizamos la determinación en suero, obtenido al final de tratamiento y se determinaron en el equipo VITROS de Ortho-Clinical Diagnostic por el método de colorimetría en química seca, usando 10µL de muestra más 10µL de reactivo enzimático. Los resultados se obtuvieron en U/L de Amino lactato transaminasa (ALT), Amino aspartato transaminasa (AST), Deshidrogenasa láctica (DHL), Fosfatasa alcalina (FA) y Gama glutamil transferasa (GGT).

6.10.-Cuantificación de triglicéridos y colesterol total en tejido hepático

Se cuantificaron a partir de 100 µg de hígado congelado a -80°C. Las muestras se homogenizaron en 1 ml de solución de lisis PBS-TRITON 5% mediante el homogeneizador eléctrico Polytron® PT10-35, de acuerdo a lo reportado por Aguilera y colaboradores (Aguilera y Fernández, 2012). Seguidamente, se transfirió el homogenado a un tubo de *eppendorf* y se centrifugaron las muestras a 15000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se separó el sobrenadante. Los triglicéridos y el colesterol se determinaron en el equipo VITROS de Ortho-Clinical Diagnostic por el método de colorimetría en química seca, usando 10µL de muestra más 10µL de reactivo. Para la determinación de la concentración de proteína se utilizó el método Bradford (Bradford, 1976) mediante curva patrón de albumina de suero bovino (BSA). Los resultados se obtuvieron en µg/mgProt.

6.11.-Cuantificación de la lipoperoxidación lipídica

Se cuantificaron a partir de 100 µg de hígado congelado a -80°C. Las muestras se cuantificaron de acuerdo al *kit* "Lipid peroxidation" marca Biovision homogenizaron. La prueba se basa en que la peroxidación lipídica forma malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal (4-HNE), como bioproductos naturales y es una medida útil de daño oxidativo. El MDA en la muestra reacciona con ácido tiobarbitúrico (TBA) para generar el aducto MDA-TBA que se puede cuantificar fácilmente colorimétricamente a una longitud de onda de 532nm. De manera breve, la muestra de hígado se transfirió a un tubo *ependorf* con 1 ml de solución de lisis "MDA Lysis Buffer" mediante el homogeneizador eléctrico Polytron® PT10. El homogenado se transfirió a un tubo *ependorf* y las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 minutos, se separó el sobrenadante y se le agregó reactivo TBA 600 µl y se incubó a 95°C por 60 min y dejamos enfriar a temperatura ambiente y se midió en el espectrofotómetro a 532 nm. Para la determinación de la concentración de proteína se utilizó el método Bradford (Bradford, 1976) mediante curva patrón de BSA. Los resultados se obtuvieron en MDA en nmol/mgProt.

6.12.-Cuantificación de óxido nítrico

Se cuantificaron a partir de 100 µg de hígado congelado a -80°C. Las muestras se determinaron mediante el *kit* "Nitric Oxide Colorimetric Assay" marca Biovision. La prueba se basa en la oxidación del ON. El NO se oxida rápidamente a nitrito y nitrato que se utilizan para cuantificar la producción de NO. El primer paso convierte el nitrato a nitrito utilizando nitrato reductasa. El segundo paso usa reactivo de *Griess* para convertir el nitrito en un compuesto azo de color morado oscuro. La cantidad del azocromóforo refleja con precisión la cantidad de óxido nítrico en las muestras que se cuantifican fácilmente a 540 nm. Brevemente, las muestras se homogeneizaron en 1 ml de solución de PBS con el homogeneizador eléctrico Polytron® PT10. Se transfirió el homogenado a un tubo *ependorf* y las muestras se centrifugaron a 13000rpm durante 15 minutos a 4°C, se separó el sobrenadante, se tomaron 10ul de muestra problema y se siguieron las instrucciones del fabricante.

Para la determinación de la concentración de proteína se utilizó el método Bradford (Bradford, 1976) mediante curva patrón de BSA. Los resultados se obtuvieron nmol/mgProt.

6.13.-Análisis histomorfológico

Se hicieron para determinar de manera cualitativa la cantidad de grasa presente en los hepatocitos. Se utilizó la tinción de hetaoxilina -eosina que se basa en una doble coloración de las estructuras celulares. La hematoxilina se une a estructuras basófilas como los ácidos nucleicos, otorgándoles una coloración azulada; mientras que la eosina tiñe componentes acidófilos como el citoplasma celular, otorgando un color que va de rosado a rojizo. Las muestras depositadas en paraformaldehído 4%, fueron incluidas mediante cortes (3-4 μm) en. Los preparados histológicos se sumergieron en xilol para eliminar los excesos de parafina. Luego se pasaron por una serie de alcoholes en concentración decreciente para rehidratar la muestra (100°, 95° y 70°). Se lavó en agua para eliminar el exceso de alcohol y se sumergieron en hematoxilina por 10 minutos, luego se lavaron en agua para eliminar excesos y se pasó rápidamente por alcohol ácido. Finalmente se lavaron nuevamente y se sumergieron 30 segundos en eosina, se pasaron por otra serie de alcoholes, esta vez en orden creciente (70°, 95° y 100°) para deshidratar la muestra, se dejaron remojar 10 minutos en xilol y se montaron en glicerol 10%. Las microfotografías se tomaron con ayuda de una cámara adaptada a un microscopio óptico marca "Carl Zeiss" con aumento de 450 X.

6.14.-Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa Sigma Plot for Windows 11.0 (Systat Software, inc.). Los datos se presentarán como el promedio \pm error estándar (ES). Prueba de normalidad de datos por Shapiro-Wilk. La significancia estadística se determinó por la prueba de ANOVA de una vía, seguida de la prueba de Fisher de múltiple rango. Se considerará como estadísticamente significativa una $P < 0.05$.

7.-RESULTADOS

7.1.-Cuantificación del consumo de agua, alimento y peso

Para llevar su control fisiológico óptimo y detectar efectos adversos debidos a los diferentes tratamientos se realizaron cuantificaciones del consumo de agua que muestra que los 4 grupos experimentales presentaron diferencias no significativas. Sin embargo, hay una ligera disminución del consumo de agua de los grupos tratados con Fructosa-pbs y Fructosa-biotina con respecto a los grupos Control y Biotina (Figura 11).

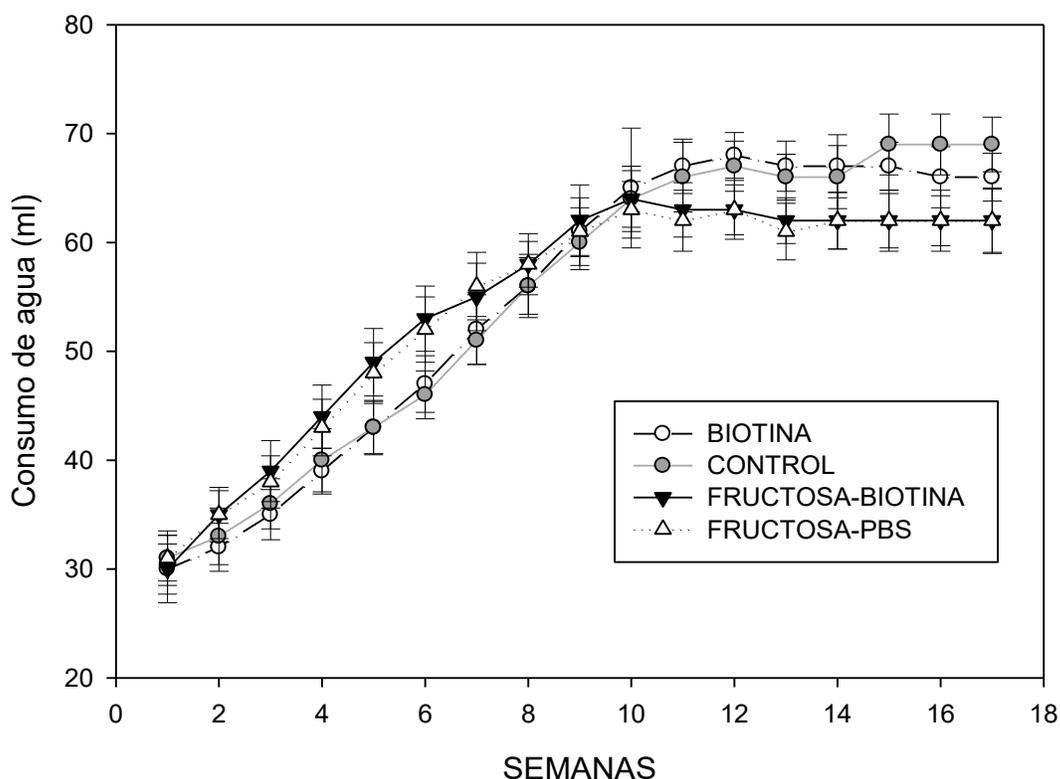


Figura 11. Consumo de agua de los grupos experimentales. Los valores representan la media \pm error estándar, de una n=8 por grupo, pruebas de normalidad de datos Shapiro-Wilk aceptada; Anova $p < 0.05$. no presentan diferencia significativa.

Por otra parte, el consumo de alimento también mostró diferencia no significativa entre los grupos experimentales, pero hay una ligera disminución del consumo de alimento entre los grupos tratados con Fructosa-pbs y Fructosa-biotina con respecto a los grupos Control y Biotina (Figura 12). Con respecto al peso

tampoco hubo diferencia significativa y solo cabe destacar un ligero aumento de pesos de los grupos tratados con Fructosa-pbs y Fructosa biotina con respecto a los grupos control y biotina (Figura 13).

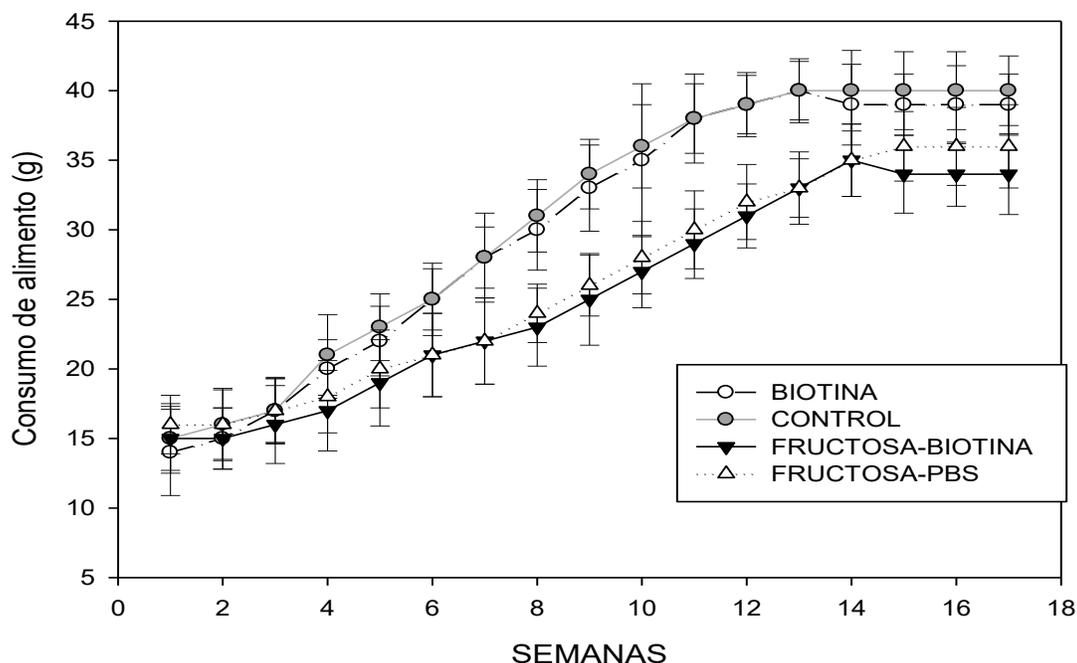


Figura 12. Consumo de alimento de los grupos experimentales. Los valores representan la media \pm error estándar, de una n=8 por grupo, pruebas de normalidad de datos Shapiro-Wilk aceptada; Anova $p < 0.05$. no presentan diferencia significativa.

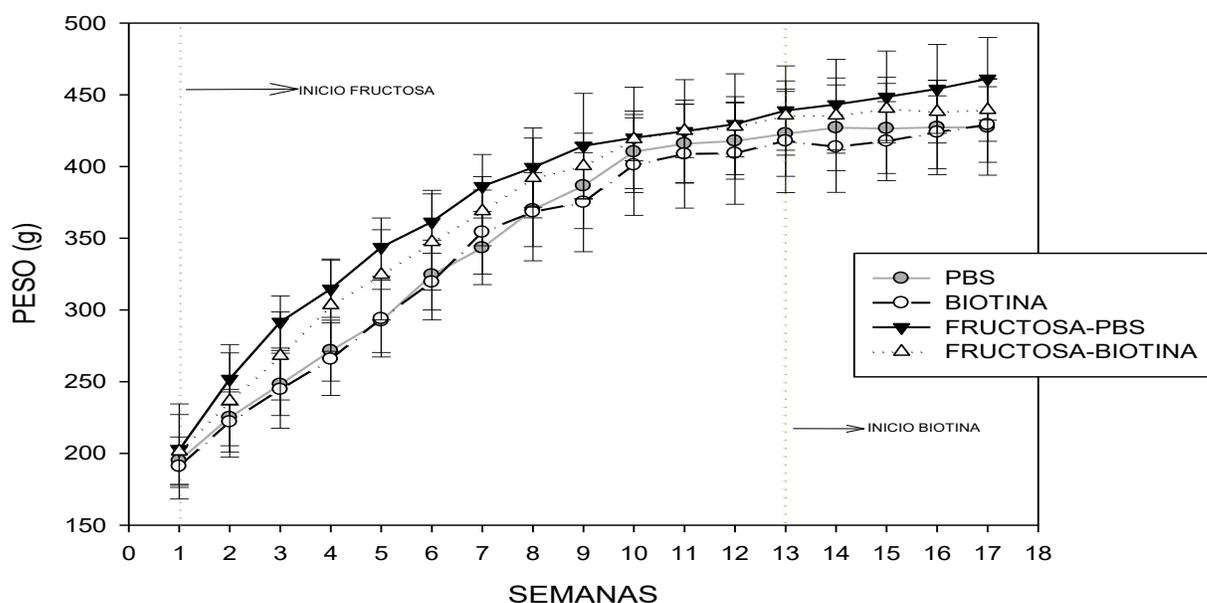


Figura 13. Peso de los grupos experimentales. Los valores representan la media \pm error estándar, de una n=8 por grupo; Anova $p < 0.05$. no presentan diferencia significativa.

7.2.-Curva de tolerancia a la glucosa

Se realizó una curva de glucosa al terminar los tratamientos y se observaron diferencias significativas entre grupos experimentales. El grupo de Fructosa-pbs presentó hiperglicemia con respecto al Control en los tiempos, 0, 15, 30 y 90 min y con respecto a los demás grupos hubo diferencia ($P < 0.05$) en todos los tiempos, considerando que este grupo es el patológico ya que fue tratado con fructosa, se logró provocar hiperglicemia. Se observó diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los grupos Biotina y el Control en todos los tiempos 0, 15, 30, 60 y 90 min observándose una menor glicemia en el grupo de Biotina. También se observaron bajos valores de glucosa del grupo Fructosa-biotina, sin pasar a ser hipoglucemiante y el control con cambio significativo ($P < 0.05$). (Figura 14).

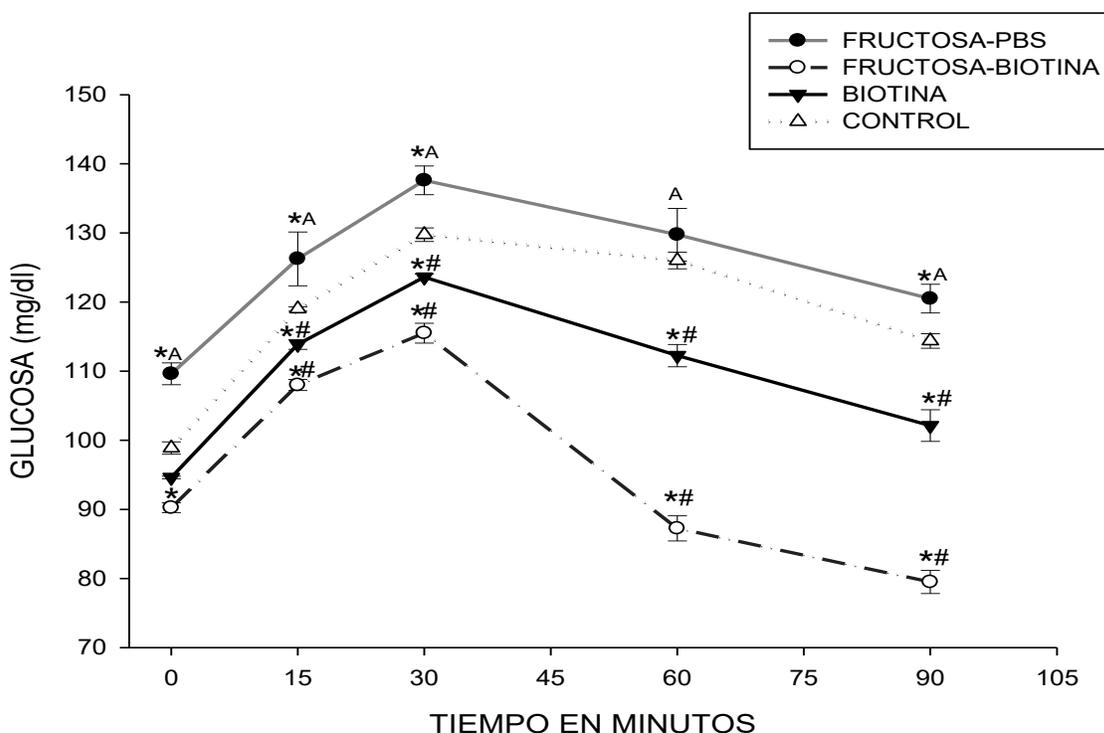


Figura 14. Curva de tolerancia a la glucosa. Los valores representan la media \pm error estándar, de una $n=8$, ANOVA post Tukey. * $P < 0.05$ diferencia significativa vs Control, # $P < 0.05$ diferencia significativa vs Fructosa-pbs, A $P < 0.05$ diferencia significativa Fructosa pbs vs Biotina y Fructosa-biotina.

7.3.-Curva de resistencia a la insulina

Se realizó una curva de resistencia a la insulina al terminar los tratamientos, se observaron diferencias significativas entre grupos experimentales. El grupo Fructosa-pbs presentó mayor resistencia con respecto al Control con cambios significativos ($P < 0.05$) en los tiempos 15, 30, 60 y 90 min. También se observó que los grupos Biotina y Fructosa-biotina presentaron menor resistencia con respecto al control en todos los tiempos. Los grupos Fructosa-biotina y Biotina mostraron diferencia significativa ($P < 0.05$) mejorando sus valores con respecto al patológico Fructosa-pbs. El mejor valor para la resistencia lo muestra el grupo Fructosa-biotina que presenta cambio significativo con respecto al Control y Fructosa-pbs (Figura 15).

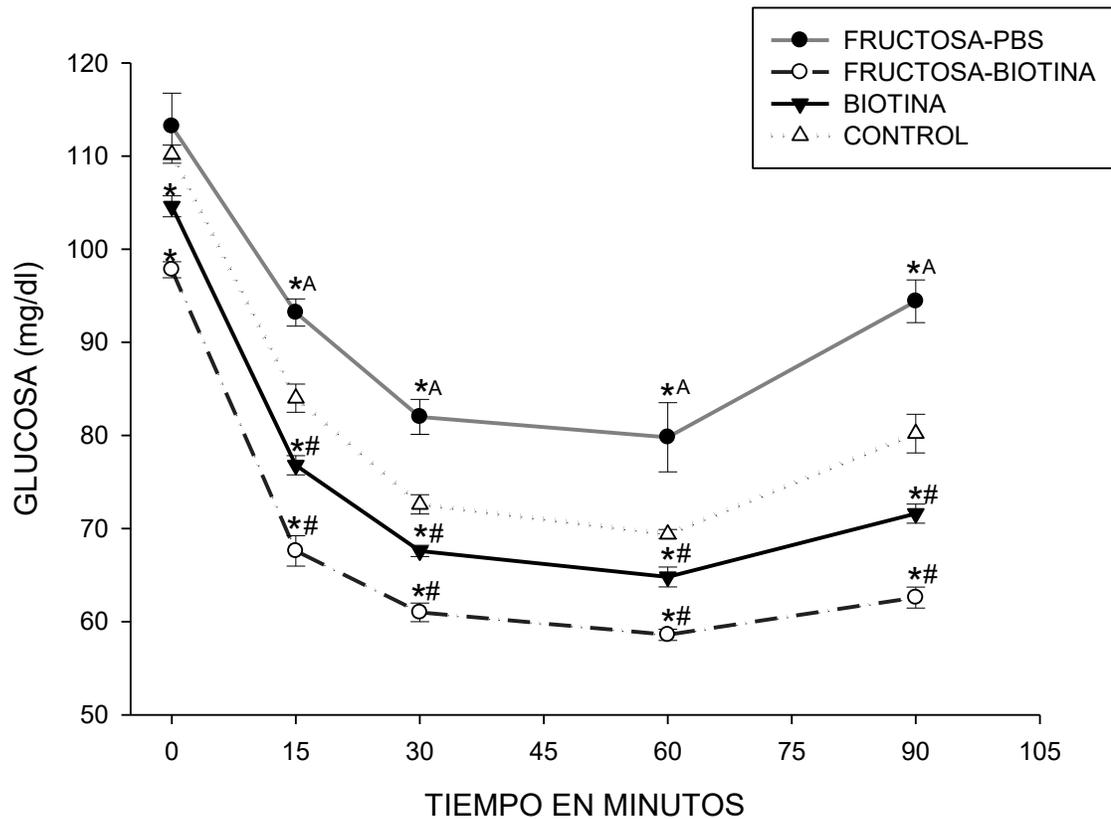


Figura 15. Curva de resistencia a la Insulina. Los valores representan la media \pm error estándar, de una $n= 8$, ANOVA post Tukey. * $P < 0.05$ diferencia significativa vs Control, # $P < 0.05$ diferencia significativa vs Fructosa-pbs, A $P < 0.05$ diferencia significativa Fructosa-pbs vs Biotina y Fructosa-biotina.

7.4.-Perfil de lípidos

Se realizaron pruebas del perfil de lípidos séricos al final del tratamiento. Los resultados muestran que los triglicéridos todos los grupos presentaron diferencia significativa ($P < 0.05$) con respecto al Control; la Fructosa-pbs muestra una hipertrigliceridemia con respecto al Control, la Biotina y más marcada con la Fructosa-biotina; así como la Fructosa-biotina tiene el mayor cambio significativo con respecto a la Fructosa-pbs. El colesterol muestra que el grupo Fructosa-pbs tiene cambio significativo ($P < 0.05$) con respecto al control y la Fructosa-biotina.

En el HDL se encontró que la Fructosa-pbs está muy disminuido con respecto a la Biotina y la Fructosa-biotina diferencia significativa ($P < 0.05$) entre la Fructosa-biotina y el Control. El valor del LDL se observó alto para la Fructosa-pbs con cambio significativos ($P < 0.05$) con respecto al Control, la Biotina y la Fructosa-biotina; además, se observó que el tratamiento de Biotina y fructosa-biotina no difieren del control, el valor más notorio se observó entre la Fructosa-biotina y la fructosa-pbs. Los valores de VLDL mostraron cambios significativos ($P < 0.05$) entre los grupos Fructosa-pbs y Fructosa-biotina con respecto al Control; la otra diferencia se observó entre el grupo Fructosa-pbs con el control y Fructosa-biotina, aunque estos valores de diferencia no son muy altos si muestran el suficiente cambio que hay del grupo patológico con respecto al del tratamiento (Figura 16).

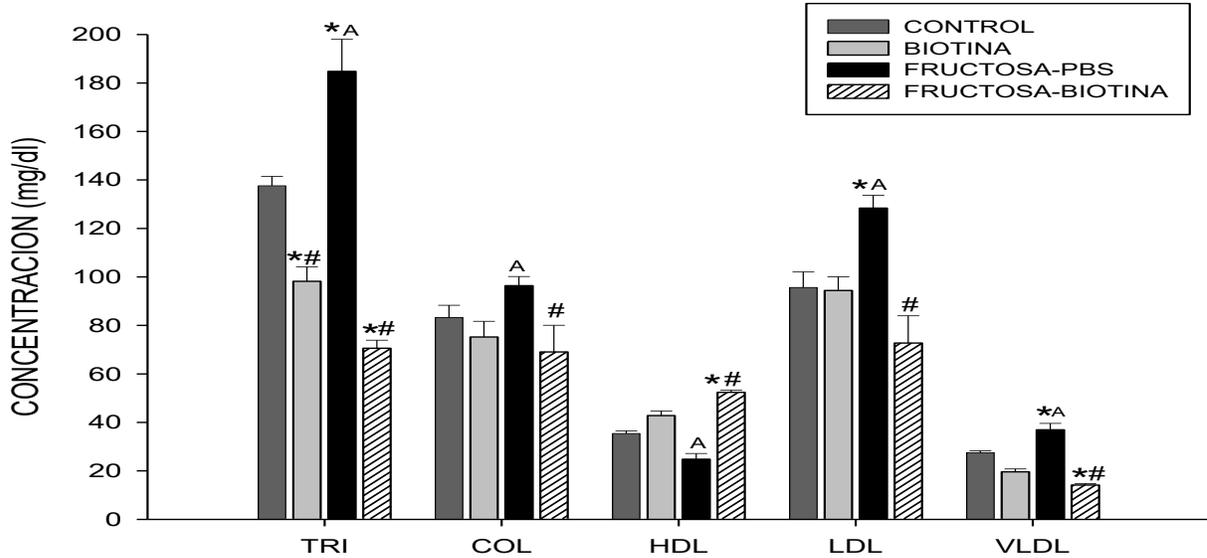


Figura 16.2 Perfil de lípidos. Los valores representan la media \pm error estándar, de una $n=8$, ANOVA post Tukey. * $P<0.05$ diferencia significativa vs Control, # $P<0.05$ diferencia significativa vs Fructosa-pbs, A $P <0.05$ diferencia significativa Fructosa-pbs vs Biotina y Fructosa-biotina.

7.5.-Contenido de triglicéridos y colesterol de tejido hepático

Se encontró que los triglicéridos hepáticos de los grupos Biotina, Fructosa-pbs y Fructosa-biotina tienen cambio significativo ($P < 0.05$) con respecto al Control. También se observó que el grupo Fructosa-pbs tiene una gran diferencia con respecto a todos los demás grupos, siendo más marcado si lo contrastamos con el grupo de Fructosa-biotina siendo muy similar con los niveles séricos reportados. Por otra parte, no se observó cambio significativo en el colesterol entre todos los grupos y el Control y un cambio significativo ($P < 0.05$) entre la Fructosa-pbs y los grupos tratados de la Biotina y la Fructosa-biotina (Figura 17).

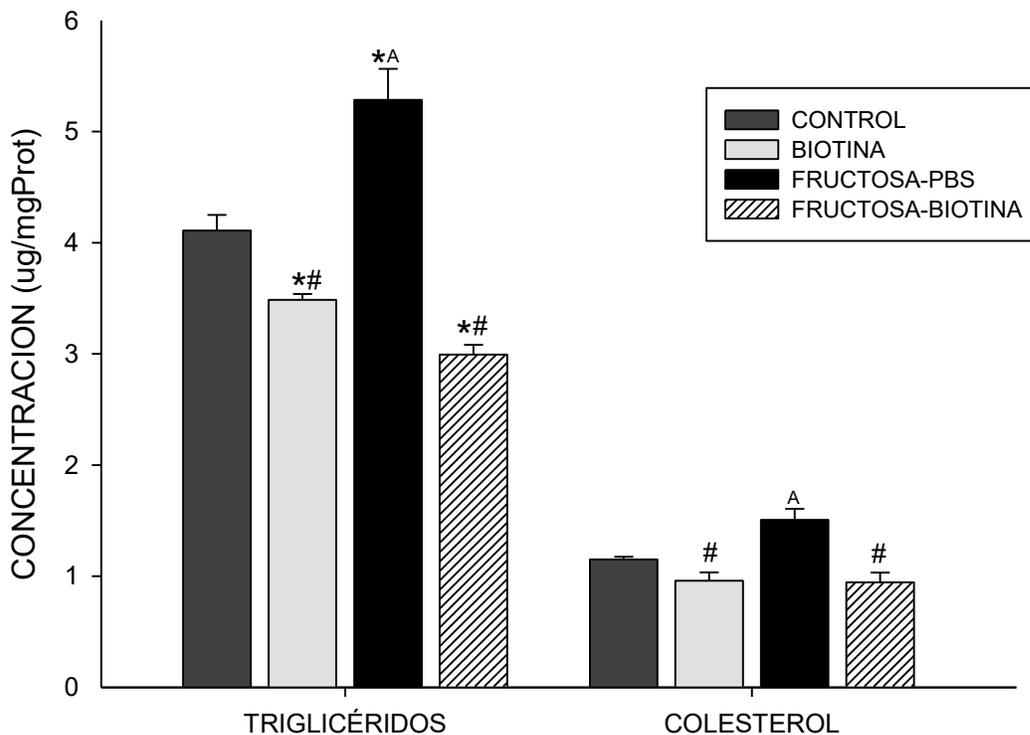


Figura 17. Triglicéridos y colesterol de tejido hepático. Los valores representan la media \pm error estándar, de una n=8, ANOVA post Tukey. * $P < 0.05$ diferencia significativa vs Control, # $P < 0.05$ diferencia significativa vs Fructosa-pbs, A $P < 0.05$ diferencia significativa Fructosa-pbs vs Biotina y Fructosa-biotina.

7.6.-Determinación de glucosa, ácido úrico séricos y pruebas de función hepática

Los valores determinados son iguales a los reportados en la curva de glucosa en el tiempo 0 lo que confirma nuestros resultados, los grupos Fructosa-pbs y Fructosa-biotina tienen cambio significativo ($P < 0.05$) con respecto al Control. También se observa una hiperglicemia en el grupo Fructosa-pbs con respecto a los tratamientos con Biotina y Fructosa-biotina (Figura 18). En el ácido úrico los grupos Biotina y Fructosa-pbs tiene cambio significativo con respecto al Control, el Grupo Biotina y Fructosa-pbs muestran una gran variación (Figura 19).

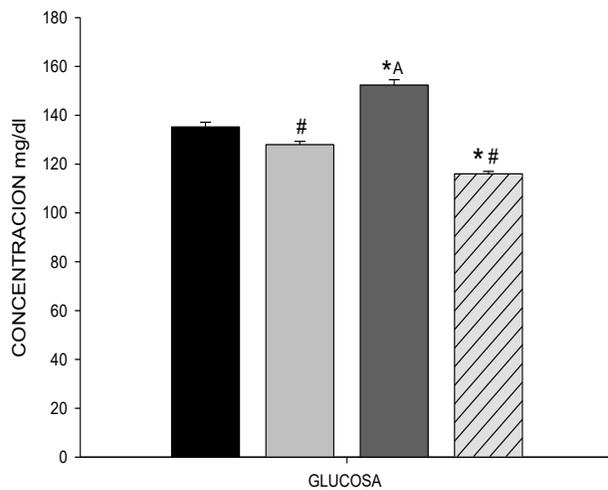


Figura 18. Determinación de glucosa. Los valores representan la media \pm error estándar, de una n=8, ANOVA post TUKEY. * P <0.05 diferencia significativa vs Control, # P <0.05 diferencia significativa vs Fructosa-pbs, A P <0.05 diferencia significativa Fructosa pbs vs biotina y Fructosa-biotina.

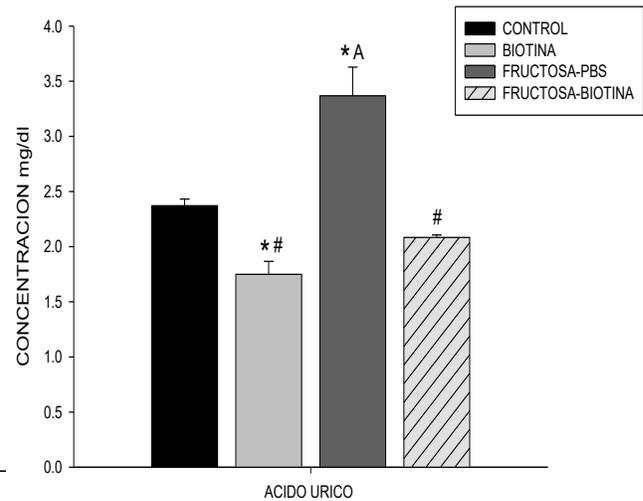


Figura 19. Determinación de ácido úrico. Los valores representan la media \pm error estándar, de una n=8, ANOVA post TUKEY. * P <0.05 diferencia significativa vs Control, # P <0.05 diferencia significativa vs Fructosa-pbs, A P <0.05 diferencia significativa Fructosa pbs vs Biotina y Fructosa-biotina.

Las pruebas de funcionamiento hepático muestran también cambios significativos ($P < 0.05$). En la TGO el grupo Fructosa-pbs y Fructosa-biotina con respecto al grupo Control hay diferencia significativa, se muestra además una gran variación del grupo patológico Fructosa-pbs con respecto a los tratados con Biotina y Fructosa-biotina, el grupo de Biotina no tiene cambios significativos respecto al Control, pero el mejor cambio significativo se observa entre el grupo Fructosa-pbs y el grupo Fructosa-biotina, mostrando que los tratamientos con biotina mejoran las condiciones de la función hepática del grupo patológico Fructosa-pbs. Las Pruebas de TGP y F.ALC muestran el mismo patrón de comportamiento entre los grupos y con los mismos cambios significativos, esto se espera debido a que los valores de este conjunto de pruebas de función hepática presentan valores similares, validando así nuestros resultados para un modelo de síndrome metabólico (Figura 20).

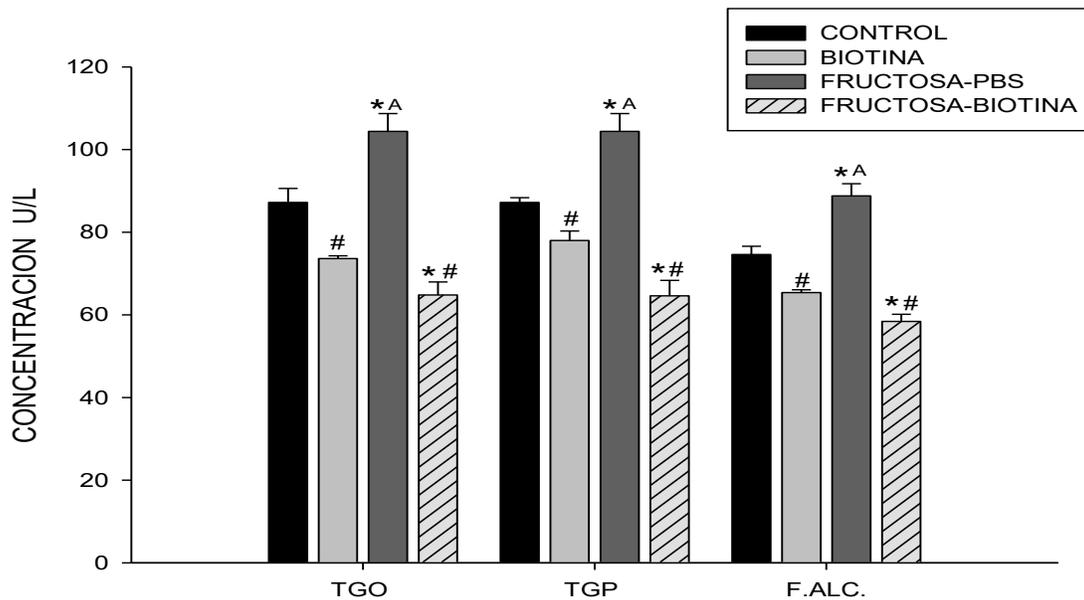


Figura 20. Transaminasa glutámico oxalacética, transaminasa glutámico pirúvica y fostasa alcalina. Los valores representan la media \pm error estándar, de una n=8 por grupo, ANOVA post TUKEY. * $P < 0.05$ diferencia significativa vs Control, # $P < 0.05$ diferencia significativa vs Fructosa-pbs, A $P < 0.05$ diferencia significativa Fructosa-pbs vs Fructosa-biotina.

Por otra parte, los valores de LDH tuvieron cambios significativos ($P < 0.05$), igual que los anteriores el grupo Fructosa-pbs y Fructosa-biotina con respecto al Control, el grupo biotina no tuvo cambio significativo con respecto al Control, teniendo también cambio significativo ($P < 0.05$) entre el grupo Fructosa-pbs y el grupo Biotina, pero el más notorio es el Fructosa-pbs y la Fructosa-biotina donde la diferencia es muy alta, Por último, el resultado de la GGT entre los grupos Biotina, Fructosa-pbs y fructosa-biotina con respecto al Control fue muy bajo, además no hubo cambios significativos entre los grupos Control, Fructosa-pbs y Fructosa-biotina (Figura 21).

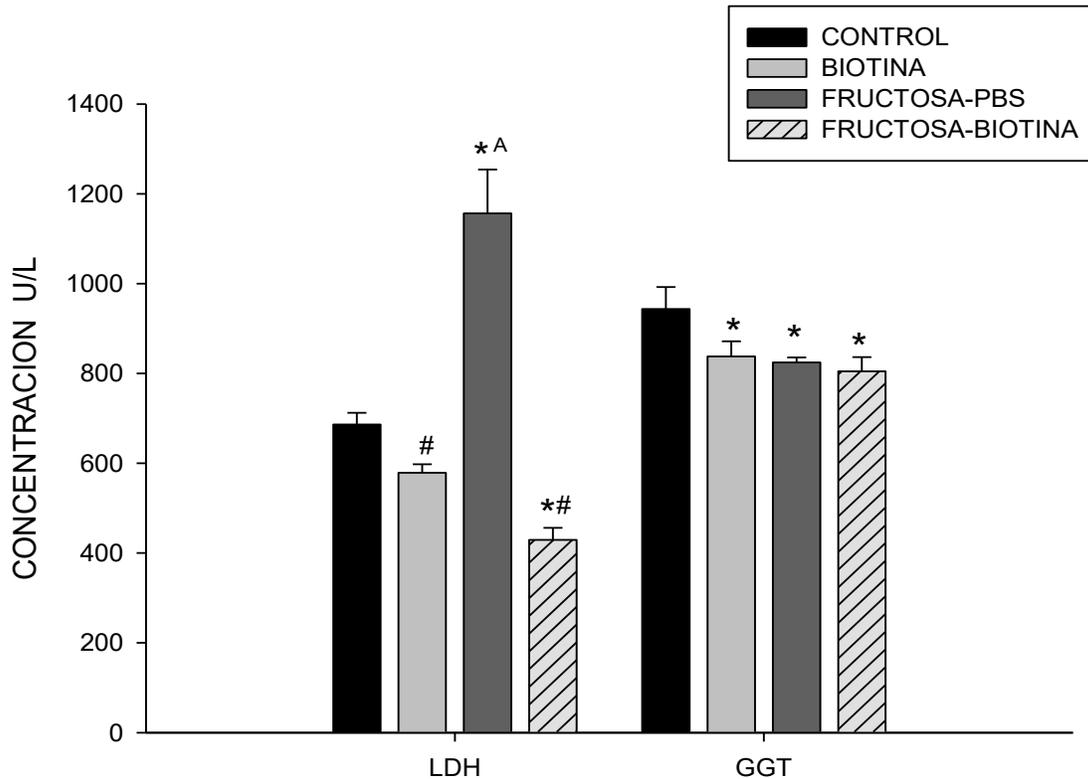


Figura 31. Deshidrogenasa láctica y gama glutamil transpeptidasa. Los valores representan la media \pm error estándar, de una n=8 por grupo, ANOVA post TUKEY. * $P < 0.05$ diferencia significativa vs Control, # $P < 0.05$ diferencia significativa vs Fructosa-pbs A $P < 0.05$ vs Fructosa-biotina.

7.7.-Lipoperoxidación de tejido hepático

Se obtuvo cambio significativo ($P < 0.05$) entre los grupos Biotina, Fructosa pbs y Fructosa biotina con respecto al control. También se obtuvo un valor muy alto para el grupo Biotina y Fructosa-biotina con respecto al grupo Fructosa-Pbs. Se observó también el cambio significativo ($P < 0.05$) entre la Fructosa-pbs y el tratamiento con el grupo Fructosa-biotina donde el valor es muy por debajo del control (Figura 22).

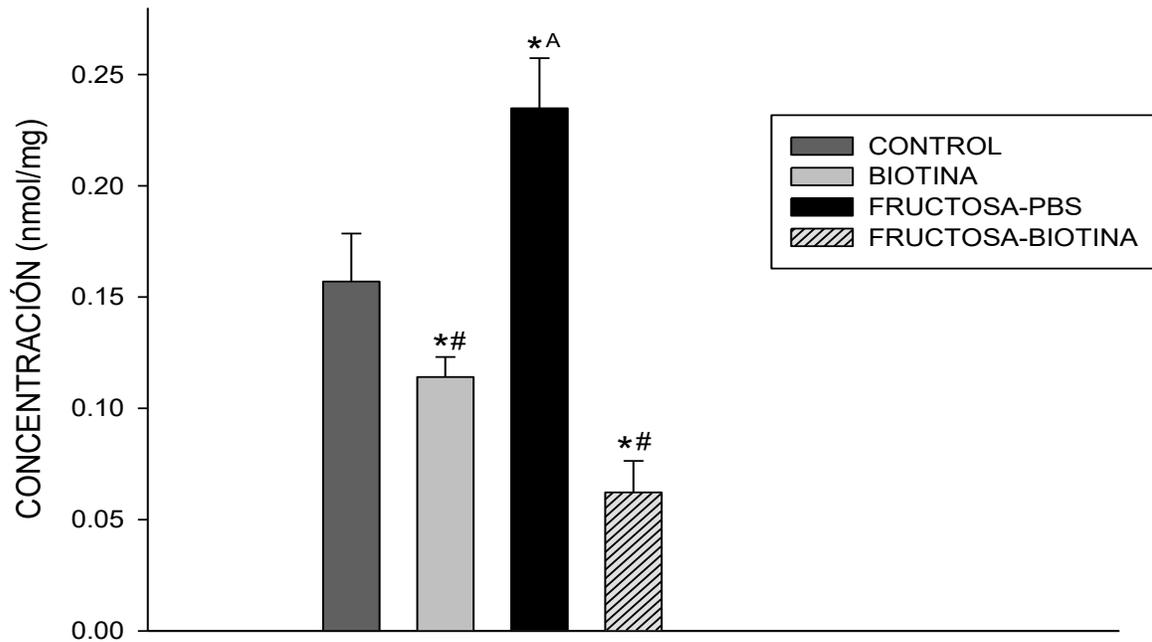


Figura 22. Lipoperoxidación. Los valores representan la media \pm error estándar, de una n=8 por grupo, ANOVA post Tukey. * $P < 0.05$ diferencia significativa vs Control, # $P < 0.05$ diferencia significativa vs Fructosa-pbs, A $P < 0.05$ diferencia significativa Fructosa-pbs vs Biotina.

7.8.-Cuantificación de óxido nítrico de tejido hepático

Se observó que los grupos Biotina y Fructosa-Biotina tuvieron un cambio significativo ($P < 0.05$) con respecto al control, no obteniéndose cambios entre el grupo Fructosa-pbs con respecto al Control. Por otra parte, el cambio más significativo ($P < 0.05$) es el del grupo Fructosa-pbs con respecto al grupo Fructosa-biotina (Figura 23).

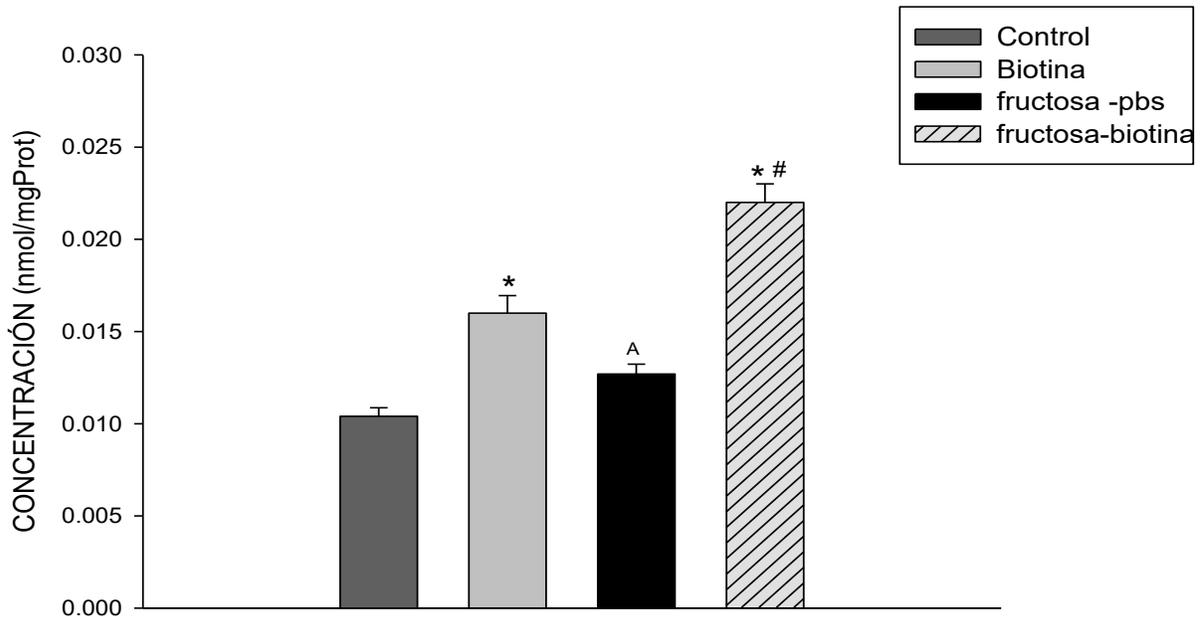


Figura 23. Óxido nítrico en tejido hepático. Los valores representan la media \pm error estándar, de una n=8, ANOVA post Tukey. * P<0.05 diferencia significativa vs Control, # P<0.05 diferencia significativa vs Fructosa-pbs, A P<0.05 diferencia significativa Fructosa-pbs vs Fructosa-biotina.

7.9.-Análisis histomorfológicos

De los análisis histomorfológicos se observó, que en los cuatro grupos experimentales hay dilatación leve de los sinusoides, los hepatocitos son de citoplasma moderado, eosinófilos con núcleos grandes regulares, basófilos con nucléolos evidentes. En cuanto a la presencia de microvacuolas intracitoplasmáticas sugestivas de grasa del parénquima hepático, se observó una mayor cantidad en el grupo Fructosa-pbs alrededor del 60 %, en menor cantidad el grupo Control 20%, en el grupo Biotina 10% y el grupo Fructosa-biotina 5%. También se observó que el grupo Fructosa-pbs presenten un discreto infiltrado inflamatorio de tipo crónico en la triada portal, la vena centrolobulillar congestiva y pequeños vasos venosos con congestión vascular moderada. No se observaron atipias, fibrosis ni necrosis. Sin embargo, si se observó esteatosis hepática establecida. En el grupo Fructosa-Biotina se observó una marcada disminución de macrovacuolas y microvacuolas intracitoplasmáticas en el parénquima hepático con respecto al grupo Fructosa-pbs y también una disminución en la inflamación de la triada portal, la vena centrolobulillar

y los pequeños vasos vasculares. Se observó una leve disminución en las macrovacuolas en el grupo Biotina y con respecto al grupo Control (Figura 24).

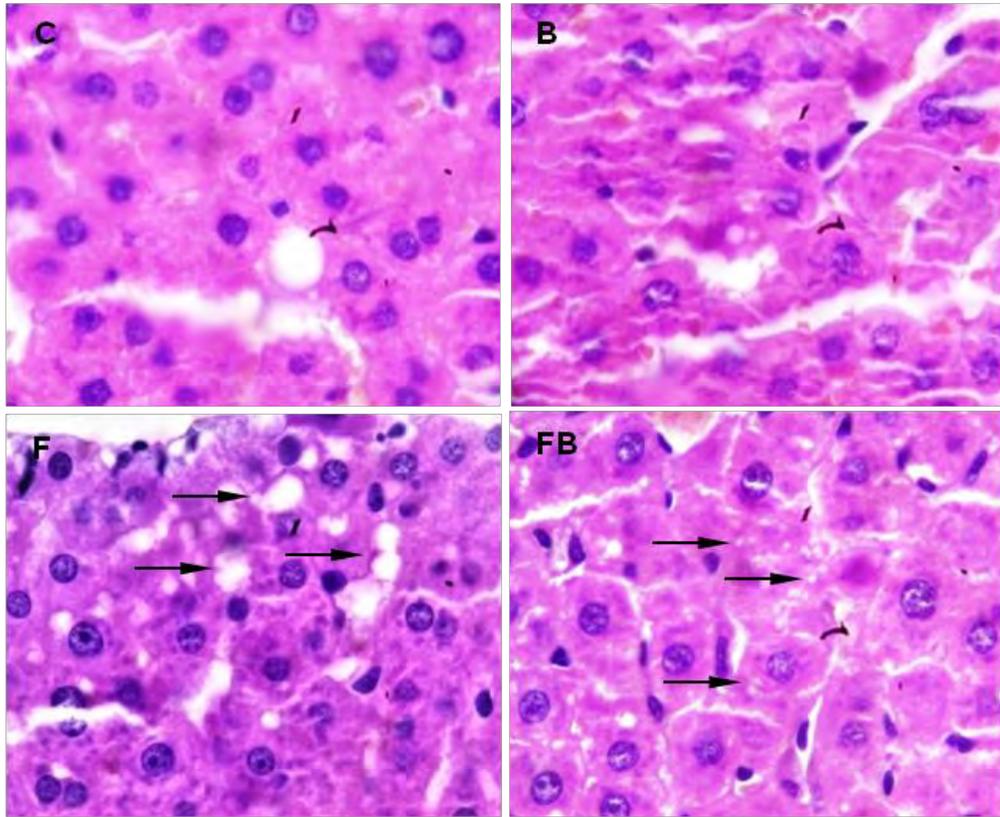


Figura 24. Microfotografías histopatológicas. Realizadas con tinción de Hematoxilina y Eosina de las secciones hepáticas. Grupo de Control (C), arquitectura hepática normal, sin vesiculación del citoplasma de los hepatocitos. Grupo de Biotina (B), apariencia hepática normal como grupo de control. Fructosa-pbs grupo (F), que muestra esteatosis macrovesicular (flechas). Fructosa-biotina (FB), esteatosis macrovesicular se redujo (flechas). Aumento 450 X. (n = 8).

8.-DISCUSIÓN

Varios estudios han demostrado que la biotina reduce los lípidos séricos y la hiperglucemia (Fernandez y Lazo de la Vega, 2011; Fernandez et al., 2017), así como la hipertensión (Watanabe et al., 2008). También, se ha reportado que la biotina en ratas sanas reduce el contenido de triglicéridos hepáticos (Aguilera et al., 2012). Sin embargo, no se ha reportado que la biotina a concentraciones farmacológicas, modifique todas estas condiciones en un modelo con un reto metabólico como lo es síndrome metabólico. Por otro lado, se ha demostrado que el consumo elevado de fructosa como endulzante en bebidas y alimentos procesados está fuertemente relacionado con el desarrollo del síndrome metabólico (Kelishadi et al., 2014; Lozano et al., 2016). Además, diversos estudios en roedores han evidenciado que la suplementación de fructosa en el agua de beber promueve la aparición de resistencia a la insulina, hiperglucemia, hipertrigliceridemia, reducción del colesterol HDL, hipertensión e hígado graso no alcohólico (Ibrahim et al., 2015; Mahmoud y Elshazly, 2014). En el presente trabajo demostramos en un modelo de síndrome metabólico desarrollado por consumo crónico de fructosa, que la biotina mejoró varias de sus manifestaciones, mejorando significativamente la esteatosis hepática no alcohólica.

Observamos que el consumo de agua y alimento fue ligeramente menor en las ratas tratadas con fructosa, siendo estadísticamente no significativa. Lo cual pudo deberse a una disminución en la palatabilidad y tampoco hubo cambios estadísticamente significativos en el consumo de alimento y peso corporal.

La intolerancia a la glucosa es uno de los principales componentes del síndrome metabólico y se relaciona con la progresión a la diabetes tipo 2. Los cambios en los niveles de glucosa en sangre después de la administración de un bolo de glucosa proveen información sobre la resistencia a la insulina y la función endocrina del páncreas. La suplementación con fructosa incrementó la glucosa en sangre en ayuno de las ratas del grupo Fructosa-pbs y disminuyó la tolerancia a la glucosa. Por lo que nuestros resultados están de acuerdo con otros estudios realizados en ratones, ratas y humanos (Aldahmash et al., 2016; Zhang et al., 1997)

Maebashi, et al., 1993). Por el contrario, el tratamiento con biotina redujo significativamente los niveles de glucosa en ayuno y mejoró la tolerancia a la glucosa en las ratas del grupo Fructosa-Biotina. Se ha reportado que la fructosa produce un incremento en la gluconeogénesis en ratas machos, tanto *in vivo* como *in vitro* (Bizeau y Pagliassotti, 2005). El efecto hipoglucemiante de la biotina a dosis farmacológica se puede relacionar con una disminución en la expresión de genes críticos de la gluconeogénesis, como la PEPCK (Dakshinamurti et al., 1994) y la glucosa-6-fosfatasa (Sugita et al., 2008). Además, de aumentar la expresión en genes relacionados con la glucólisis como: la glucocinasa hepática (Vilches et al., 2010; Chauhan y Dakshinamurti, 1991; Borboni et al., 1996) y el receptor de insulina (De la Vega et al., 2000). También Romero y colaboradores demostraron un aumento en la expresión y secreción de insulina en islotes pancreáticos de ratas en respuesta a biotina (Romero et al., 1999).

La dislipidemia es un componente característico del síndrome metabólico, se ha demostrado que la ingesta crónica de fructosa promueve la lipogénesis hepática, incrementando tanto la acumulación de éstos en el hígado, así como su secreción y aumento en la sangre (Basaranoglu et al., 2013; Jegatheesan y De Bandt, 2017). Aguilera y otros autores han reportado una reducción en el contenido de triglicéridos séricos y hepáticos en los grupos tratados con biotina, pero es necesario señalar que esto fue en roedores sanos (Aguilera et al., 2012; Larrieta et al., 2010; Marshall et al., 1976). En los grupos con Fructosa incrementó significativamente la concentración de triglicéridos y colesterol en sangre e hígado, coincidiendo con lo que se ha reportado de que la fructosa aumenta los triglicéridos séricos y hepáticos (Bizeau et al., 2005). En el contenido de colesterol sérico y hepático no hubo cambios en el grupo Biotina, lo cual está de acuerdo con estudios realizados en ratas (Suchy et al., 1986) y en humanos (Revilla et al., 2006), donde no observaron un efecto de la biotina sobre las concentraciones séricas de colesterol total. Sin embargo, con los estudios realizados se demuestra por primera vez que en los niveles de colesterol hepático si hubo una disminución en las ratas alimentadas con fructosa y tratadas con biotina. Por otro lado, la disminución del contenido de

colesterol y triglicéridos hepáticos, coincidió con las histologías de hematoxilina y eosina, donde se observó una disminución en el contenido de vacuolas lipídicas en el grupo Fructosa-Biotina en comparación con el grupo Fructosa-pbs. De igual forma varios autores han observado que la biotina mejora las características histopatológicas en varios órganos de ratas y ratones diabéticos y alimentados con dietas altas en grasa (Sahin et al., 2013; Aldahmash et al., 2016; Aldahmash et al., 2015).

En el perfil de lipoproteínas se observó un incremento de LDL y una disminución de HDL en los grupos tratados con fructosa de acuerdo a lo reportado por otros autores (Ibrahim et al., 2015; Guzmán et al., 2016). En los grupos tratados con biotina observamos una disminución en las LDL y un aumento en las HDL solo en el grupo Fructosa-Biotina, sin cambios significativos en el grupo Biotina, lo cual es acorde con los resultados del colesterol total sérico en los mismos grupos. Aunque no se conocen completamente los mecanismos moduladores sobre el metabolismo lipídico por concentraciones farmacológicas de biotina, Aguilera y Fernández en el 2012 encontraron que en ratones sanos había una disminución en la concentración de triglicéridos hepáticos y propusieron que la reducción está relacionada con una disminución en la masa proteica del factor transcripcional SREBP-1c, el cual se ha demostrado que incrementa su expresión con el tratamiento crónico de fructosa (Tappy et al., 2010). También observaron una disminución en la masa total de la enzima FAS y fosforilación de la carboxilasa ACC 1 (lo cual la inactiva y reduce la síntesis de malonil-CoA indispensable para el inicio de la lipogénesis) y de la cinasa AMPK, la cual a su vez es clave en el control de la síntesis de lípidos fosforilando e inactivando a la ACC 1. La cinasa AMPK está relacionada de manera importante en varias enfermedades asociadas al síndrome metabólico (Viollet et al., 2006). Además, Aguilera y colaboradores encontraron que la suplementación con biotina en ratones sanos disminuyó la concentración de ácidos grasos libres en suero (Boone et al., 2015), los cuales pueden ser captados por el hígado y servir de sustratos para la esterificación (Aguilera et al., 2013), por lo que al disminuir contribuyen a una reducción en la concentración de triglicéridos. También Larrieta demostró que la suplementación con biotina en ratones sanos reduce el mRNA de genes

relacionados con la síntesis de lípidos tanto en el tejido adiposo, como en el hígado (Larrieta et al., 2010). De esta manera, el tratamiento farmacológico con biotina en un modelo de síndrome metabólico tiene un efecto hipolipemiante al disminuir el flujo de ácidos grasos hacia el hígado e inhibir la lipogénesis hepática y en consecuencia la esteatosis hepática.

Los parámetros de la función hepática (ALT, AST y LDH) en las ratas tratadas con fructosa tuvieron valores superiores, lo que indica la posible alteración en la membrana plasmática de los hepatocitos, lo cual provoca una salida de estas enzimas a los fluidos extracelulares y son indicativas de esteatosis hepática. En el grupo Biotina no hubo cambios en los valores de las transaminasas, lo cual también reportaron Riveron y colaboradores donde observaron que la suplementación con biotina en ratones sanos, no modificó los valores de las transaminasas (Riverón et al., 2016). Sin embargo, en nuestros resultados se observó una disminución en el grupo Fructosa-Biotina, lo cual coincidió con lo reportado por otros autores, tanto en ratones diabéticos (Aldahmash et al., 2015), como en ratas diabéticas y alimentadas con una dieta alta en grasa (Sahin et al., 2013), donde observaron una disminución en las transaminasas en los animales tratados con biotina. Lo que indicaría que la biotina restablece el desbalance metabólico en el hígado en modelos diabéticos y por primera vez se demuestra que también en un modelo de síndrome metabólico.

En la lipoperoxidación hepática no observamos cambios en el grupo Biotina con respecto al Control. Riveron y colaboradores tampoco observaron cambios en los valores de estrés oxidativo en ratones sanos tratados con biotina (Riverón et al., 2016). Por el contrario, en el grupo Fructosa-pbs se observó un marcado aumento en la lipoperoxidación hepática, mientras que cuando fueron tratadas con biotina (grupo Fructosa-biotina) hubo una hasta llegar a valores parecidos a los de los grupos Control y Biotina. Se ha reportado que el consumo crónico de fructosa provoca un incremento en la lipoperoxidación hepática, ya que una de las enzimas claves en el metabolismo de la fructosa es la fructoquinasa I, que a diferencia de la glucocinasa, es específica para la fructosa y no es retro inhibida por el producto, de tal manera que la fosforilación de concentraciones elevadas de fructosa en el hígado puede agotar el ATP, lo que a su vez puede inducir lipoperoxidación lipídica,

inflamación y daño hepático (Tappy et al., 2010). Además, la hiperglicemia contribuye a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo cual causa daño celular de muchas maneras (Aldahmash et al., 2016). Por lo tanto, al ser inhibida la lipogénesis, la gluconeogénesis y mejorar la sensibilidad a insulina por la biotina, provoca un decremento en la formación de especies reactivas de oxígeno que contribuyen a la lipoperoxidación en el grupo alimentado con fructosa.

El ON media múltiples efectos biológicos de los sistemas cardiovascular, inmunitario, nervioso, reproductor y neurotransmisor atípico, pero también se ha descubierto que regula funciones biológicas del metabolismo. La vía de señalización ON/GCs/GMPc media efectos reguladores clave de enzimas de la síntesis y oxidación de ácidos grasos en el hígado, entre ellas ACC que parecen depender de activación de PKG (V. J. Garcia et al., 2003). También se ha demostrado que una baja concentración de ON puede ser uno de los factores que provocan hiperlipidemia, decremento del aclaramiento de las lipoproteínas, aterosclerosis y problemas de hipertensión y de forma inversa valores altos de ON disminuyeron la hiperlipidemia (Baylis et al., 1992; Khedara et al., 1996). De los resultados obtenidos se observó que concuerdan con lo señalado anteriormente, el ON se vio incrementado en los grupos tratados con biotina (Biotina y Fructosa-biotina), además estos mismos grupos tienen valores disminuidos de lípidos. También se observó que los grupos no tratados con biotina (Control y Fructosa-pbs), tienen valores bajos de ON y valores altos de lípidos, con lo anterior se demostró además que la biotina aumento los valores de ON. Se ha comprobado que el ON activa la enzima GCs uniéndose al grupo hemo alterando su conformación y aumentando su catálisis (Ignarro,1990), esta enzima a su vez cataliza la formación de GMPc. Por otra parte, se ha propuesto que la biotina podría estar ejerciendo la capacidad de activar GCs que desencadena en el mecanismo de señalización a través de la vía GC/GMPc/PKG (Vilches et al., 2005) y por lo tanto se deba el aumento del ON.

9.-CONCLUSIONES

1. Se estandarizó un modelo de síndrome metabólico con esteatosis hepática en ratas alimentadas con fructosa al 15 %.
2. La administración de biotina diariamente durante un mes disminuyó los valores de glucosa en ayuno y postprandial a valores normales en ratas con síndrome metabólico.
3. La biotina redujo la concentración en suero de triglicéridos, colesterol, LDL y VLDL, y aumento la concentración de HDL en ratas con síndrome metabólico.
4. La biotina disminuyó las concentraciones de triglicéridos y colesterol hepático en ratas con síndrome metabólico.
5. La biotina disminuyó las concentraciones séricas de ácido úrico, amino lactato transaminasa (ALT), amino aspartato transaminasa (AST), deshidrogenasa láctica (DHL), fosfatasa alcalina (FA) y gama glutamil transferasa (GGT), en ratas con síndrome metabólico.
6. La biotina redujo el estrés oxidativo hepático en ratas alimentadas con fructosa.

10.-BIBLIOGRAFÍA

- Ackerman, Zvi, Mor Oron-Herman, Maria Grozovski, Talma Rosenthal, Orit Pappo, Gabriela Link y Ben-Ami Sela. 2005. "Fructose-Induced Fatty Liver Disease: Hepatic Effects of Blood Pressure and Plasma Triglyceride Reduction." *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 45 (5):1012-18.
- Adams, L A. y P. Angulo. 2006. "Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." *Postgraduate Medical Journal* 82 (967):315-22.
- Aguilar, Salinas Carlos A, Rosalba Rojas, Pérez Francisco J Gómez, Victoria Valles, Torres Juan Manuel Ríos, Aurora Franco, Gustavo Olaiiz, Juan A Rull y Jaime Sepúlveda. 2004. "High Prevalence of Metabolic Syndrome in Mexico." *Archives of Medical Research* 35 (1):76-81.
- Aguilera, Méndez Asdrubal y Cristina Fernández. 2012. "The Hypotriglyceridemic Effect of Biotin Supplementation Involves Increased Levels of CGMP and AMPK Activation." *BioFactors* 38 (5):387-94.
- Aguilera, Méndez Asdrubal. 2018. "Esteatosis Hepática No Alcohólica: Una Enfermedad Silente." *Revista Médica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social*. aceptado
- Aguilera, Méndez Asdrubal, Delgado Carolina Álvarez, Mejia Fernandez, Godinez Daniel Hernández y Cristina. 2013. "Hepatic Diseases Related to Triglyceride Metabolism." *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 13 (12):1691-1699.
- Alban, Claude, Dominique Job, Douce y Roland. 2000. "BIOTIN METABOLISM IN PLANTS." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51 :17-47.
- Albarracin, Cesar A, Burcham C Fuqua, Joseph L Evans y Ira D Goldfine. 2008. "Chromium Picolinate and Biotin Combination Improves Glucose Metabolism in Treated, Uncontrolled Overweight to Obese Patients with Type 2 Diabetes." *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 24 (1):41-51.
- Albarracin, Cesar, Burcham Fuqua, Jeff Geohas, Vijaya Juturu, Manley R Finch y James R Komorowski. 2007. "Combination of Chromium and Biotin Improves Coronary Risk Factors in Hypercholesterolemic Type 2 Diabetes Mellitus: A Placebo-Controlled, Double-Blind Randomized Clinical Trial." *Journal of the Cardiometabolic Syndrome* 2 (2):91-97.
- Alberti, K. G M M, Robert H. Eckel, Scott M. Grundy, Paul Z. Zimmet, James I. Cleeman, Karen A. Donato, Jean Charles Fruchart, W. Philip T James, Catherine M. Loria y Sidney C. Smith. 2009. "Harmonizing the Metabolic Syndrome: A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International ." *Circulation* 120 (16):1640-45.
- Albrink, M. J. y J. W. Meigs. 1964. "Interrelationship between Skinfold Thickness, Serum Lipids and Blood Sugar in Normal Men." *The American Journal of Clinical Nutrition* 15 :255-61.
- Aldahmash, Badr A, Doaa M El-Nagar, Khalid E Ibrahim y Mahmoud S Metwaly. 2015. "Biotin Amelioration of Nephrotoxicity in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice." *Saudi Journal of Biological Sciences* 22(5):564-569.
- Aldahmash, Badr Abdullah, Doaa Mohamed El-Nagar, Khalid Ibrahim y Elfakki. 2016. "Attenuation of Hepatotoxicity and Oxidative Stress in Diabetes STZ-Induced Type 1 by Biotin in Swiss Albino Mice." *Saudi Journal of Biological Sciences* 23 (2): 311-17.

- Ali, Asem H, Christina Koutsari, Manpreet Mundi, Mark D Stegall, Julie K Heimbach, Sandra J Taler y Jonas Nygren. 2011. "Free Fatty Acid Storage in Human Visceral and Subcutaneous Adipose Tissue: Role of Adipocyte Proteins." *American Diabetes Association* (9):2300-2307.
- Alisi, Anna, Melania Manco, Nadia Panera y Valerio Nobili. 2009. "Association between Type Two Diabetes and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Youth." *Annals of Hepatology* 8 Suppl1:S44-50.
- Almeda, Valdés Paloma, Daniel Cuevas-Ramos, Carlos Alberto Aguilar-Salinas y Carlos A Aguilar Salinas. 2009. "Metabolic Syndrome and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." *Annals of Hepatology* 8 (81):18-24.
- Álvarez, Gómez AM, Lidia Cardellá Rosales, Rodríguez y Gisela Pita. 2012. "Consumo Elevado de Fructosa y Su Posible Influencia Sobre El Metabolismo Lipídico." *Rev Cubana Aliment Nutr* 22 (2): 287-300.
- Anderson, Nora y Jürgen Borlak. 2008. "Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets in Steatosis and Steatohepatitis." *Pharmacological Reviews* 60 (3):LP311-357.
- Angulo, P. 2007. "GI Epidemiology: Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 25 (8):883-89.
- Ashman, D F, R Lipton, M M Melicow y T D Price. 1963. "Isolation of Adenosine 3',5'-Monophosphate and Guanosine 3',5'-Monophosphate from Rat Urine." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 11 (4):330-34.
- Ashmore, James, J. H. Kinoshita, F. B. Nesbett y A. B. Hastings. 1956. "Studies on Carbohydrate Metabolism in Rat Liver Slices." *J. Biol. Chem* 220:619-26.
- Athyros, Vasilios G, Konstantinos Tziomalos, Asterios Karagiannis y Dimitri P Mikhailidis. 2011. "Dyslipidaemia of Obesity, Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes Mellitus: The Case for Residual Risk Reduction after Statin Treatment." *The Open Cardiovascular Medicine Journal* 5:24-34.
- Attar, Bashar M y David H Van Thiel. 2013. "Current Concepts and Management Approaches in Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *TheScientificWorldJournal* :481893.
- Ayala, I, P Cámara, I Flores, A I Cascales, Gutiérrez Panizo, M Valdés, M T Castells y García Pérez B. 2008. "Experimental Animal Models of Fatty Liver Disease and Metabolic Syndrome." *Anales de Veterinaria de Murcia* 16:5-16.
- Badui, Dergal Salvador. 2006. *Química de Los Alimentos*. PEARSON ED. Mexico.
- Báez S. A., R. I. Zendejas, M. C. Revilla, A. S. Islas, A. Cárdenas, O. A. Rojas, A. Vilches y C. F. Mejía. 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." *The American Journal of Clinical Nutrition* 79 (2):238-43.
- Banting, FG y Best. 1922. "The Internal Secretion of the Pancreas." *J Lab Clin Med* 7:251-66.
- Basaranoglu, Metin, Gokcen Basaranoglu, Tevfik Sabuncu y Hakan Senturk. 2013. "Fructose as a Key Player in the Development of Fatty Liver Disease." *World Journal of Gastroenterology* 19 (8):1166-72.
- Basciano, Heather, Lühning Federico, Adeli y Khosrow. 2005. *Basciano H, Federico L, Adeli K. Fructose, Insulin Resistance, and Metabolic Dyslipidemia. Nutr Metab (Lond) 2, 5. Nutrition & Metabolism* 2:5.
- Bayard, Max, Jim Holt, Boroughs y Eileen. 2006. "Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *American Family Physician* 73 (11): 1961-68.
- Baylis, C, B Mitruka y Deng A. 1992. "Chronic Blockade of Nitric Oxide Synthesis in the Rat Produces Systemic Hypertension and Glomerular Damage." *The Journal of Clinical Investigation* 90 (1): 278-81.
- Bertolani, Cristiana y Fabio Marra. 2008. "The Role of Adipokines in Liver Fibrosis."

- Pathophysiology* 15 (2): 91-101.
- Bizeau, Michael E y Michael J Pagliassotti. 2005. "Hepatic Adaptations to Sucrose and Fructose." *Metabolism* 54 (9): 1189-1201.
- Blaschke, Florian, Y. Takata, E. Caglayan, A. Collins, P. Tontonoz, W. A Hsueh y Rajendra K. Tangirala. 2006. "A Nuclear Receptor Corepressor-Dependent Pathway Mediates Suppression of Cytokine-Induced C-Reactive Protein Gene Expression by Liver X Receptor." *Circulation Research* 99 (12): 88-99.
- Bloomgarden y Zachary T. 2011. "World Congress on Insulin Resistance, Diabetes, and Cardiovascular Disease: Part 1." *Diabetes Care* 34(7):115-120.
- Bodor, E T y S Offermanns. 2008. "Nicotinic Acid: An Old Drug with a Promising Future." *British Journal of Pharmacology* 153: S68-75.
- Boettcher, E., G Csako, F Pucino, R Wesley y R Loomba. 2012. "Meta-Analysis: Pioglitazone Improves Liver Histology and Fibrosis in Patients with Non-Alcoholic Steatohepatitis." *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 35(1):66-75.
- Boone, Villa Daniel, Mendez Asdrubal Aguilera, Cervantes Adriana Miranda y Mejia Cristina Fernandez. 2015. "Effects of Biotin Supplementation in the Diet on Adipose Tissue CGMP Concentrations, AMPK Activation, Lipolysis, and Serum-Free Fatty Acid Levels". *Journal of Medicinal Food*. 8(10):1150-6.
- Borboni P., R. Magnaterra, R. A. Rabini, R. Staffolani, O. Porzio, G. Sesti, A. Fusco, L. Mazzanti, R. Lauro y L. N. J. L. Marlier. 1996. "Effect of Biotin on Glucokinase Activity, MRNA Expression and Insulin Release in Cultured Beta-Cells." *Acta Diabetologica* 33(2): 154-58.
- Bradford, M. M. 1976. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding." *Analytical Biochemistry* 72: 248 -54.
- Bray, George a., Samara Joy Nielsen, Barry Popkin y M. 2004. "Consumption of High-Fructose Corn Syrup in Beverages May Play a Role in the Epidemic of Obesity." *American Journal of Clinical Nutrition* 79 (4): 537-43.
- Browning, Jeffrey D, Lidia S Szczepaniak, Robert Dobbins, Pamela Nuremberg, Jay D Horton, Jonathan C Cohen, Scott M Grundy y Helen H Hobbs. 2004. "Prevalence of Hepatic Steatosis in an Urban Population in the : Impact of Ethnicity." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 40 (6): 1387-95.
- Brunt, E. M, C. G. Janney, A M Di Bisceglie, B. A. Neuschwander Tetri y B. R. Bacon. 1999. "Nonalcoholic Steatohepatitis: A Proposal for Grading and Staging the Histological Lesions." *The American Journal of Gastroenterology* 94 (9): 2467-74.
- Bugianesi E, A. Gastaldelli, E Vanni, R Gambino, M Cassader, S Baldi, V Ponti, G Pagano, E Ferrannini y M. Rizzetto. 2005. "Insulin Resistance in Non-Diabetic Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Sites and Mechanisms." *Diabetologia* 48 (4): 634-42.
- Bugianesi, E, G Marchesini, McCullough A. y J. 2005. "Insulin Resistance: A Metabolic Pathway to Chronic Liver Disease." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 42 (5): 987-1000.
- Buqué X, P. Aspichueta, B. Ochoa y B. 2008. "Molecular basis of obesity-related hepatic steatosis." *Revista espanola de enfermedades digestivas* 100 (9): 565-78.
- Burt A. D, A Mutton, C Day, and P. 1998. "Diagnosis and Interpretation of Steatosis and Steatohepatitis." *Seminars in Diagnostic Pathology* 15 (4): 246-58.
- Butterworth P. 2005. "Cell Biochemistry and Function" *Lehninger: Principles of Biochemistry (4th Edn)* 23 (4):293-94.
- Carter K. C., N. N. Zein, A. Feldstein y E. 2008. "Cytokines in the Pathogenesis of Fatty Liver and Disease Progression to Steatohepatitis: Implications for Treatment." *The American Journal of Gastroenterology* 103 (4): 1036-42.
- Cave M., I. Deaciuc, C. Mendez, Z. Song, Swati Joshi-Barve, Shirish Barve y C. McClain. 2007. "Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Predisposing Factors and the Role of

- Nutrition." *The Journal of Nutritional Biochemistry* 18 (3): 184-95.
- Centis E., R. Marzocchi, S. Di Domizio, M. F. Ciaravella y G. Marchesini. 2010. "The Effect of Lifestyle Changes in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." *Digestive Diseases* 28 (1): 267-73.
- Cernea S., Avivit Cahn, Raz y Itamar. 2017. "Pharmacological Management of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Type 2 Diabetes." *Expert Review of Clinical Pharmacology* 10 (5): 535-47.
- Cha J.Y. y Joyce J Repa. 2007. "The Liver X Receptor (LXR) and Hepatic Lipogenesis. The Carbohydrate-Response Element-Binding Protein Is a Target Gene of LXR." *The Journal of Biological Chemistry* 282 (1): 743-51.
- Chatterjee N. S., Chandira K Kumar, A. Ortiz, S. A. Rubin y H. M. Said. 1999. "Molecular Mechanism of the Intestinal Biotin Transport Process." *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 277 (4): C605-13.
- Chauhan J. y K. Dakshinamurti. 1991. "Transcriptional Regulation of the Glucokinase Gene by Biotin in Starved Rats." *The Journal of Biological Chemistry* 266 (16): 10035-38.
- Chen G., G. Liang, J. Ou, J. L. Goldstein y M. S. Brown. 2004. "Central Role for Liver X Receptor in Insulin-Mediated Activation of Srebp-1 Transcription and Stimulation of Fatty Acid Synthesis in Liver." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (31):11245-50.
- Cheung F. S. G., F. J. Lovicu, Reichardt y Juergen K V. 2012. "Current Progress in Using Vitamin D y Its Analogs for Cancer Prevention and Treatment." *Expert Review of Anticancer Therapy* 12 (6): 811-37.
- Chisholm, Jeffrey W, Jenny Hong, Scott A Mills y Richard M Lawn. 2003. "The LXR Ligand T0901317 Induces Severe Lipogenesis in the Db/Db Diabetic Mouse." *Journal of Lipid Research* 44 (11): 2039-48.
- Chitturi, S y G C Farrell. 2001. "Etiopathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis." *Seminars in Liver Disease* 21 (1): 27-41.
- Clark, Jeanne M. 2006. "The Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Adults." *Journal of Clinical Gastroenterology* 40 (1):S510.
- Cline, G W, K F Petersen, M Krssak, J Shen, R S Hundal, Z Trajanoski, S Inzucchi, A Dresner, D L Rothman y G I Shulman. 1999. "Impaired Glucose Transport as a Cause of Decreased Insulin-Stimulated Muscle Glycogen Synthesis in Type 2 Diabetes." *The New England Journal of Medicine* 341 (4): 240-46.
- Cohen, N D y M Thomas. 1982. "Biotin Transport into Fully Differentiated 3T3 -L1 Cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 108 (4):1508-16.
- Coleman, Rosalind A y Douglas P Lee. 2004. "Enzymes of Triacylglycerol Synthesis and Their Regulation." *Progress in Lipid Research* 43 (2): 134-76.
- Conlon, Beth A, Jeannette M Beasley, Karin Aebbersold, Sunil S Jhangiani y Judith Wylie Rosett. 2013. "Nutritional Management of Insulin Resistance in Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)." *Nutrients* 5 (10): 4093-4114.
- Contos, Melissa J y Arun J Sanyal. 2002. "The Clinicopathologic Spectrum and Management of Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Advances in Anatomic Pathology* 9 (1): 37-51.
- Corrado, Richele L, Dawn M Torres, Stephen Harrison y A. 2014. "Review of Treatment Options for Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *The Medical Clinics of North America* 98 (1):55-72.
- Cuevas, L., L. T. Shamah, J Dommarco y M. Hernandez. 2016. "Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016. (ENSANUT MC 2016)." *Instituto Nacional de Salud Pública* : 151.
- Cusi, K. 2010. "The Role of Adipose Tissue and Lipotoxicity in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes." *Current Diabetes Reports* 10 (4): 306 -15.
- Cusi, K, K Maezono, A Osman, M Pendergrass, M E Patti, T Pratipanawatr, R A DeFronzo,

- C R Kahn y L J Mandarino. 2000. "Insulin Resistance Differentially Affects the PI 3 - Kinase - and MAP Kinase -Mediated Signaling in Human Muscle." *The Journal of Clinical Investigation* 105 (3):311-20.
- Dakshinamurti, K. y C Cheah -Tan. 1968. "Liver Glucokinase of the Biotin Deficient Rat." *Canadian Journal of Biochemistry* 46 (1):75 -80.
- Dakshinamurti, K y S P Mistry. 1963. "Tissue and Intracellular Distribution of Biotin -C - 1400H in Rats and Chicks." *The Journal of Biological Chemistry* 238 (January): 294-96.
- Dakshinamurti, Krishnamurti, Chauhan, y Jasbir. 1994. "Biotin -Binding Proteins." In *Vitamin Receptors: Vitamins as Ligands in Cell Communication - Metabolic Indicators*, edited by Cambridge University Press :200-249.
- Day, Christopher P y Oliver F W James. 1998. "Steatohepatitis: A Tale of Two hits" *Gastroenterology* 114 (4): 842-45.
- De la Vega, Luis A y Richard J Stockert. 2000. "Regulation of the Insulin and Asialoglycoprotein Receptors via CGMP -Dependent Protein Kinase." *American Journal of Physiology -Cell Physiology* 279 (6):C2037-42.
- DeFronzo, Ralph A. y Eleuterio Ferrannini. 1991. "Insulin Resistance: A Multifaceted Syndrome Responsible for NIDDM, Obesity, Hypertension, Dyslipidemia, and Atherosclerotic Cardiovascular Disease." *Diabetes Care* 14 (3):173 LP -194.
- Dekker, Mark J, Qiaozhu Su, Chris Baker, Angela C Rutledge y Khosrow Adeli. 2010. "Fructose: A Highly Lipogenic Nutrient Implicated in Insulin Resistance, Hepatic Steatosis, and the Metabolic Syndrome." *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 299 (5): E68 -94.
- Di Minno, Matteo Nicola Dario, Anna Russolillo, Roberta Lupoli, Pasquale Ambrosino, Alessandro Di Minno y Giovanni Tarantino. 2012. "Omega -3 Fatty Acids for the Treatment of Non -Alcoholic Fatty Liver Disease." *World Journal of Gastroenterology* 18 (41): 5839-47.
- Diehl, A M, Z Goodman, K Ishak y G. 1988. "Alcohollike Liver Disease in Nonalcoholics. A Clinical and Histologic Comparison with Alcohol -Induced Liver Injury." *Gastroenterology* 95 (4):1056-62.
- Donnelly, Kerry L, Coleman I Smith, Sarah J Schwarzenberg, Jose Jessurun, Mark D Boldt y Elizabeth J Parks. 2005. "Sources of Fatty Acids Stored in Liver and Secreted via Lipoproteins in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *The Journal of Clinical Investigation* 115 (5):1343-51.
- Douard, Veronique y Ronaldo P Ferraris. 2008. "Regulation of the Fructose Transporter GLUT5 in Health and Disease." *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 295 (2): E227-37.
- Ducheix, Simon, Alexandra Montagner, Vassilia Theodorou, Laurent Ferrier y Herve Guillou. 2013. "The Liver X Receptor: A Master Regulator of the Gut -Liver Axis and a Target for Non Alcoholic Fatty Liver Disease." *Biochemical Pharmacology* 86 (1): 96-105.
- Dwyer, Johanna T, Paul M Coates, Smith y Michael J. 2018. "Dietary Supplements: Regulatory Challenges and Research Resources." *Nutrients*.10(1):41.
- Elliott, Sharon S, Nancy L Keim, Judith S Stern, Karen Teff y Peter J Havel. 2002. "Fructose, Weight Gain y the Insulin Resistance Syndrome." *The American Journal of Clinical Nutrition* 76 (5):911-22.
- Escobedo, Jorge, Herman Schargrotsky, Beatriz Champagne, Honorio Silva, Carlos P Boissonnet, Raul Vinueza, Marta Torres, Rafael Hernandez y Elinor Wilson. 2009. "Prevalence of the Metabolic Syndrome in Latin America and Its Association with Sub - Clinical Carotid Atherosclerosis: The CARMELA Cross Sectional Study." *Cardiovascular Diabetology* 8 (1):52.
- Fakhoury, Sayegh Nicole, Viviane Trak -Smayra, Aline Khazzaka, Fady Esseily, Omar Obeid, May Lahoud -Zouein y Hassan Younes. 2015. "Characteristics of Nonalcoholic

- Fatty Liver Disease Induced in Wistar Rats Following Four Different Diets." *Nutrition Research and Practice* 9 (4): 350-57.
- Farid, Nakhoul, Dahan Inbal, Nakhoul Nakhoul, Farber Evgeny, Rachel Miller -Lotan, Andrew P Levy y Asleh Rabea. 2013. "Vitamin E and Diabetic Nephropathy in Mice Model and Humans." *World Journal of Nephrology*. 2(4):11-124.
- Farnegardh, Mathias, Tomas Bonn, Sherry Sun, Jan Ljunggren, Harri Ahola, Anna Wilhelmsson, Jan Ake Gustafsson y Mats Carlquist. 2003. "The Three -Dimensional Structure of the Liver X Receptor Beta Reveals a Flexible Ligand -Binding Pocket That Can Accommodate Fundamentally Different Ligands." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (40):3882-28.
- Fernandez Monroy M. y Lazo de la Vega. 2011. "Biological Effects of Pharmacological Concentrations of Biotin." *Journal of Evidence -Based Complementary & Alternative Medicine* 16:40-48.
- Fernandez, Mejia Leticia, Negrete Riveron, Mejia Fernandez y Cristina. 2017. "Pharmacological Effects of Biotin in Animals." *Mini -Reviews in Medicinal Chemistry* 17(6):529-540.
- Ferrario, Carlos M. 2006. "Role of Angiotensin II in Cardiovascular Disease Therapeutic Implications of More than a Century of Research." *Journal of the Renin -Angiotensin -Aldosterone System* 7 (1):3-14.
- Ferre, P y F Foufelle. 2010. "Hepatic Steatosis: A Role for de Novo Lipogenesis and the Transcription Factor SREBP -1c." *Diabetes, Obesity & Metabolism* 12 Suppl 2:83-92.
- Flier, J S, K S Cook, P Usher y B M Spiegelman. 1987. "Severely Impaired Adipsin Expression in Genetic and Acquired Obesity." *Science (New York, N.Y.)* 237 (4813):405-8.
- Ford, Earl S., Chaoyang Li, Zhao y Guixiang. 2010. "Prevalence and Correlates of Metabolic Syndrome Based on a Harmonious Definition among Adults in the US." *Journal of Diabetes* 2 (3):180-93.
- Ford, Earl S, Wayne H Giles, William H Dietz y H. 2002. "Prevalence of the Metabolic Syndrome among US Adults: Findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey." *JAMA* 287 (3):356-59.
- Foufelle, F y P Ferr. 2010. "Hepatic Steatosis : A Role for de Novo Lipogenesis and the Transcription Factor SREBP -1c" *Diabetes, obesity & metabolism* 12 Suppl 2:83-92.
- Frimmer, M y K Ziegler. 1988. "The Transport of Bile Acids in Liver Cells." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 947 (1): 75 -99. doi:https://doi.org/10.1016/0304 -4157(88)90020 -2.
- Gallagher, Emily Jane, Derek LeRoith, Karnieli y Eddy. 2008. "The Metabolic Syndrome - - from Insulin Resistance to Obesity and Diabetes." *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 37 (3): 559-79.
- Garcia, Ruiz Carmen y Checa Jose C Fernandez. 2006. "Mitochondrial Glutathione: Hepatocellular Survival -Death Switch." *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 21 Suppl 3: S3-6.
- Garcia, Villafranca Javier, Alberto Guillen, Castro y Jose. 2003. "Involvement of Nitric Oxide/Cyclic GMP Signaling Pathway in the Regulation of Fatty Acid Metabolism in Rat Hepatocytes." *Biochemical Pharmacology* 65 (5):807-12.
- Ginsberg, Henry N, Yuan -Li Zhang, Hernandez y Antonio. 2005. "Regulation of Plasma Triglycerides in Insulin Resistance and Diabetes." *Archives of Medical Research* 36 (3): 232-40.
- Glimcher, Laurie H y Ann -Hwee Lee. 2009. "From Sugar to Fat: How the Transcription Factor XBP1 Regulates Hepatic Lipogenesis." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1173:E2-9.
- Goldenstein, Hagit, Nina S Levy, Yisrael T Lipener y Andrew P Levy. 2013. "Patient

- Selection and Vitamin E Treatment in Diabetes Mellitus.” *Expert Review of Cardiovascular Therapy* 11 (3): 319-26.
- Gómez, Hernández Almudena, Liliana Perdomo, Óscar Escribano y Manuel Benito. 2013. “Papel Del Tejido Adiposo Marrón y Perivascular En Las Complicaciones Vasculares Asociadas a La Obesidad.” *Clínica e Investigación En Arteriosclerosis* 25 (1): 36-44.
- González, Molero Inmaculada, Gemma Rojo, Sonsoles Morcillo, Vidal Pérez -Valero, Eleazara Rubio -Martín, Carolina Gutierrez -Repiso y Federico Soriguer. 2014. “Relación Entre Déficit de Vitamina D y Síndrome Metabólico.” *Medicina Clínica* 142 (11):473-77.
- Grieco, A, A Forgiione, L Miele, V Vero, A V Greco, A Gasbarrini y G Gasbarrini. 2005. “Fatty Liver and Drugs.” *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 9 (5):261-63.
- Gross, Lee S, Li Li, Earl S Ford y Simin Liu. 2004. “Increased Consumption of Refined Carbohydrates and the Epidemic of Type 2 Diabetes in the: An Ecologic Assessment.” *The American Journal of Clinical Nutrition* 79 (5):774-79.
- Guzmán, Gerónimo Rosa Isela, Zavaleta Tania Margarita Alarcón, Rosa María Oliart, Ros, Alvarado José Enrique Meza, Meza Socorro Herrera y Servia José Luis Chávez. 2016. “Blue Maize Extract Improves Blood Pressure, Lipid Profiles y Adipose Tissue in High - Sucrose Diet -Induced Metabolic Syndrome in Rats.” *Journal of Medicinal Food* 20 (2):110 -15.
- Haffner, S M, R A Valdez, H P Hazuda, B D Mitchell, P A Morales y M P Stern. 1992. “Prospective Analysis of the Insulin -Resistance Syndrome (Syndrome X).” *Diabetes* 41 (6):715-22.
- Haque, Mahmudul y Arun J Sanyal. 2002. “The Metabolic Abnormalities Associated with Non -Alcoholic Fatty Liver Disease.” *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology* 16 (5): 709 -31.
- Hardie, D Grahame, Fiona a Ross, Simon Hawley y A. 2012. “AMPK: A Nutrient and Energy Sensor That Maintains Energy Homeostasis.” *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 13 (4): 251 -62.
- Harrison, Stephen A, Will Fecht, Elizabeth M Brunt y Brent A Neuschwander -Tetri. 2009. “Orlistat for Overweight Subjects with Nonalcoholic Steatohepatitis: A Randomized, Prospective Trial.” *Hepatology (Baltimore, Md.)* 49 (1):80-86.
- Harrison, Stephen A, Sigurd Torgerson, Paul Hayashi, John Ward y Steven Schenker. 2003. “Vitamin E and Vitamin C Treatment Improves Fibrosis in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis.” *The American Journal of Gastroenterology* 98 (11):2485-90.
- Havel, Peter J. 2005. “Dietary Fructose: Implications for Dysregulation of Energy Homeostasis and Lipid/Carbohydrate Metabolism.” *Nutrition Reviews* 63 (5):133-57.
- Hegele, Robert A. 2001. “Monogenic Dyslipidemias: Window on Determinants of Plasma Lipoprotein Metabolism.” *American Journal of Human Genetics* 69 (6):1161-77.
- Hein, Gayle L, Maureen L Storey, John S White y David R Lineback. 2005. “Highs and Lows of High Fructose Corn Syrup: A Report From the Center for Food and Nutrition Policy and Its Ceres® Workshop.” *Nutrition Today* 40 (6)
- Higuchi, Nobito, Masaki Kato, Yuki Shundo, Hirotaka Tajiri, Masatake Tanaka, Naoki Yamashita, Motoyuki Kohjima, et al. 2008. “Liver X Receptor in Cooperation with SREBP -1c Is a Major Lipid Synthesis Regulator in Nonalcoholic Fatty Liver Disease.” *Hepatology Research: The Official Journal of the Japan Society of Hepatology* 38 (11):1122-29.
- Hinds, T S, W L West, Knight y E M. 1997. “Carotenoids and Retinoids: A Review of Research, Clinical, and Public Health Applications.” *Journal of Clinical Pharmacology* 37 (7):551-58.
- Hitomi, Hirofumi, Hideyasu Kiyomoto y Akira Nishiyama. 2007. “Angiotensin II and Oxidative

- Stress." *Current Opinion in Cardiology* 22 (4):311-15.
- Hopkins, F G. 1912. "Feeding Experiments Illustrating the Importance of Accessory Factors in Normal Diets." *The Journal of Physiology* 44 (5 -6):425-60.
- Hymes, J y B Wolf. 1996. "Biotinidase and Its Roles in Biotin Metabolism." *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 255 (1):1-11.
- Hymes, J y B Wolf. 1999. "Human Biotinidase Isn't Just for Recycling Biotin." *The Journal of Nutrition* 129: S485S-S489.
- Ibdah, Jamal A, Peter Perlegas, Yiwen Zhao, Jerry Angdisen, Hermina Borgerink, Melanie K Shadoan, Janice D Wagner, Dietrich Matern, Piero Rinaldo y J Mark Cline. 2005. "Mice Heterozygous for a Defect in Mitochondrial Trifunctional Protein Develop Hepatic Steatosis and Insulin Resistance." *Gastroenterology* 128 (5):1381-90.
- Ibrahim, Sherehan M, Ezzedin S El -Denshary, Dalaal Abdallah y M. 2015. "Geraniol, Alone and in Combination with Pioglitazone, Ameliorates Fructose -Induced Metabolic Syndrome in Rats via the Modulation of Both Inflammatory and Oxidative Stress Status." *PloS One* 10 (2): e0117516.
- Ignarro, L J. 1990. "Biosynthesis and Metabolism of Endothelium-Derived Nitric Oxide." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 30: 535-60.
- Janes, C H y K D Lindor. 1993. "Outcome of Patients Hospitalized for Complications after Outpatient Liver Biopsy." *Annals of Internal Medicine* 118 (2):96-98.
- Janos, Zempleni K, Subhashinee S Wijeratne, Toshinobu y Kuroishi. 2012. "Biotin." In *Present Knowledge in Nutrition* :35 -74.
- Jegatheesan, Prasanthi y Jean -Pascal De Bandt. 2017. "Fructose and NAFLD: The Multifaceted Aspects of Fructose Metabolism." *Nutrients* 9 (3):230.
- Johnson, Santos E Perez -Pozo, Yuri Y Sautin, Jacek Manitius, Laura Gabriela Sanchez -Lozada, Daniel I Feig, Mohamed Shafiu, et al. 2009. "Hypothesis: Could Excessive Fructose Intake and Uric Acid Cause Type 2 Diabetes" *Endocrine Reviews* 30 (1):96-16.
- Johnson, Rachel K, Lawrence J Appel, Michael Brands, Barbara V Howard, Michael Lefevre, Robert H Lustig, Frank Sacks, Lyn M Steffen, Judith Wylie -Rosett y American Heart Association Nutrition Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism and the Council on Epidemiology and Prevention. 2009. "Dietary Sugars Intake and Cardiovascular Health: A Scientific Statement from the American Heart Association." *Circulation* 120 (11):1011-1020.
- Joseph, Sean B, Bryan A Laffitte, Parthiv H Patel, Michael A Watson, Karen E Matsukuma, Robert Walczak, Jon L Collins, Timothy F Osborne y Peter Tontonoz. 2002. "Direct and Indirect Mechanisms for Regulation of Fatty Acid Synthase Gene Expression by Liver X Receptors." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (13):11019-25.
- Jungermann, Kurt y Ronald G Thurman. 1992. "Hepatocyte Heterogeneity in the Metabolism of Carbohydrates." *Enzyme* 46:33-58.
- Kalra, Ekta K. 2003. "Nutraceutical - -Definition and Introduction." *AAPS PharmSci* 5 (3):E25.
- Kaplan, NM. 1989. "The Deadly Quartet: Upper -Body Obesity, Glucose Intolerance, Hypertriglyceridemia y Hypertension." *Archives of Internal Medicine* 149 (7):1514-20.
- Kasper, D L, A S Fauci, S L Hauser, D L Longo, J L Jameson y J Loscalzo. 2015. *Harrison's Principles of Internal Medicine* 19/E (Vol.1 & Vol.2) (Ebook). McGraw -Hill Education.
- Kassi, Eva, Panagiota Pervanidou, Gregory Kaltsas y George Chrousos. 2011. "Metabolic Syndrome: Definitions and Controversies." *BMC Medicine* 9: 48.
- Kaur, Jaspinder. 2014. "A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome." *Cardiology Research and Practice* 2014:943162.
- Kelishadi, Roya, Marjan Mansourian, Heidari -Beni y Motahar. 2014. "Association of Fructose Consumption and Components of Metabolic Syndrome in Human Studies: A Systematic Review and Meta -Analysis." *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* 30 (5):503-10.

- Khedara, A, Y Kawai, J Kayashita y N Kato. 1996. "Feeding Rats the Nitric Oxide Synthase Inhibitor, L -N(Omega)Nitroarginine, Elevates Serum Triglyceride and Cholesterol and Lowers Hepatic Fatty Acid Oxidation." *The Journal of Nutrition* 126 (10):2563-67.
- Kim, C y Z Younossi. 2008. "Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Manifestation of the Metabolic Syndrome." *Cleveland Clinic Journal of Medicine* 75 (10): 721 -28.
- Kim, Sun J, Young S Jung, Do Y Kwon y Young C Kim. 2008. "Alleviation of Acute Ethanol Induced Liver Injury and Impaired Metabolomics of Containing Substances by Betaine Supplementation." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 368 (4):893-98.
- Kleiner, David E y Elizabeth M Brunt. 2012. "Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathologic Patterns and Biopsy Evaluation in Clinical Research." *Seminars in Liver Disease* 32 (1):3-13.
- Knowles, J R. 1989. "The Mechanism of Biotin -Dependent Enzymes." *Annual Review of Biochemistry* 58:195-221.
- Koepfen, B M y B A Stanton. 2017. "Berne and Levy Physiology" E -Book. Elsevier Health Sciences.
- Kogl, F y B Tonnis. 1932. "Über Das Bios -Problem. Darstellung von Krystallisiertem Biotin Aus Eigelb." *Hoppe-Seyler's Zeitschrift Fur Physiologische Chemie* :242(1-2) 43-73.
- Kylin, E. 1923. "No Title Studien Ueber Das Hypertonie -Hypergly Ka "mie -Hyperurika." *Zentralblatt Fuer Innere Medizin* 44(10):5-27.
- Larrieta, Elena, Fidel Velasco, Paz Vital, Teresita López -aceves, María Luisa Lazo -de -la -vega -monroy, Alberto Rojas y Cristina Fernandez -Mejia. 2010. "Pharmacological Concentrations of Biotin Reduce Serum Triglycerides and the Expression of Lipogenic Genes." *European Journal of Pharmacology* 644(1-3):263-68.
- Lazo de la Vega, Monroy M L, E Larrieta, M S German, A Baez -Saldana, Cristina Fernandez -Mejia, Maria -Luisa Lazo -de -la -Vega -Monroy, E Larrieta, et al. 2013. "Effects of Biotin Supplementation in the Diet on Insulin Secretion, Islet Gene Expression, Glucose Homeostasis and Beta -Cell Proportion." *The Journal of Nutritional Biochemistry* 24 (1): 169-77.
- Lee, Justin M S, Matthew D Robson, Ly -Mee Yu, Cheerag C Shirodaria, Colin Cunningham, Ilias Kylintireas, Janet E Digby, et al. 2009. "Effects of High -Dose Modified -Release Nicotinic Acid on Atherosclerosis and Vascular Function: A Randomized, Placebo - Controlled, Magnetic Resonance Imaging Study." *Journal of the American College of Cardiology* 54 (19):1787-94.
- Leopoldo, Raij. 2007. "Nitric Oxide in the Pathogenesis of Cardiac Disease." *The Journal of Clinical Hypertension* 8 (s12):30-39.
- Lewis, Gary F, Andre Carpentier, Khosrow Adeli y Adria Giacca. 2002. "Disordered Fat Storage and Mobilization in the Pathogenesis of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes." *Endocrine Reviews* 23 (2):201-29.
- Liliana, Zago, Zugasti1 Begoña, Zuleta Ángela, Presner Natalia, Velia Lobbe y De la Plaza Marcela. 2017. "La Fructosa En La Alimentacion. Aspectos Metabolicos." *Actualización En Nutrición* 18:26-36.
- Lopez, J M, M K Bennett, H B Sanchez, J M Rosenfeld y T F Osborne. 1996. "Sterol Regulation of Acetyl Coenzyme A Carboxylase: A Mechanism for Coordinate Control of Cellular Lipid." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the of America* 93 (3):1049-53.
- López, Oliva Muñoz Elvira, Emilia Muñoz Martínez, Oliva Mu y Emilia Mu. 2014. "SREBP - 1c, ChREBP y LXR: Su Influencia En El Desarrollo Del Hígado Graso No Alcohólico." *Anales de La Real Academia Nacional de Farmacia* 80 (1):14-48.
- Loten, E G, and J G T Sneyd. 1970. "An Effect of Insulin on Adipose -Tissue Adenosine 3':5' -Cyclic Monophosphate Phosphodiesterase." *Biochemical Journal* 120 (1):187 LP-193.

- Lozano, Iona, Rimmelt Van der Werf, William Bietiger, Elodie Seyfritz, Claude Peronet, Michel Pinget, Nathalie Jeandidier, et al. 2016. "High -Fructose and High -Fat Diet - Induced Disorders in Rats: Impact on Diabetes Risk, Hepatic and Vascular Complications." *Nutrition & Metabolism* 13:15.
- Ludwig, J, D B McGill, K Lindor y D. 1997. "Review: Nonalcoholic Steatohepatitis." *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 12(5):398-403.
- Ludwig, J, T R Viggiano, D B McGill y B J Oh. 1980. "Nonalcoholic Steatohepatitis: Mayo Clinic Experiences with a Hitherto Unnamed Disease." *Mayo Clinic Proceedings* 55(7):434-38.
- Lustig, Robert H. 2010. "Fructose: Metabolic, Hedonic, and Societal Parallels with Ethanol." *Journal of the American Dietetic Association* 110 (9):1307-21.
- Lustig, Robert H. 2013. "Fructose: It's 'Alcohol without the Buzz'." *Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)* 4 (2):226-35.
- Macfarlane, David P, Xiantong Zou, Ruth Andrew, Nicholas M Morton, Dawn E W Livingstone, Rebecca L Aucott, Moffat J Nyirenda, John P Iredale y Brian R Walker. 2011. "Metabolic Pathways Promoting Intrahepatic Fatty Acid Accumulation in Methionine and Choline Deficiency: Implications for the Pathogenesis of Steatohepatitis." *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 300 (2):E402-9.
- Machado, Mariana V y Pinto Helena Cortez. 2012. "Gut Microbiota and Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Annals of Hepatology* 11 (4):440-49.
- Macías, Sánchez Karla L, Novoa Vanesa Zazueta, Macías Claudia L Mendoza, Serrano Ángeles Rangel y Vaca Felipe Padilla. 2008. "Epigenética, más allá de la Genética." *Acta Universitaria* 18 (1): 50 -56. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=41618105>.
- Mahmoud, Amr A A y Shimaa M Elshazly. 2014. "Ursodeoxycholic Acid Ameliorates Fructose -Induced Metabolic Syndrome in Rats." *PloS One* 9 (9): e106993.
- Malhi, H y G.J. Gores. 2008. "Molecular Mechanisms of Lipotoxicity in Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Seminars in Liver Disease* 28 (4):360-69.
- Mannaerts, G P, P P Van Veldhoven, M Casteels y M. 2000. "Peroxisomal Lipid Degradation via Beta - and Alpha -Oxidation in Mammals." *Cell Biochemistry and Biophysics* 32:73-87.
- Maranon, G. 1922. "Über Hypertonie Und Zuckerkrankheit." *Zentralblatt Für Innere Medizin* 43:169-76.
- Marceau, P, S Biron, F S Hould, S Marceau, S Simard, S N Thung y J G Kral. 1999. "Liver Pathology and the Metabolic Syndrome X in Severe Obesity." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 84 (5):1513-17.
- Marshall, M W, M Haubrich, V A Washington, M. -L.W. Chang, C W Young y M A Wheeler. 1976. "Biotin Status and Lipid Metabolism in Adult Obese Hypercholesterolemic Inbred Rats." *Annals of Nutrition and Metabolism* 20 (1):41-61.
- Marshall, M W, P G Kliman, V A Washington, J F Mackin y B T Weinland. 1980. "Effects of Biotin on Lipids and Other Constituents of Plasma of Healthy Men and Women." *Artery* 7 (4):330-51.
- Masuoka, Howard C y Naga Chalasani. 2013. "Nonalcoholic Fatty Liver Disease: An Emerging Threat to Obese and Diabetic Individuals." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1281:106-22.
- Matteoni, C A, Z M Younossi, T Gramlich, N Boparai, Y C Liu y A J McCullough. 1999. "Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Spectrum of Clinical and Pathological Severity." *Gastroenterology* 116 (6):1413-19.
- Medina, S. R., V. J. A. López, Norberto Chávez -Tapia, Gonzalo Torres -Villalobos, Misael Uribe y Nahum Méndez -Sánchez. 2013. "Hepatic Manifestations of Metabolic Syndrome." *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, March.

- Melanson, Kathleen J, Linda Zukley, Joshua Lowndes, Von Nguyen, Theodore J Angelopoulos y James M Rippe. 2007. "Effects of High -Fructose Corn Syrup and Sucrose Consumption on Circulating Glucose, Insulin, Leptin, and Ghrelin and on Appetite in Normal -Weight Women." *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* 23 (2):103-12.
- Méndez, sánchez Nahum, castillo Claudia P Sánchez, Antonio Villa y R. 2004. "The Relationship of Overweight and Obesity to High Mortality Rates from Liver Cirrhosis in Mexico" *Official journal of the Mexican Association of Hepatology (2004)* 3 (2):66-71.
- Misra, Anoop y Usha Shrivastava. 2013. "Obesity and Dyslipidemia in South Asians." *Nutrients* 5 (7):2708-33.
- Mock, D M. 2013. "Biotin: Physiology, Dietary Sources and Requirements A2" *Encyclopedia of Human Nutrition (Third Edition)*In :182-90.
- Mock, D M y M I Malik. 1992. "Distribution of Biotin in Human Plasma: Most of the Biotin Is Not Bound to Protein." *The American Journal of Clinical Nutrition* 56 (2):427-32.
- Moreno, M. y J.A. Martinez. 2002. "El Tejido Adiposo: Órgano de Almacenamiento y Órgano Secretor." *Anales Del Sistema Sanitario de Navarra* 25 (1):29-39.
- Musso, Giovanni, Roberto Gambino, Simona Bo, Barbara Uberti, Giampaolo Biroli, Gianfranco Pagano y Maurizio Cassader. 2008. "Should Nonalcoholic Fatty Liver Disease Be Included in the Definition of Metabolic Syndrome A Cross -Sectional Comparison with Adult Treatment Panel III Criteria in Nonobese Nondiabetic Subjects." *Diabetes Care* 31 (3):562-68.
- Nagai, Yoshio, Shin Yonemitsu, Derek M Erion, Takanori Iwasaki, Romana Stark, Dirk Weismann, Jianying Dong, et al. 2009. "The Role of Peroxisome Proliferator -Activated Receptor Gamma Coactivator -1 Beta in the Pathogenesis of Fructose -Induced Insulin Resistance." *Cell Metabolism* 9 (3):252-64.
- Nasri, Hamid, Azar Baradaran, Hedayatollah Shirzad y Mahmoud Rafieian -Kopaei. 2014. "New Concepts in Nutraceuticals as Alternative for Pharmaceuticals." *International Journal of Preventive Medicine* 5(12):1487-1499.
- Nelson, David L, M Cox Michael, W Freeman y H. 2004. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Segunda Ed. New York: Worth Publishers
- Neuschwander, Tetri Brent A. 2013. "Carbohydrate Intake and Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 16 (4):446-52.
- Neuschwander, Tetri Brent A y Stephen H Caldwell. 2003. "Nonalcoholic Steatohepatitis: Summary of an AASLD Single Topic Conference." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 37 (5):1202-1219.
- Newsholme, Eric Arthur y Carole Start. 1973. "Regulation in Metabolism" *Biochemical Journal* 473(13):1845-1857.
- Nseir, William, Julnar Mograbi, Ghali y Murad. 2012. "Lipid -Lowering Agents in Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Steatohepatitis: Human Studies." *Digestive Diseases and Sciences* 57 (7):1773-81.
- Ong, Janus P y Zobair M Younossi. 2007. "Epidemiology and Natural History of NAFLD and NASH." *Clinics in Liver Disease* 11 (1):1-16.
- Ouyang, Xiaosen, Pietro Cirillo, Yuri Sautin, Shannon McCall, James L. Bruchette, Anna Mae Diehl, Richard J. Johnson y Manal F. Abdelmalek. 2008. "Fructose Consumption as a Risk Factor for Non -Alcoholic Fatty Liver Disease." *Journal of Hepatology* 48 (6):993-99.
- Ozcan, Umut, Qiong Cao, Erkan Yilmaz, Ann -Hwee Lee, Neal N Iwakoshi, Esra Ozdelen, Guro Tuncman, Cem Gorgun, Laurie H Glimcher y Gokhan S Hotamisligil. 2004. "Endoplasmic Reticulum Stress Links Obesity, Insulin Action, and Type 2 Diabetes." *Science (New York, N.Y.)* 306 (5695):457-61.
- Pacheco, Alvarez Diana, Vargas R Sergio Solorzano, Alfonso Del Rio y Leon. 2002. "Biotin

- in Metabolism and Its Relationship to Human Disease.” *Archives of Medical Research* 33 (5):439-47.
- Palekar, Nicole A, Rhonda Naus, Steven P Larson, John Ward y Stephen A Harrison. 2006. “Clinical Model for Distinguishing Nonalcoholic Steatohepatitis from Simple Steatosis in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease.” *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver* 26 (2):151-56.
- Paredes, Angelo H., Dawn M. Torres, Stephen A. Harrison y A. 2012. *Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Clinics in Liver Disease*. Vol. 16. Elsevier.
- Paschos, P y K Paletas. 2009. “Non Alcoholic Fatty Liver Disease and Metabolic Syndrome.” *Hippokratia* 13(1):9-19.
- Peet, D J, S D Turley, W Ma, B A Janowski, J M Lobaccaro, R E Hammer y D J Mangelsdorf. 1998. “Cholesterol and Bile Acid Metabolism Are Impaired in Mice Lacking the Nuclear Oxysterol Receptor LXR Alpha.” *Cell* 93 (5):693-704.
- Pessayre, Dominique. 2007. “Role of Mitochondria in Non -Alcoholic Fatty Liver Disease” *Gastroenterology and Hepatology* 22(1):S20-S27
- Petrelli, F, S Coderoni, P Moretti y M Paparelli. 1978. “Effect of Biotin on Phosphorylation, Acetylation, Methylation of Rat Liver Histones.” *Molecular Biology Reports* 4 (2):87-92.
- Pineda, Carlos Andrés. 2008. “Síndrome metabólico: definición, historia, criterios.” *Colombia Médica* 39 (1):96-106.
- Pittas, Anastassios G, Nandini A Joseph, Greenberg y Andrew S. 2004. “Adipocytokines and Insulin Resistance.” *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 89 (2):447-52.
- Postic, C y J Girard. 2008. “The Role of the Lipogenic Pathway in the Development of Hepatic Steatosis.” *Diabetes Metabolism* 34 (6):643-48.
- Postic, Renaud Dentin, Pierre -Damien Denechaud y Jean Girard. 2007. “ChREBP, a Transcriptional Regulator of Glucose and Lipid Metabolism.” *Annual Review of Nutrition* 27:179-92.
- Puri, Puneet, Faridoddin Mirshahi, Onpan Cheung, Ramesh Natarajan, James W Maher, John M Kellum y Arun J Sanyal. 2008. “Activation and Dysregulation of the Unfolded Protein Response in Nonalcoholic Fatty Liver Disease.” *Gastroenterology* 134 (2):568-76.
- Rask -Madsen, Christian y C Ronald Kahn. 2012. “Tissue -Specific Insulin Signaling, Metabolic Syndrome y Cardiovascular Disease.” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 32 (9):2052-59.
- Ratziu, Vlad, Luminita Bonyhay, Vincent Di Martino, Frederic Charlotte, Lucas Cavallaro, Marie -Helene Sayegh -Tainturier, Philippe Giral, Andre Grimaldi, Pierre Opolon y Thierry Poynard. 2002. “Survival, Liver Failure, and Hepatocellular Carcinoma in Obesity -Related Cryptogenic Cirrhosis.” *Hepatology (Baltimore, Md.)* 35 (6):1485-93.
- Ratziu, Vlad, Philippe Giral, Sophie Jacqueminet, Frederic Charlotte, Agnes Hartemann -Heurtier, Lawrence Serfaty, Philippe Podevin, et al. 2008. “Rosiglitazone for Nonalcoholic Steatohepatitis: One -Year Results of the Randomized Placebo -Controlled Fatty Liver Improvement with Rosiglitazone Therapy (FLIRT) Trial.” *Gastroenterology* 135 (1):100-110.
- Reaven, Gerald M. 1988. “Role of Insulin Resistance in Human Disease.” *Diabetes* 37 (12):1595 LP-1607.
- Reddy, J K y T Hashimoto. 2001. “Peroxisomal Beta -Oxidation and Peroxisome Proliferator -Activated Receptor Alpha: An Adaptive Metabolic System.” *Annual Review of Nutrition* 21:193-230.
- Ren, Lu -Ping, Stanley M H Chan, Xiao -Yi Zeng, D Ross Laybutt, Tristan J Iseli, Ruo -Qiong Sun, Edward W Kraegen, Gregory J Cooney, Nigel Turner y Ji -Ming Ye. 2012. “Differing Endoplasmic Reticulum Stress Response to Excess Lipogenesis versus Lipid

- Oversupply in Relation to Hepatic Steatosis and Insulin Resistance." *PloS One* 7 (2).
- Repa, J J, G Liang, J Ou, Y Bashmakov, J M Lobaccaro, I Shimomura, B Shan, M S Brown, J L Goldstein y D J Mangelsdorf. 2000. "Regulation of Mouse Sterol Regulatory Element -Binding Protein -1c Gene (SREBP -1c) by Oxysterol Receptors, LXRA and LXRbeta." *Genes & Development* 14 (22):2819-30.
- Revilla, Monsalve Cristina, Ruiz Iván Zendejas, Andrade Sergio Islas, Saldaña Armida Báez, Garibay Miguel Angel Palomino, Quiróz Pedro Martín Hernández y Mejia Cristina Fernandez. 2006. "Biotin Supplementation Reduces Plasma Triacylglycerol and VLDL in Type 2 Diabetic Patients and in Nondiabetic Subjects with Hypertriglyceridemia." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 60 (4):182-85.
- Rhee, Eun -Jung y Jorge Plutzky. 2012. "Retinoid Metabolism and Diabetes Mellitus." *Diabetes & Metabolism Journal* 36 (3):167-80.
- Rivero, Vilches F., S. de Frutos, Puyol M. Rodríguez, Puyol D. Rodríguez y M. Saura. 2001. "Guanilato Ciclasas: Procesos Fisiológicos Mediados Por GMPc." *Nefrología* 21 (3):233-39.
- Riverón, negrete Leticia, argumedo Gloria Sicilia, delgado Carolina Álvarez, urrutia Elvia Coballase, fernández Jonathan Alcántar y mejia Cristina Fernandez. 2016. "Dietary Biotin Supplementation Modifies Hepatic Morphology without Changes in Liver Toxicity Markers" *BioMed Research International* 2016 :9
- Rodrigues, Angelica Heringer, Carolina Campos Lima Moreira, Erica Guilhen Mario, Leticia Maria de Souza Cordeiro, Gleide Fernandes Avelar, Leida Maria Botion y Valeria Ernestania Chaves. 2016. "Differential Modulation of Cytosolic Lipases Activities in Liver and Adipose Tissue by High -Carbohydrate Diets." *Endocrine* 53 (2):423-32.
- Rodriguez, Melendez Rocio, Gabriela Camporeale, Jacob B Griffin y Janos Zemleni. 2003. "Interleukin -2 Receptor -Gamma -Dependent Endocytosis Depends on Biotin in Jurkat Cells." *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 284 (2):C41-21.
- Rodriguez, Melendez Rocio, Jacob B Griffin, Zemleni y Janos. 2006. "The Expression of Genes Encoding Ribosomal Subunits and Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A Depends on Biotin and Bisnorbiotin in HepG2 Cells." *The Journal of Nutritional Biochemistry* 17 (1):23-30.
- Rojas, C, and Salinas Carlos A Aguilar. 2010. "Metabolic Syndrome in Mexican Adults: Results from the National Health and Nutrition Survey 2006." *Salud Pública de México*. 52 supl 1:S11-S18.
- Rojas, Valle Johan Sebastián Lopera, Ocampo Alejandra Uribe, Pérez Sara Correa, Hernández Natalia Perilla y Cárdenas Juan Sebastián Marín. 2015. "Consumo de Nutracéuticos, Una Alternativa En La Prevención de Las Enfermedades Crónicas No Transmisibles." *Revista Biosalud* 14 (1):91-103.
- Romero, Navarro Guillermo, Valladares Gabriela Cabrera, Michael S German, Franz M Matschinsky, Antonio Velazquez, Juehu Wang y Mejia Cristina Fernandez. 1999. "Biotin Regulation of Pancreatic Glucokinase and Insulin in Primary Cultured Rat Islets and in Biotin - Deficient Rats1." *Endocrinology* 140(10):4595-4600.
- Ross, A P, T J Bartness, J G Mielke y M B Parent. 2009. "A High Fructose Diet Impairs Spatial Memory in Male Rats." *Neurobiology of Learning and Memory* 92 (3):410-16.
- Sabuncu, Tevfik, Yasar Nazligul, Mustafa Karaoglanoglu, Edip Ucar, and Feryal Birden Kilic. 2003. "The Effects of Sibutramine and Orlistat on the Ultrasonographic Findings, Insulin Resistance and Liver Enzyme Levels in Obese Patients with Non -Alcoholic Steatohepatitis." *Romanian Journal of Gastroenterology* 12 (3):189-192.
- Safar, Michel E, Beverley Balkau, Céline Lange, Athanase D Protogerou, Sébastien Czernichow, Jacques Blacher, Bernard I Levy y Harold Smulyan. 2013. "Hypertension and Vascular Dynamics in Men and Women With Metabolic Syndrome." *Journal of the American College of Cardiology* 61 (1):12-19.

- Saggerson, David. 2008. "Malonyl -CoA, a Key Signaling Molecule in Mammalian Cells." *Annual Review of Nutrition* 28: 253-72.
- Sahin, Kazim, Mehmet Tuzcu, Cemal Orhan, Nurhan Sahin, Osman Kucuk, Ibrahim H Ozercan, Vijaya Juturu y James R Komorowski. 2013. "Anti -Diabetic Activity of Chromium Picolinate and Biotin in Rats with Type 2 Diabetes Induced by High -Fat Diet and Streptozotocin." *British Journal of Nutrition* 110 (2):197-205
- Said, Hamid M. 2012. "Biotin: Biochemical, Physiological and Clinical Aspects." *Sub -Cellular Biochemistry* 56:1-19.
- Sambrook, J y D W Russell. 2001. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual". Molecular Cloning: *A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.*(1):A1.7.
- Sánchez -Muñoz, Fausto, Rebeca García Macedo, Francisco Alarcón -Aguilar y Miguel Cruz. 2005. "Adipocinas, Tejido Adiposo y Su Relación Con Células Del Sistema Inmune ." *Gaceta Médica de México* 141:505-512.
- Sanyal, Arun J, Naga Chalasani, Kris V Kowdley, Arthur McCullough, Anna Mae Diehl, Nathan M Bass, Brent A Neuschwander -Tetri, et al. 2010. "Pioglitazone, Vitamin E, or Placebo for Nonalcoholic Steatohepatitis." *The New Journal of Medicine* 362 (18):1675-85.
- Sarem, M, R Znaidak, M Macias y R Rey. 2006. "[Hepatic stellate cells: it's role in normal and pathological conditions]." *Gastroenterologia y hepatologia* 29 (2):93-101.
- Schaefer, Ernst J, Joi A Gleason y Michael L Dansinger. 2009. "Dietary Fructose and Glucose Differentially Affect Lipid and Glucose Homeostasis." *The Journal of Nutrition* 139 (6):1257S-1262S.
- Scheerger, Sarah B y Janos Zempleni. 2003. "Expression of Oncogenes Depends on Biotin in Human Small Cell Lung Cancer Cells NCI -H69." *International Journal for Vitamin and Nutrition Research. Internationale Zeitschrift Fur Vitamin - Und Ernährungsforschung. Journal International de Vitaminologie et de Nutrition* 73 (6):461-67.
- Schlicker, S. A., A. A. Yates, C. Suitor y W. 1998. "Dietary Reference Intakes: The New Basis for Recommendations for Calcium and Related Nutrients, B Vitamins, and Choline. Saunders." *Journal of the American Dietetic Association. W.B.* 98:00160-6.
- Schorin, Marilyn D. 2005. "High Fructose Corn Syrups, Part 1: Composition, Consumption, and Metabolism." *Nutrition Today* 40 (6):248-52.
- Sendashonga, C, R Hill y A Petrini. 2005. "The Cartagena Protocol on Biosafety: Interaction between the Convention on Biological Diversity and the World Organisation for Animal Health." *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)* 24 (1):19-30.
- Serjeantson, S W y P Zimmet. 1991. "Genetics of Non -Insulin Dependent Diabetes Mellitus in 1990." *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism* 5 (3):477-93.
- Shin, Jeong-Ah, Jin-Hee Lee, Sun-Young Lim, Hee-Sung Ha, Hyuk-Sang Kwon, Yong-Moon Park, Won-Chul Lee, Moo-II Kang, Hyeon-Woo Yim y Kun-Ho Yoon. 2013. "Metabolic Syndrome as a Predictor of Type 2 Diabetes, and Its Clinical Interpretations and Usefulness." *Journal of Diabetes Investigation* 4 (4):334-43.
- Siiteri, P K. 1987. "Adipose Tissue as a Source of Hormones." *The American Journal of Clinical Nutrition* 45 (1):277-82.
- Solga, Steven F y A M Diehl. 2003. "Non -Alcoholic Fatty Liver Disease: Lumen -Liver Interactions and Possible Role for Probiotics." *Journal of Hepatology* 38 (5):681-87.
- Souza, Monica Rodrigues de Araujo, Margareth de Fatima Formiga de Melo Diniz, Jose Eymard Moraes de Medeiros -Filho y Maria Salete Trigueiro de Araujo. 2012. "Metabolic Syndrome and Risk Factors for Non -Alcoholic Fatty Liver Disease." *Arquivos de Gastroenterologia* 49 (1):89-96.
- Spadaro, L, O Magliocco, D Spampinato, S Piro, C Oliveri, C Alagona, G Papa, A M Rabuazzo y F Purrello. 2008. "Effects of N -3 Polyunsaturated Fatty Acids in Subjects

- with Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Digestive and Liver Disease : Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* 40 (3):194-99.
- Stanhope, Kimber L, Jean Marc Schwarz, Nancy L Keim, Steven C Griffen, Andrew A Bremer, James L Graham, Bonnie Hatcher, et al. 2009. "Consuming Fructose - Sweetened, Not Glucose -Sweetened, Beverages Increases Visceral Adiposity and Lipids and Decreases Insulin Sensitivity in Overweight/Obese Humans." *The Journal of Clinical Investigation* 119 (5):1322-34.
- Stanley, J S, J B Griffin, Zemleni y J. 2001. "Biotinylation of Histones in Human Cells. Effects of Cell Proliferation." *European Journal of Biochemistry* 268 (20):5424-29.
- Stockert, R J y A G Morell. 1990. "Second Messenger Modulation of the Asialoglycoprotein Receptor." *The Journal of Biological Chemistry* 265 (4):1841-46.
- Stockert, Richard J y Qing Ren. 1997. "Cytoplasmic Protein mRNA Interaction Mediates CGMP -Modulated Translational Control of the Asialoglycoprotein Receptor." *Journal of Biological Chemistry* 272 (14):9161-65.
- Streit, W R y P Entcheva. 2003. "Biotin in Microbes, the Genes Involved in Its Biosynthesis, Its Biochemical Role and Perspectives for Biotechnological Production." *Applied Microbiology and Biotechnology* 61 (1). Germany, Germany: 21 -31. doi:10.1007/s00253 -002 -1186 -2.
- Suchy, S F y B Wolf. 1986. "Effect of Biotin Deficiency and Supplementation on Lipid Metabolism in Rats: Cholesterol and Lipoproteins." *The American Journal of Clinical Nutrition* 43 (5). , : 831 -38. doi:10.1093/ajcn/43.5.831.
- Sugita, Yumi, Hitoshi Shirakawa, Ritsuko Sugimoto, Yuji Furukawa y Michio Komai. 2008. "Effect of Biotin Treatment on Hepatic Gene Expression in Streptozotocin -Induced Diabetic Rats." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 72 (5):1290-98.
- Tabor, D E, J B Kim, B M Spiegelman y P A Edwards. 1998. "Transcriptional Activation of the Stearoyl -CoA Desaturase 2 Gene by Sterol Regulatory Element -Binding Protein/Adipocyte Determination and Differentiation Factor 1." *The Journal of Biological Chemistry* 273 (34):22052-58.
- Takahashi, Yoshihisa y Toshio Fukusato. 2014. "Histopathology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease/Nonalcoholic Steatohepatitis." *World Journal of Gastroenterology* 20 (42):15539-48.
- Tappy, Luc y Kim -Anne Le. 2010. "Metabolic Effects of Fructose and the Worldwide Increase in Obesity." *Physiological Reviews* 90 (1):23-46.
- Teff, Karen L, Sharon S Elliott, Matthias Tschop, Timothy J Kieffer, Daniel Rader, Mark Heiman, Raymond R Townsend, Nancy L Keim, David D'Alessio, and Peter J Havel. 2004. "Dietary Fructose Reduces Circulating Insulin and Leptin, Attenuates Postprandial Suppression of Ghrelin, and Increases Triglycerides in Women." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 89 (6):2963-72.
- Thorburn, A W, L H Storlien, A B Jenkins, S Khouri y E W Kraegen. 1989. "Fructose - Induced in Vivo Insulin Resistance and Elevated Plasma Triglyceride Levels in Rats." *The American Journal of Clinical Nutrition* 49 (6):1155-63.
- Tiniakos, Dina G., Miriam B. Vos, Elizabeth M. Brunt y M. 2010. "Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathology and Pathogenesis." *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 5 (1):145-71.
- Tom Manzano. 2018. "Protocolo Alimentario: La Dieta Eficiente: Carbohidratos: La Fructosa." Accessed August 13. <http://protocoloalimentario.blogspot.com/2015/08/carbohidratos-la-fructosa.html>.
- Trauner, Michael, Marco Arrese, Wagner y Martin. 2010. "Fatty Liver and Lipotoxicity." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1801 (3):299-310.

- Trujillo, Hernández Benjamín, Magallón Erick Trujillo, Magallón Mariana Trujillo, Carlos A Brizuela -Araujo, Miguel A García -medina, Mario A González -Jiménez, Gladys A López -Peña, et al. 2017. "Frecuencia Del Síndrome Metabólico y Factores de Riesgo En Adultos Con y Sin Diabetes Mellitus e Hipertensión Arterial." *Revista de Salud Pública* 19 (1):609-16.
- Tsai, Chung -Huang, Tsai -Chung Li, Cheng Lin y Chieh. 2008. "Metabolic Syndrome as a Risk Factor for Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Southern Medical Journal* 101 (9):900-905.
- Tsuneto, Akira, Ayumi Hida, Nobuko Sera, Misa Imaizumi, Shinichiro Ichimaru, Eiji Nakashima, Shinji Seto, Koji Maemura y Masazumi Akahoshi. 2010. "Fatty Liver Incidence and Predictive Variables." *Hypertension Research: Official Journal of the Japanese Society of Hypertension* 33 (6):638-43.
- Tuyama, Ana C y Charissa Y Chang. 2012. "Non -Alcoholic Fatty Liver Disease." *Journal of Diabetes* 4 (3):266-80.
- Utzschneider, Kristina M y Steven E Kahn. 2006. "The Role of Insulin Resistance in Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 91 (12):4753-61.
- Vague, J. 1956. "The Degree of Masculine Differentiation of Obesities: A Factor Determining Predisposition to Diabetes, Atherosclerosis, Gout, and Uric Calculous Disease." *The American Journal of Clinical Nutrition* 4 (1):20-34.
- van Herpen, N A y V B Schrauwen. 2008. "Lipid Accumulation in Non -Adipose Tissue and Lipotoxicity." *Physiology & Behavior* 94 (2):231-41.
- Vaziri, Nosratola D. 2009. "Causes of Dysregulation of Lipid Metabolism in Chronic Renal Failure." *Seminars in Dialysis* 22 (6):644-51.
- Vázquez, Manuel. 2007. "PPAR α y Síndrome Metabólico." *Clínica e Investigación En Arteriosclerosis* 19 (1):37-38.
- Vesely, D L. 1982. "Biotin Enhances Guanylate Cyclase Activity." *Science* 216 (4552):LP1329-1330.
- Vilches, Flores Alonso, and Mejía Cristina Fernández. 2005. "Effect of Biotin upon Gene Expression and Metabolism." *Revista de Investigacion Clinica* 57:716-24.
- Vilches, Flores Alonso, Armando R Tovar, Alvaro Marin -Hernandez, Alberto Rojas -Ochoa y Cristina Fernandez -Mejia. 2010. "Biotin Increases Glucokinase Expression via Soluble Guanylate Cyclase/Protein Kinase G, Adenosine Triphosphate Production and Autocrine Action of Insulin in Pancreatic Rat Islets." *The Journal of Nutritional Biochemistry* 21 (7):606-12.
- Viollet, Benoit, Marc Foretz, Bruno Guigas, Sandrine Horman, Renaud Dentin, Luc Bertrand, Louis Hue y Fabrizio Andreelli. 2006. "Activation of AMP -Activated Protein Kinase in the Liver: A New Strategy for the Management of Metabolic Hepatic Disorders." *The Journal of Physiology* 574 (1):41-53.
- Voss, H E. 1956. "Nicolai I. Lunin, 1853 -1937; a Biographical Assay." *Journal of the American Dietetic Association* 32 (4):317-20.
- Vuppalanchi, Raj, Robert J Gould, Laura A Wilson, Aynur Unalp -Arida, Oscar W Cummings, Naga Chalasani y Kris V Kowdley. 2012. "Clinical Significance of Serum Autoantibodies in Patients with NAFLD: Results from the Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network." *Hepatology International* 6 (1):379-85.
- Wallace, Sarawut Jitrapakdee and John C. 2003. "The Biotin Enzyme Family: Conserved Structural Motifs and Domain Rearrangements." *Current Protein & Peptide Science* 4(3):217-229.
- Wang, Dong, Yuren Wei, Pagliassotti y Michael J. 2006. "Saturated Fatty Acids Promote Endoplasmic Reticulum Stress and Liver Injury in Rats with Hepatic Steatosis." *Endocrinology* 147 (2):943-51.

- Watanabe, Kamiyama Mari, Shin Kamiyama, Kimiko Horiuchi, Kousaku Ohinata, Hitoshi Shirakawa, Yuji Furukawa y Michio Komai. 2008. "Antihypertensive Effect of Biotin in Stroke -Prone Spontaneously Hypertensive Rats." *The British Journal of Nutrition* 99 (4):756-63.
- Wei, Yongzhong, R Scott Rector, John P Thyfault y Jamal A Ibdah. 2008. "Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Mitochondrial Dysfunction." *World Journal of Gastroenterology* 14 (2):193-99.
- Welsh, Jean A, Andrea Sharma, Jerome L Abramson, Viola Vaccarino, Cathleen Gillespie y Miriam B Vos. 2010. "Caloric Sweetener Consumption and Dyslipidemia among US Adults." *JAMA* 303 (15):1490-97.
- Westwater, J y D Fainer. 1958. "Liver Impairment in the Obese." *Gastroenterology* 34 (4):686-93.
- Wieckowska, Anna, Nizar N Zein, Lisa M Yerian, A Rocio Lopez, Arthur J McCullough y Ariel E Feldstein. 2006. "In Vivo Assessment of Liver Cell Apoptosis as a Novel Biomarker of Disease Severity in Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 44 (1):27-33.
- Wiedmann, Silke, Rocio Rodriguez -Melendez, Daniel Ortega -Cuellar y Janos Zemleni. 2004. "Clusters of Biotin -Responsive Genes in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells." *The Journal of Nutritional Biochemistry* 15 (7):433-39.
- Wildiers, Eug. 1901. "Nouvelle Substance Indispensable Au Developpement de La Levure." *La Cellule* 18 (2):111-35.
- Williams, Christopher D, Joel Stengel, Michael I Asike, Dawn M Torres, Janet Shaw, Maricela Contreras, Cristy L Landt y Stephen A Harrison. 2011. "Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis among a Largely Middle -Aged Population Utilizing Ultrasound and Liver Biopsy: A Prospective Study." *Gastroenterology* 140 (1):124-31.
- Wolf, B, R E Grier, J R Secor McVoy y G S Heard. 1985. "Biotinidase Deficiency: A Novel Vitamin Recycling Defect." *Journal of Inherited Metabolic Disease* 8 (1):53-58.
- Yamashita, H, M Takenoshita, M Sakurai, R K Bruick, W J Henzel, W Shillinglaw, D Arnot y K Uyeda. 2001. "A Glucose -Responsive Transcription Factor That Regulates Carbohydrate Metabolism in the Liver." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the of America* 98 (16):9116-21.
- Yap, Fuichi, Lauren Craddock, Yang y Jian. 2011. "Mechanism of AMPK Suppression of LXR -Dependent Srebp -1c Transcription." *International Journal of Biological Sciences* 7 (5):645-50.
- Yates, Sandra Schlicker, Carol W. Sutor y Elisabeth A. Reese. 1998. "Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline". *Journal of the American Dietetic Association* 98(6):699-706.
- Younossi, Z M, M J Reyes, A Mishra, R Mehta y L Henry. 2014. "Systematic Review with Meta -Analysis: Non -Alcoholic Steatohepatitis - a Case for Personalised Treatment Based on Pathogenic Targets." *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 39 (1):3-14.
- Yuan, George, Khalid Z Al -Shali, R Hegele y R. 2007. "Hypertriglyceridemia: Its Etiology, Effects and Treatment." *CMAJ: Canadian Medical Association Journal = Journal de l'Association Medicale Canadienne* 176 (8):1113-20.
- Zaragoza, Histología - Universidad de. 2018. "Glándulas Digestivas." Accessed August 13. http://wzar.unizar.es/acad/histologia/paginas_he/05_ApDig/Higado/HigadoLob_40etq.htm.
- Zelber, Sagi Shira, Ada Kessler, Eli Brazowsky, Muriel Webb, Yoav Lurie, Moshe Santo, Moshe Leshno, Laurence Blendis, Zamir Halpern y Ran Oren. 2006. "A Double -Blind Randomized Placebo -Controlled Trial of Orlistat for the Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice*

- Journal of the American Gastroenterological Association* 4 (5):639-44.
- Zempleni, Janos. 2005. "Uptake, Localization y Noncarboxylase Roles of Biotin." *Annual Review of Nutrition* 25:175-96.
- Zempleni, Janos, Daniel Camara Teixeira, Toshinobu Kuroishi, Elizabeth L Cordonier y Scott Baier. 2012. "Biotin Requirements for DNA Damage Prevention." *Mutation Research* 733 (1 -2):58-60.
- Zhang, H, K Osada, H Sone y Y Furukawa. 1997. "Biotin Administration Improves the Impaired Glucose Tolerance of Streptozotocin -Induced Diabetic Wistar Rats." *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 43 (3):271-80.

11. -ANEXOS

Artículo publicado con algunos datos obtenidos de la presente tesis.

NUTRITION RESEARCH 37 (2018) 26–36



Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

www.nrjournal.com



Protective effect of supplementation with biotin against high-fructose-induced metabolic syndrome in rats



Asdrubal Aguilera-Mendez^{a,*}, María G. Hernández-Equihua^a, Alfonso C. Rueda-Rocha^a, Clotilde Guajardo-López^b, Renato Nieto-Aguilar^c, Deyanira Serrato-Ochoa^c, León F. Ruíz Herrera^a, José A. Guzmán-Nateras^d

^a Institute of Biological Chemistry Research, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 58040, Morelia, Michoacán, Mexico
^b Private practice, General and Oncological Histopathological Diagnosis ROBBINS, 58060, Morelia, Michoacán, Mexico
^c University Center to Postgraduate Studies and Research, School of Dentistry, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 58337, Morelia, Michoacán, Mexico
^d Center for Medicine and Research and Sciences Applied to Sport, 58010, Morelia, Michoacán, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:
Received 4 November 2017
Revised 22 May 2018
Accepted 27 June 2018

Keywords:
Biotin
Metabolic Syndrome
High-Fructose Diet
Rats

ABSTRACT

Several reports have demonstrated that pharmacological concentrations of biotin reduce hyperglycemia, hypertriglyceridemia, and hypertension. We hypothesized that biotin could exert a protective effect on some illness-associated metabolic syndrome. To test this hypothesis, male Wistar rats were fed a diet containing 30% fructose in drinking water and classified into four groups: C, the control group; B, the group receiving biotin (intraperitoneal injection, 2 mg/kg); F, the group receiving fructose (30% w/v); and FB, the group receiving fructose-biotin. The administration of biotin began after the rats had been on a high-fructose diet for 12 weeks and continued for 4 weeks. Our results showed that food and fluid intake were diminished in the F and FB groups. However, the final body weights were similar between the groups. A significant increase in hepatic triglyceride and cholesterol content, plasma cholesterol, triglycerides, transaminases, low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c), systolic blood pressure, and vasoconstriction, as well as a decrease in high-density lipoprotein cholesterol (HDL-c) were observed in the F group. Glucose tolerance and insulin tolerance were also impaired in the F group. The administration of biotin ameliorated all these changes. Hepatic oxidative stress as well as macrovesicular fatty changes in hepatocytes caused by a high-fructose diet were also improved by biotin. Our findings demonstrate that biotin has a protective role against metabolic syndrome by improving insulin resistance associated with normal hepatic and serum levels of triglyceride and cholesterol, blood pressure, and the prevention of steatosis and hepatic oxidative damage. Therefore, biotin could be used as a therapeutic strategy in the pharmacological treatment of metabolic syndrome.

© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

Abbreviations: ALT, Alanine aminotransferase; AST, Aspartate aminotransferase; HDL, High-density lipoprotein; IP, Intraperitoneally; LDH, Lactate dehydrogenase; LDL, Low-density lipoprotein; PBS, Phosphate-buffered saline; PE, Phenylephrine; SBP, Systolic blood pressure; SHSPR, Spontaneously hypertensive stroke-prone rats; TBA, Thiobarbituric acid; TBARS, Thiobarbituric acid-reactive substances.

* Corresponding author at: Av. J. Mújica, Morelia, Michoacán, 58040, Mexico. Tel.: +52 55 326 57 88; fax: +52 55 326 57 90.
E-mail address: amendez@umich.mx (A. Aguilera-Mendez).

<https://doi.org/10.1016/j.nutres.2018.06.007>
0271-5317/© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Metabolic syndrome has become a worldwide health issue because of its relation with cardiovascular disease, obesity, and diabetes, which have high morbidity and mortality rates. Its pathogenesis is extremely complex, but it is believed to be the result of a combination of genetic and environmental factors, which include cardiometabolic risk factors such as obesity, insulin resistance, glucose intolerance, dyslipidemia, hepatic steatosis, and hypertension [1,2]. In recent years, a relation has been demonstrated between high fructose intake and metabolic syndrome, both in human and animal-based studies [1,3-6]. Fructose is widely used worldwide as a sweetener in fruit juices, jams, soft drinks, and candies. Rats fed with a high-fructose diet (10%–60%) can develop an insulin-resistant state and hypertriglyceridemia, which has been used as an adequate animal model for human metabolic syndrome [1,5].

The clinical management of metabolic syndrome is very difficult because there is no established unique drug treatment to prevent or improve the syndrome as a whole. In fact, its treatment is challenging, considering the magnitude of the problem [7]. Therefore, it is imperative that therapeutic alternatives and adjuvants are found. Recently, there has been a great interest in the use of vitamins, because several studies have demonstrated that pharmacological concentrations are useful to treat illness related to metabolic syndrome [8-10].

The water-soluble vitamin biotin (B7) serves as a coenzyme of carboxylases enzymes. Biotin, at pharmacological concentrations that range from 30 to 650 times [11] the daily requirements (30–50 µg), has been shown to modify gene expression (e.g., interleukin-2 receptor-γ, biotin transporters, holocarboxylase synthetase) [12,13], immunological processes [14], and lipid and carbohydrate metabolism [15].

Diverse studies have found that administration of biotin in pharmacological doses has hypoglycemic and hypotriglyceridemic effects, both in patients [16-20] and murine models [21-25]. In addition, it has been reported that biotin use in spontaneously hypertensive stroke-prone rats (SHSPR) decreased hypertension, coronary artery thickening, and cardiac arrest incidence [26]. However, as yet there is no published study on the role of biotin in the complications of metabolic syndrome in high-fructose-fed rats.

Considering the significant antihyperglycemic, antihypertriglyceridemic, and antihypertensive effects of biotin [16-26], we hypothesized that supplementation with biotin might exert a protective effect on metabolic syndrome-related metabolic disorders, such as hyperglycemia, insulin resistance, dyslipidemia, hepatic steatosis, hepatic lipoperoxidation, and high blood pressure in high-fructose diet fed rats. To test our hypothesis, we evaluated several metabolic and physiological changes on a model of metabolic syndrome induced by high fructose consumption. We examined food and water intake, body weight, insulin resistance, lipid accumulation, hepatic lipoperoxidation, serum profiles of lipids and transaminases, as well as blood pressure and arterial vasoconstriction of rats after supplementation with biotin as potential targets of its protective effects on the phenotype changes induced by a high-fructose diet.

2. Methods and materials

2.1. Animals and experimental design

Twenty-four male Wistar rats (age 6 wk) were used for the experiments. Rats were handled under the established guidelines for the use and care of laboratory animals of Mexico, and approved by the Biosecurity and Bioethics Committee of the Biological Chemistry Research Institute / UMSNH (NOM-062-ZOO-1999). During the experimental period, the animals were kept in standard environmental conditions (temperature: 25 °C ± 2°C, light/dark cycle: 12-12 h). The rats were randomly divided into four groups (n = 6): control (C), biotin (B), fructose (F), and fructose-biotin (FB). All groups were fed with a standard diet (Basal diet 5755, LabDiet, LandOLakes, Inc) without changes in ingredients during treatment with biotin and fructose (Table 1), in accordance with the standard recommendations for rodents in the maintenance state of the American Institute of Nutrition (AIN-93 M) [27], and tap water ad libitum. The F and FB groups were given fructose (SIGMA) 30% (w/v) in their drinking tap water ad libitum for 16 weeks, and the F group was administered the phosphate-buffered saline (PBS) vehicle, intraperitoneally (IP) daily for the last 4 weeks of the fructose treatment (16 wk). The B and FB groups were supplemented with biotin (SIGMA) (2 mg/kg of weight, IP, which represent about 35 times its daily requirement in rats [27]), dissolved in PBS buffer (pH 7.4), daily for the last 4 weeks of the fructose treatment (16 wk), and only the FB group had free access to freshly prepared 30% fructose solution in tap water for 16 weeks. The dose of biotin was based on previous studies that showed significant changes in serum lipids [18,19,24] and studies in our laboratory. The C group was only administered the PBS vehicle (IP, for the same time that biotin injection) and tap water without fructose. Two independent experiments were performed with the same conditions.

Table 1 - Ingredient composition of the diets fed to rats

Ingredients (g/kg)	Standard diet
Casein	140.0
L-Cystine	1.8
Corn Starch	465.6
Maltodextrin	155.0
Sucrose	100.0
Cellulose	50.0
Soybean oil	40.0
Choline Bitartrate	2.5
Vitamin mix ^a	10.0
D-Biotin	0.00002
Mineral Mix ^b	35.0
TBHQ ^c	0.008

Standard diet: 10% energy from lipids, 60.6% from carbohydrate, and 18.6% from protein.

^a Mineral mix, AIN-93G-MX (94046).

^b Vitamin mix, AIN-93G-VX (94047).

^c TBHQ, tertiary butylhydroquinone as antioxidant.

2.2. Food consumption and water and body weight assessment

Food and water consumption was measured daily, and we showed an average total intake over the course of the 16 weeks. Body weight was measured every third day during the 16-week treatment with fructose and expressed as the initial weight (g) before treatment and week-16 weight (g) at the end of treatment.

2.3. Estimation of intraperitoneal insulin and glucose tolerance test

For the glucose tolerance test, animals were fasted for 12 h and given glucose (2 g/kg IP). Then, blood samples were obtained by tail nick, and glucose levels were determined at 0, 30, 60, and 120 min using a glucometer (Accutrend Plus, ROCHE) after the glucose administration. For the insulin tolerance test, fed rats were injected intraperitoneally with 1 IU/kg body weight of regular human insulin (Lilly). Caudal vein blood glucose concentrations were determined at 0, 30, 60, and 120 min after the insulin administration using a glucometer (Accutrend Plus, ROCHE), as reported previously [23].

2.4. Estimation of triglyceride, total cholesterol, LDL, and HDL levels

After 16 weeks of treatment, the animals were made to fast for 12 h, and blood samples were then collected by cardiac puncture in anesthetized (sodium pentobarbital, 55 mg/kg IP) animals. Triglycerides were quantified with a colorimetric enzymatic method by means of the commercial kit GPO-POD-Enzymatic-Colorimetric (Spinreact) [22]. LDL-c and HDL-c levels were measured using the LDLc-D-Direct Enzymatic-Colorimetric and HDLc-D-Direct Enzymatic-Colorimetric (Spinreact) commercial kits, respectively, following the instructions of the manufacturer.

2.5. Measurement of hepatic triglyceride and cholesterol content

The concentrations of hepatic triglyceride and cholesterol were determined following the protocol reported by [22] using a colorimetric enzymatic method by means of the commercial kits GPO-POD-Enzymatic-Colorimetric (Spinreact) for triglyceride and CHOD-POD GPO-POD-Enzymatic-Colorimetric (Spinreact) for cholesterol, following the manufacturer's instructions.

2.6. Liver function tests

On the last day of the experimental period and after a 12-hour fast, blood samples were collected by cardiac puncture in anesthetized animals. Whole blood was collected from the abdominal aorta to obtain the serum [56]. Aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and lactate dehydrogenase (LDH) were assessed using the colorimetric enzymatic method in VITROS 4600 Chemistry System (Ortho-Clinical Diagnostic) automated equipment.

2.7. Hepatic tissue lipoperoxidation quantification

Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) were estimated as described by Ohkawa et al. [28]. Briefly, 100 μ g of liver tissue samples were thawed once and homogenized in 10% w/v ice-cold 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). The homogenates were used for estimation of TBARS as a marker of lipoperoxidation according to the Lipid Peroxidation (Biovision) kit. The extent of TBARS in liver was determined by measuring malondialdehyde content based on the reaction with thiobarbituric acid (TBA) using a colorimetric method according to the instructions of the manufacturer. Absorbance was measured at 532 nm using a spectrophotometer (Jenway, 7305).

2.8. Hematoxylin–eosin staining of hepatic tissue

Rat livers were collected, cut into small pieces, and fixed in 10% paraformaldehyde. Samples were embedded in paraffin; then, 6- μ m cuts were made, and the sections were mounted in object holders. The paraffin sections were deparaffinized by immersing in xylene and rehydrated through a series of graded alcohols (100%, 95%, and 75%) for 15 min each and stained with hematoxylin and eosin (H&E) under a standard technique [29]. The slides were examined under light microscopy using a camera adapted at the microscope (LEICA DM3000). Images were taken at a magnification of 450 \times .

2.9. Systolic arterial pressure measurement

Blood pressure was measured by the tail-cuff plethysmography method in nonanesthetized rats, as described earlier Prabhakar et al. [30]. Briefly, 2 weeks before starting the biotin and PBS treatment, the rats were preconditioned to pressure measurements. Before the measurements, the animals were put in an incubator at 37 °C for 30 min to dilate the caudal artery. Then, systolic blood pressure was measured using a noninvasive system (CODA tail-cuff blood pressure system, Kent Scientific Corporation). For each rat, the mean of four different measurements was registered. Measurements were considered valid only if there were no differences between them of over 5 mm Hg.

2.10. Isolation of rat aortic rings and assessment of vascular function

The determination of aorta contraction was performed as described earlier [31]. Briefly, animals were fasted for 12 h. A thoracotomy was performed to obtain aortic rings of 3 to 4 mm in length with and without endothelium, and rats were euthanized. The rings were placed on microm hooks in isolated tissue chambers containing Krebs–Henseleit solution (millimolar composition: NaCl: 118; KCl: 4.7; KH_2PO_4 : 1.2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 1.2; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 2.5; NaHCO_3 : 20; glucose: 11.7, and EDTA: 0.026). Tissues were kept at 37 °C with a constant bubbling of carbogen (95% O_2 and 5% CO_2) in the solution. Rings were stabilized for 30 min with an initial tension of 3 g, after which their integrity was tested by their contractile responses to phenylephrine (PE) (1×10^{-8} M) every 30 min, with intermediate washing, until maximum sensitivity was developed. Concentration-response

Table 2 – Water, food intake, and body weight quantification

Variables	Groups			
	C	B	F	FB
Water (ml)	55.64 ± 0.88 ^a	53.77 ± 1.05 ^a	38.91 ± 1.83 ^{ab}	39.34 ± 1.77 ^{ab}
Food intake (g)	22.56 ± 1.11 ^a	21.39 ± 1.2 ^a	13.66 ± 0.75 ^{ab}	12.81 ± 0.87 ^{ab}
Initial body weight (g)	148.11 ± 10.5	151.45 ± 11.2	150.17 ± 11.5	149.89 ± 10.8
Final body weight (g)	385.16 ± 28.8	383.58 ± 29.1	379.25 ± 27.8	378.78 ± 34.6

Showing average daily food and water intake considering intake from the first day to the end of 16 weeks.

Values are presented as means ± SEM (n = 6).

Means in a row with superscripts without a common letter differ, P < .05. One-way ANOVA with Tukey post hoc test was used to determine significant differences between treatment groups.

curves to PE were obtained by adding cumulative concentrations (1X10⁻⁹-1X10⁻⁵ M) of this drug. The contraction register was measured by a tension transducer (Grass FT03, Astro-Med), which was connected to a data acquisition system MP100 (Biopac Systems).

2.11. Statistical analyses

We employed a power analysis accomplished with G Power version 3.1 [32] to establish an acceptable sample size to study a significant difference of parameters. The representative sample size was calculated using the power procedure for one-way analysis of variance (ANOVA), consider an α probability of .05 with a power of 0.80, and an effect size was calculated using the results from our pilot study. This power analysis showed that a sample size of six animals per group was necessary. Values are expressed as the means ± standard error of the mean. For the figures displaying glucose tolerance test and lipid measures were analyzed using repeated measures and the others results were analyzed using ANOVA to compare the differences between various experimental groups, and a the Tukey comparison test was done to test significance. A value of P < .05 was considered statistically significant. Figures and statistical analyses were obtained by the Statistical Analysis System (SigmaPlot® 11.0).

3. Results

3.1. Weight, food, and water intake quantification

No significant differences in the body weight were observed between the groups at the beginning of the study and at any point of time during the 16 weeks of fructose treatment. Food and water intake were similar among groups C and B and between groups F and FB. However, in groups F and FB, there was an approximate difference of 40% less food and water consumption when compared with groups C and B (Table 2; P < .05).

3.2. Effects of biotin on insulin resistance in high-fructose-fed rats

To determine whether biotin had a protective effect on insulin sensitivity in high-fructose-induced metabolic syndrome, we performed a glucose tolerance test and insulin test tolerance. After 8 weeks of fructose feeding, an intraperitoneal glucose

load led to a marked increase in blood glucose levels in group F, at 0, 30, 60, and 120 min, compared to all groups. The administration of biotin (groups FB and B) significantly prevented this increase in fasting glucose caused by the high-fructose diet at 16 weeks in group FB at 30, 60, and 120 min, compared with groups C and F, and in group B at 30 and 60 min, compared with groups C and F (Fig. 1A; P < .05). In the insulin

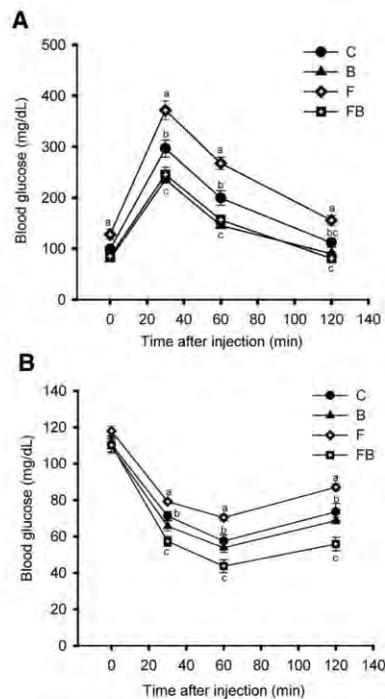


Fig. 1 – Effect of biotin on intraperitoneal glucose tolerance test (A) and intraperitoneal insulin tolerance test (B). Data (n = 6) are presented as means ± SEM. Means without a common letter differ, P < .05. Statistical significance was determined by repeated measures, followed by the Tukey post hoc test to determine significant differences between treatment groups.

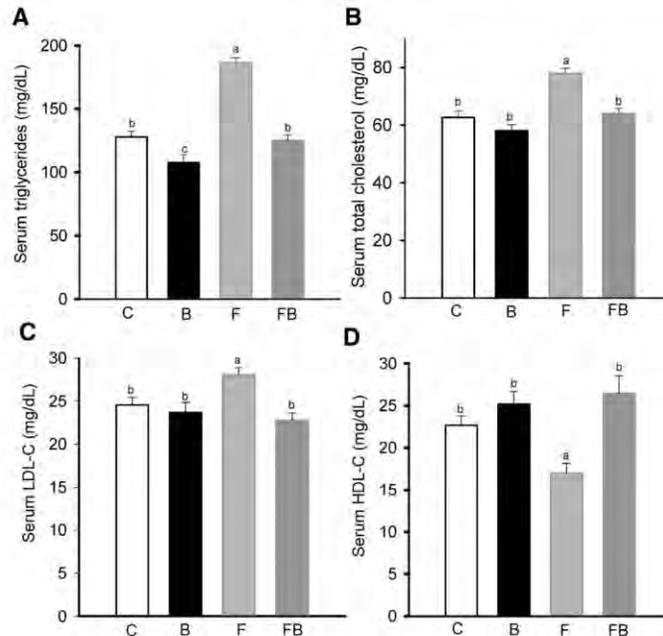


Fig. 2 – Effect of biotin on serum lipids. Serum triglycerides (A). Serum total cholesterol (B). Low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c) levels (C). High-density lipoprotein cholesterol (HDL-c) levels (D). Data (n = 6) are presented as means ± SEM. Means without a common letter differ, $P < .05$. Statistical significance was determined by repeated measures, followed by the Tukey post hoc test to determine significant differences between treatment groups.

tolerance curve, the glucose concentration of group F was higher compared to the rest of the groups. However, the administration of biotin prevented this increase in serum glucose levels in group FB at 30, 60, and 120 min, compared with group F. Group B showed no decrease compared with groups C and FB (Fig. 1B; $P < .05$).

3.3. Blood quantification of triglycerides, total cholesterol, LDL, and HDL

The high-fructose-fed (group F) rats had a significantly higher level of serum triglycerides compared with all groups, and a decrease was observed in group FB when compared with group F. Group B had a decrease of serum triglycerides after biotin treatment compared with group C (Fig. 2A; $P < .05$). Regarding cholesterol levels, group F had an increase compared with the rest of the groups, and group FB displayed diminished levels when compared with group F, after treatment of biotin. Animals in group B did not display any differences with groups C and FB (Fig. 2B; $P < .05$). Group F showed an increase in LDL lipoprotein concentration compared with the all groups. Group FB had an LDL level decrease compared with group F, whereas group B did not show any changes compared with group C and FB (Fig. 2C; $P < .05$). Regarding HDL lipoprotein levels, group F was observed to be

lower than the other groups. Whereas, groups B and FB presented an increase with compared with groups C and F, respectively. Nevertheless, the observed increase for group B was not statistically significant (Fig. 2D; $P < .05$).

3.4. Hepatic triglyceride and cholesterol levels

High-fructose diet rats had a significantly higher level of hepatic triglycerides, compared with all groups. Biotin significantly prevented the increase in the hepatic triglycerides in group FB compared with group F. Similarly, hepatic triglyceride concentration in animals from group B showed a decrease compared with group C (Fig. 3A; $P < .05$). Regarding hepatic cholesterol concentration, the groups presented a similar response as with triglyceride content. Nevertheless, the decrease displayed by group B compared with group C was not statistically significant (Fig. 3B; $P < .05$).

3.5. Hepatic tissue histopathological studies

Histopathological studies of the liver demonstrated that there were macrovesicular fatty changes of the hepatocytes in group F, as well as the presence of a chronic discrete inflammatory infiltrate in the triad portal, the congestive centrolobulillar vein, and small venous vessels with moderate

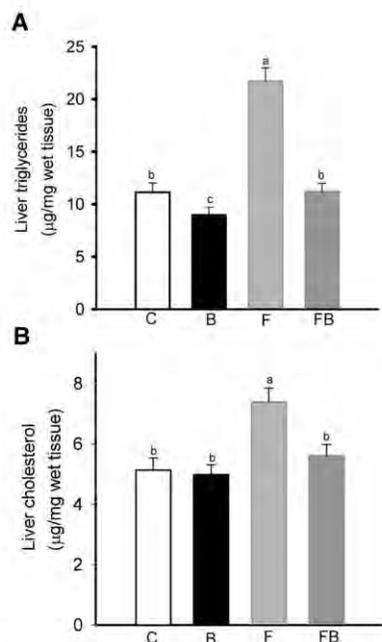


Fig. 3 – Effect of biotin on hepatic lipids. Liver triglycerides (A). Liver cholesterol (B). Data (n = 6) are presented as means ± SEM. Means without a common letter differ, P < .05. Statistical significance was determined by repeated measures, followed by the Tukey post hoc test to determine significant differences between treatment groups.

vascular congestion. Atypical fibrosis or necrosis were not observed. In group FB, a marked decrease in the number and size macrovesicular lipid droplets was observed with respect to group F. Also, a reduction in the portal triad, centrolobulillar, and small venous vessel inflammation was noted. A normal liver architecture was observed groups C and B (Fig. 4).

3.6. Transaminases (AST, ALT) and lactic dehydrogenase (LDH) quantification

There was an increase of transaminases and LDH in groups F and FB compared with groups C and B. However, administration of biotin significantly prevented the high-fructose diet induced increase in these metabolite levels, in group FB compared with group F. Whereas, values in group B showed no change compared with group C (Table 3; P < .05).

3.7. Hepatic tissue lipoperoxidation

Hepatic TBARS levels in group F were higher than those in the rest of the groups. Administration of biotin significantly (P < .05) decreased hepatic TBARS levels in fructose-fed rats

when compared to group F. Groups C and B did not show differences among them (Fig. 5; P < .05).

3.8. Arterial blood pressure measurement

An increase in systolic blood pressure (SBP) was observed in group F compared with the rest of the groups. Biotin administration significantly prevented the increase in the systolic blood pressure at 16 weeks compared with group F. There was no significant difference in the diastolic blood pressure among groups C and B (Fig. 6; P < .05).

3.9. Effects of biotin on precontracted rat aorta

Vascular responses in isolated thoracic aortic rings with endothelium from high-fructose-fed rats was higher when compared with the rest of the groups (P < .05). Nevertheless, biotin supplementation diminished vascular responses in isolated thoracic aortic rings to noradrenaline, compared with group F. Whereas, group B kept the same values as the control group. In isolated thoracic aortic rings without endothelium from a high-fructose diet, the contractile response in group F was greater compared with other groups. Moreover, biotin administered significantly prevented the contractile response in group FB compared with group F. No change in group B was observed compared with group C (Fig. 7B; P < .05).

4. Discussion

Several studies have shown that pharmacologic concentrations of biotin have hypotriglyceridemic [16,18,22-24], hypoglycemic [17,19,20,21,25], and antihypertensive [26] effects. However, it has not been reported that biotin, at pharmacological concentrations, modifies each of these conditions in a model with a metabolic challenge such as metabolic syndrome. In this study, we show that in a metabolic syndrome model developed by the chronic ingestion of fructose, biotin had a protective effect on several of its manifestations, reducing hyperglycemia, insulin resistance, dyslipidemia, hepatic steatosis, hepatic lipoperoxidation, and high blood pressure.

We observed that water and food intake was less in rats fed with fructose (groups F and FB) compared with groups C and B. In the case of less water intake, it is probably due to high fructose concentration (30%) producing a too sweet flavor, which affected palatability in the rats, as shown in other studies [5,33-35]. In the case of food intake, fructose consumption has been associated with a decrease in food intake [36]. Nonetheless, there were no changes in body weight in any of the groups, despite significantly decreased food intake; this is probably due to the fact that the extra high-fructose diet increased total caloric intake, as previously reported [5,33,37,38].

Glucose intolerance is one of the primary components of metabolic syndrome, and it is related to type 2 diabetes progression. Changes in blood glucose levels after the administration of a glucose bolus have proven the information about insulin resistance and the pancreas endocrine function. In our study, a high-fructose diet led to a marked

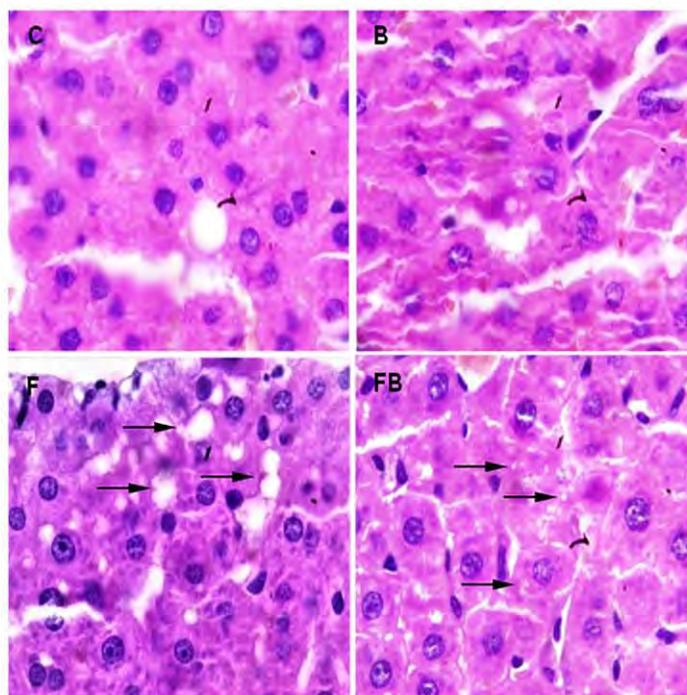


Fig. 4 – Representative microphotographs of H&E staining of liver sections. Control group (C), normal liver architecture with almost no vesiculation of the cytoplasm of hepatocytes. Biotin group (B), the usual liver appearance as control group. Fructose group (F), showing macrovesicular steatosis (arrows). Fructose-biotin (FB), macrovesicular steatosis was reduced (arrows). Magnification 450x. (n = 6).

increase in blood glucose levels in group F. Conversely, biotin treatment significantly reduced fasting glucose levels and improved glucose tolerance in rats of group FB. It has been reported that fructose produces an increment in gluconeogenesis in male rats [39]. The hypoglycemic effect of biotin at pharmacological doses can be linked to a decrease in the expression of critical genes of gluconeogenesis, such as PEPCK [40] and glucose-6-phosphatase [41] and an increase in the expression of genes related to glycolysis, such as the hepatic glucokinase [42-44] and the insulin receptor [45]. In addition, Romero and collaborators have shown an increase in the

expression and secretion of insulin in pancreatic islets of rats in response to biotin treatment [46].

Dyslipidemia is a characteristic component of metabolic syndrome, and it has been shown that chronic fructose ingestion favors hepatic lipogenesis, increasing lipid accumulation in the liver, as well as their secretion and an increase in blood content [47]. Our data demonstrated that 4 weeks of biotin administration reduced the content of serum and hepatic triglycerides in groups FB and B, and this has been reported by us and other authors [22-24]. No change was registered in serum and hepatic cholesterol content in

Table 3 – Effects of biotin on hepatic parameters in rats

Variables	Groups			
	C	B	F	FB
AST(IU/L)	64.00 ± 5.86 ^a	62.77 ± 7.51 ^a	106.71 ± 9.23 ^{abc}	78.34 ± 8.77 ^{ab}
ALT(IU/L)	37.56 ± 4.10 ^a	38.19 ± 3.05 ^a	65.66 ± 5.75 ^{abc}	44.81 ± 4.13 ^{ab}
LDH (IU/L)	230.16 ± 22.8 ^a	222.58 ± 19.1 ^a	383.25 ± 37.81 ^{abc}	256.78 ± 24.11 ^{ab}

Data are presented as the means ± SEM (n = 6).
Different letters within the same row indicate significant differences at P<.05 by one-way ANOVA followed by Tukey's test.

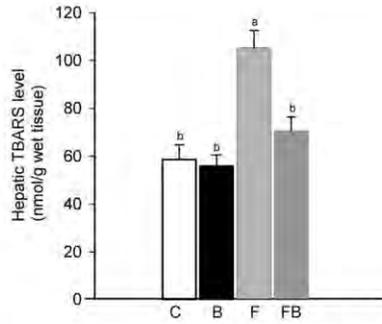


Fig. 5 – Effect of biotin on hepatic lipoperoxidation. Hepatic TBARS level. Data (n = 6) are presented as means ± SEM. Means without a common letter differ, P < .05. Statistical significance was determined by one-way ANOVA, followed by the Tukey post hoc test to determine significant differences between treatment groups.

animals of group B, which coincides with studies performed on rats [24]. Nevertheless, we show for the first time that there is a decrease in the level of hepatic cholesterol in rats fed with fructose and treated with biotin. The decrease in cholesterol and hepatic triglyceride content matches the H&E histologies, where a decrease in lipid vacuole content was observed in group FB when compared with group F. Equally, several authors have observed that biotin improves the histopathological characteristics in several organs of diabetic rats and mice fed with high-fat diets [21,25,48]. In the lipoprotein profile, biotin supplementation showed a decrease in LDL and an increase in HDL, which agrees with the total serum cholesterol results in those same groups.

Even though the modulating mechanisms of lipid metabolism by pharmacological concentrations of biotin are not completely known, we found in a previous study [22] a

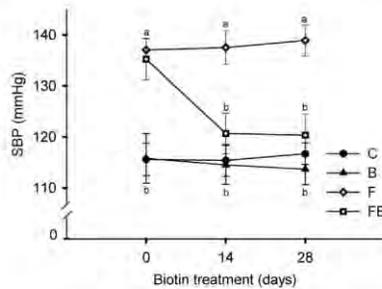


Fig. 6 – The effect of biotin on the systolic blood pressure. Data (n = 6 rats per group, 4 repetitions) are presented as means ± SEM. Means without a common letter differ, P < .05. Statistical significance was determined by one-way ANOVA, followed by the Tukey post hoc test to determine significant differences between treatment groups.

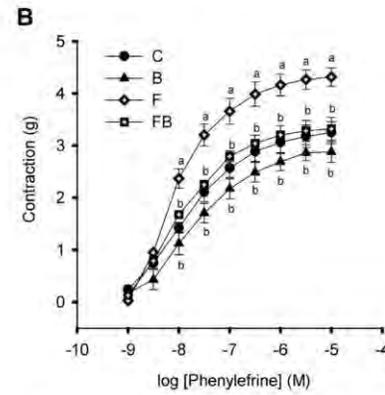
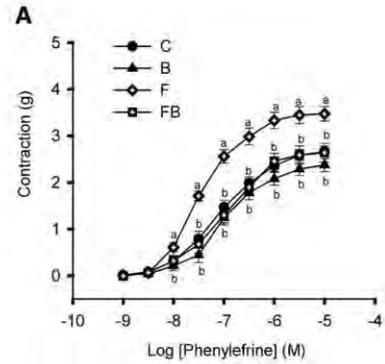


Fig. 7 – Effect of biotin on phenylephrine accumulative concentration-response curves on aortic rings with or without endothelium. Effect on rat aorta rings with endothelium (A). Effect on rat aorta rings without endothelium (B). Data (n = 6) are presented as means ± SEM. Means without a common letter differ, P < .05. Statistical significance was determined by one-way ANOVA, followed by the Tukey post hoc test to determine significant differences between treatment groups.

decrease in the concentration of hepatic triglyceride in healthy mice and proposed that such decrease is linked with a decrease in the protean mass of the SREBP-1c transcriptional factor, which has been proven to increase its expression with chronic fructose treatment [49]. We also observed a decrease in the total mass of the FAS enzyme and phosphorylation of ACC 1 carboxylase. Furthermore, were observed a phosphorylation (activation) of AMPK kinase, which is key in the control of lipid synthesis and is closely linked to several diseases associated with metabolic syndrome [50]. Boone also found that biotin supplementation in healthy mice decreased the concentration of free fatty acids in serum [51], which can be trapped by the liver and serve as substrates for esterification [52]; thus, their decrease could contribute to a decrease in

lipogenesis and lipoprotein export. In addition, Larrieta showed that biotin supplementation in healthy mice reduces the mRNA of genes related to lipid synthesis both in the adipose tissue and liver [23]. This way, pharmacological biotin treatment in a metabolic syndrome model has an hypolipidemic effect as it diminishes the flow of fatty acids toward the liver and inhibits hepatic lipogenesis and, as a result, hepatic steatosis. Therefore, safely blocking *de novo* lipogenesis may provide a beneficial therapeutic approach.

Also, recently Lazo de la Vega [53] demonstrated that dietary biotin supplementation increased glucagon expression and secretion without affecting fasting blood glucose concentrations and without affecting glucagon action in the liver, which could also explain the effect of biotin on lipid metabolism homeostasis, since glucagon inhibits lipogenesis. In addition, beta-oxidation of fatty acids is stimulated to degrade them and obtain energy [54]. Furthermore, glucagon has been related to acutely enhanced hepatic lipid clearance and suppressed *de novo* lipogenesis in mice [55].

The parameters of the hepatic function (ALT, AST, and LDH) in high-fructose-fed rats had higher values. This indicates a possible alteration in the hepatocytes' plasmatic membrane, which produces the exit of these enzymes toward the extracellular fluids and is indicative of hepatic steatosis. There was no significant difference in group B in the values of transaminases, which was also reported by Riveron and his collaborators, where they observed that biotin supplementation in healthy mice did not modify the values of transaminases [56]. However, we did observe a decrease in group FB, which coincides with reports by other authors, both in diabetic mice [25] and diabetic rats fed with a high-fat diet [21]. These researchers observed a decrease in the transaminases in biotin-treated animals, which would indicate that biotin reestablishes the metabolic imbalance in the liver in diabetic models. For the first time, we showed that biotin also does so in a metabolic syndrome model in which several metabolic diseases are present.

In hepatic lipoperoxidation, we did not observe any changes in group B compared with the control group. Our data are in agreement with Riveron and collaborators [56]. On the contrary, in group F we observed a marked increase in hepatic lipoperoxidation; but when treated with biotin, there was a decrease reaching values similar those of groups C and B. It has been reported that the chronic consumption of fructose produces an increase in hepatic lipoperoxidation due to the fact that one of the key enzymes in fructose metabolism, fructokinase 1, is fructose-specific and is not retro-inhibited by the product, unlike glucokinase. Thus, phosphorylation of elevated fructose concentrations in the liver can deplete the adenosine triphosphate (ATP), which in turn can induce lipid lipoperoxidation, inflammation, and hepatic damage [49]. Furthermore, hyperglycemia contributes to the generation of reactive oxygen species (ROS), which cause cellular damage in many ways [25]. Consequently, as biotin inhibits lipogenesis and gluconeogenesis, and improves insulin sensitivity and glucose tolerance, it provokes a decrease in the formation of ROS that contribute to hepatic lipoperoxidation in the group fed with fructose.

Arterial hypertension is another key component of metabolic syndrome, and it has been shown that chronic fructose administration induces arterial hypertension in a persistent manner [57]. Several factors are believed to participate in the etiology and

maintenance of hypertension, such as the increase in sympathetic activity, an increase in circulating catecholamines, an increase in the activity of the renin-angiotensin system and angiotensin II, a renal alteration, insulin resistance, and endothelial damage [58]. We found reduced arterial pressure in the FB group, without changes in the B group compared with the C group, which agrees with the report by Watanabe in 2008, where changes were observed only in sick rats (hypertensive SHSPR strain) treated with biotin. Contractile response to phenylephrine with and without endothelium showed an increase in the F group compared with all groups, and biotin treatment induced a decrease in the FB group compared with the F group. These results indicate that the vasorelaxant effect of biotin is independent of the presence of endothelium and, consequently, of the direct formation of nitric oxide. These results also match those reported by Watanabe, who found that biotin has a hypotensor effect in hypertensive rats, stating that it is through the activation of guanylate cyclase and independent of the formation of nitric oxide [26]. Our results show that biotin improved the endothelial function. It is possible that biotin may act by modulating any mechanism of hypertension that participates in the etiology and maintenance previously described, and could prevent cardiovascular damage associated metabolic syndrome.

Our hypothesis was accepted. In accordance with our hypothesis, biotin supplementation had a protective effect in high-fructose-induced metabolic syndrome in rats. Our results support this hypothesis because high-fructose-fed rats supplemented with biotin had increased glucose and insulin tolerance. And, thus, this group had improvement of insulin sensitivity. Moreover, biotin had the ability to block hepatic lipid accumulation and had a protective effect against dyslipidemia, oxidative stress hepatic, and hypertension.

Nevertheless, this study also has some limitations that need to be considered. The high-fructose diet rat model does not completely mirror the development and progression of metabolic syndrome in humans; therefore, extrapolation of the obtained data to humans is tricky because of interspecies differences. Further, it is noteworthy that is necessary to try different optimum doses and treatment times; future studies should address these limitations. Despite these limitations, we were able to define the protective effect of biotin on complications related to a metabolic syndrome model in rats.

In conclusion our data shows, for the first time, that biotin administration exerts a protective effect on some alterations related to metabolic syndrome, such as hyperglycemia, insulin resistance, dyslipidemia, hepatic steatosis, and hypertension. In addition, biotin showed additional beneficial effects by reducing the hepatic oxidative stress. This study elucidates that biotin may be considered as a promising therapeutic strategy for the prevention and treatment of metabolic syndrome. Currently, there are no consistently effective therapies for metabolic syndrome, and biotin therapy also could be avoid the long-term undesirable effects of drugs.

Acknowledgment

This research was funded by grant C.I.C.-UMSNH 3.36, and CECTI CB 16. María Guadalupe Hernández Equihua and Alfonso Characu Rueda Rocha are recipients of the CONACYT scholarship

number CVU 687564 and CVU 733965, respectively. We acknowledge that the authors 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. The authors would like to thank Luis Fernando Guzmán Nateras for the English language review. Conceived and designed the experiments: AAM. Performed the experiments: MHE, ARR, CGL. Analyzed the data: AAM, RNA, DSO. Contributed reagents/materials/analysis tools: AAM, MHE, ARR. Wrote the paper: AAM, JGN.

REFERENCES

- [1] Aydin S, Aksoy A, Aydin S, Kalayci M, Yilmaz M, Kuloglu T, et al. Today's and yesterday's of pathophysiology: biochemistry of metabolic syndrome and animal models. *Nutrition* 2014;30:1–9.
- [2] Kim C, Younossi Z. Nonalcoholic fatty liver disease: a manifestation of the metabolic syndrome. *Cleve Clin J Med* 2008;75:721–8.
- [3] Guzmán-Gerónimo RI, Alarcón-Zavaleta TM, Oliart-Ros RM, Meza-Alvarado JE, Herrera-Meza S, Chávez-Servia J. Blue maize extract improves blood pressure, lipid profiles, and adipose tissue in high-sucrose diet-induced metabolic syndrome in rats. *J Med Food* 2017;20:110–5.
- [4] Johnson RJ, Segal MS, Sautin Y, Nakagawa T, Feig DI, Kang DH, et al. Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2007;86:899–906.
- [5] Mamikutty N, Thent ZH, Sapri SR, Sahrudin NN, Yusof MR, Suhaimi FH. The establishment of metabolic syndrome model by induction of fructose drinking water in male wistar rats. *Biomed Res Int* 2014;2014:263897.
- [6] Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr* 2004;79:537–43.
- [7] Altabas V. Drug treatment of metabolic syndrome. *Curr Clin Pharmacol* 2013;8:224–31.
- [8] Rhee E, Plutzky J. Retinoid metabolism and diabetes mellitus. *Diabetes Metab J* 2012;36:167–80.
- [9] Choudhury R. Effects of high-dose modified-release nicotinic acid on atherosclerosis and vascular function: a randomized, placebo-controlled, magnetic resonance imaging study. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:1787–94.
- [10] Harrison SA, Torgerson S, Hayashi P, Ward J, Schenker S. Vitamin E and vitamin C treatment improves fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2003;98:2485–90.
- [11] Riveron-Negrete I, Fernandez-Mejia C. Pharmacological effects of biotin in animals. *Mini Rev Med Chem* 2017;17:529–40.
- [12] Rodriguez-Melendez R, Zempleni J. Regulation of gene expression by biotin. *J Nutr Biochem* 2003;14:680–90.
- [13] Wiedmann S, Rodriguez-Melendez R, Ortega-Cuellar D, Zempleni J. Clusters of biotin-responsive genes in human peripheral blood mononuclear cells. *J Nutr Biochem* 2004;15:433–9.
- [14] Rodriguez-Melendez R, Camporeale G, Griffin J, Zempleni J. Interleukin-2 receptor-gamma -dependent endocytosis depends on biotin in Jurkat cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;284:C415–21.
- [15] Fernandez-Mejia C, Lazo de la Vega MM. Biological effects of pharmacological concentrations of biotin. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011;16:40–8.
- [16] Revilla-Monsalve C, Zendejas-Ruiz I, Islas-Andrade S, Baez-Saldaña A, Palomino-Garibay MA, Hernández-Quiróz PM, et al. Biotin supplementation reduces plasma triacylglycerol and VLDL in type 2 diabetic patients and in nondiabetic subjects with hypertriglyceridemia. *Biomed Pharmacother* 2006;60:182–5.
- [17] Hemmati M, Babaei H, Abdolsalehi M. Survey of the effect of biotin on glycemic control and plasma lipid concentrations in type 1 diabetic patients in Kermanshah in Iran (200–2009). *Oman Med J* 2013;28:195–8.
- [18] Albarracín C, Fuqua B, Geohas J, Juturu V, Finch MR, Komorowski JR. 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* 2007;2:91–7.
- [19] Albarracín CA, Fuqua BC, Evans JL, Goldfine ID. Chromium picolinate and biotin combination improves glucose metabolism in treated, uncontrolled overweight to obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2008;24:41–51.
- [20] Koutsikos D, Fourtounas C, Kapetanaki A, Agroyannis B, Tzanatos H, Rammos G, et al. Oral glucose tolerance test after high-dose i.v. Biotin administration in normoglycemic hemodialysis patients. *Ren Fail* 1996;18:131–7.
- [21] Sahin K, Tuzcu M, Orhan C, Kucuk O, Ozercan I, Juturu V, et al. Anti-diabetic activity of chromium picolinate and biotin in rats with type 2 diabetes induced by high-fat diet and streptozotocin. *Br J Nutr* 2013;110:197–205.
- [22] Aguilera-Méndez A, Fernandez-Mejia C. The hypotriglyceridemic effect of biotin supplementation involves increased levels of cGMP and AMPK activation. *Biofactors* 2012;38:387–94.
- [23] Larrieta E, Velasco F, Vital P, López-Aceves T, Lazo-De-La-Vega-Monroy M, Rojas A, et al. Pharmacological concentrations of biotin reduce serum triglycerides and the expression of lipogenic genes. *Eur J Pharmacol* 2010;644:263–8.
- [24] Suchy SF, Wolf B. Effect of biotin deficiency and supplementation on lipid metabolism in rats: cholesterol and lipoproteins. *Am J Clin Nutr* 1986;43:831–8.
- [25] Aldahmash BA, El-Nagar DM, Ibrahim KE. Attenuation of hepatotoxicity and oxidative stress in diabetes STZ-induced type 1 by biotin in Swiss albino mice. *Saudi J Biol Sci* 2016;23:311–7.
- [26] Watanabe KM, Kamiyama S, Horiuchi K, Ohinata K, Shirakawa H, Furukawa Y, et al. Antihypertensive effect of biotin in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Br J Nutr* 2008;99:756–63.
- [27] Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993;123:1939–51.
- [28] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351–8.
- [29] Ross M, Reith E, Romrell L. *Histology. A Text and atlas* (Kimberly Kist). 2th ed. Baltimore, MD: Williams and Wilkins; 1989.
- [30] Prabhakar P, Reeta KH, Maulik SK, Dinda AK, Gupta YK. Protective effect of thymoquinone against high-fructose diet-induced metabolic syndrome in rats. *Eur J Nutr* 2015;54:1117–27.
- [31] Sanchez LP, Bracho VI, Godínez HD, Bobadilla LR. Angiotensin-II-dependent changes in Alpha-1 Adrenoceptor vascular expression in pregnant rats. *Pharmacology* 2009;84:367–76.
- [32] Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G*power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods* 2007;39:175–91.

