

300627

29

203



UNIVERSIDAD LA SALLE

Escuela de Química
Incorporada a la U.N.A.M

**DISTRIBUCION REGIONAL DE BIOTINA Y ENZIMAS BIOTINILADAS
EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE LA RATA.**

Tesis profesional
que para obtener el título de

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

Presenta

Mónica Noel Sánchez González.

M. en C. José Domingo Méndez Francisco.
Director de Tesis

México, D.F.

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

Página

RESUMEN	
INTRODUCCION	
ANTECEDENTES	1
JUSTIFICACION	11
OBJETIVOS E HIPOTESIS	12
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	13
MATERIAL Y METODOS	14
RESULTADOS	28
DISCUSION DE RESULTADOS	47
CONCLUSIONES	50
BIBLIOGRAFIA	51

INDICE DE FIGURAS

FIG.1 ESTRUCTURA DE LA BIOTINA	2
FIG.2 BIOSINTESIS DE BIOTINA EN MICROORGANISMOS	3
FIG.3 FORMACION DE LA HOLOCARBOXILASA	5
FIG.4 REACCION DE LA BIOTINIDASA	7
FIG.5 INYECCION INTRAPERITONEAL	15
FIG.6 PERFUSION INTRACARDIACA	15

INDICE DE GRAFICAS

GRAFICA A. CURVA ESTANDAR DE BIOTINA	26
GRAFICA 1. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS EN LA VELOCIDAD ENZIMATICA DE LA PROPIONIL CoA CARBOXILASA	33
GRAFICA 2.EFECTO DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS EN LA VELOCIDAD ENZIMATICA DE LA 3 METILCROTONIL CoA CARBOXILASA	34
GRAFICA 3.EFECTO DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS EN LA VELOCIDAD ENZIMATICA DE LA PIRUVATO CARBOXILASA	35

	Página
GRAFICA 4. EFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA PROPIONIL CoA CARBOXILASA	36
GRAFICA 5. EFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA 3 METILCROTONIL CoA CARBOXILASA	37
GRAFICA 6. EFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA PIRUVATO CARBOXILASA	38
GRAFICA 7. ACTIVIDAD DE CARBOXILASAS	40
GRAFICA 8. CONCENTRACION DE BIOTINA LIBRE	46

RESUMEN

La biotina pertenece al grupo de vitaminas hidrosolubles del complejo B. En mamíferos y aves es cofactor de cuatro enzimas involucradas en la fijación de dióxido de carbono con requerimientos de adenosín trifosfato. Tres de dichas enzimas son mitocondriales: Propionil CoA carboxilasa (PCC), β -Metilcrotonil CoA carboxilasa (MCC) y Piruvato carboxilasa (PC). La cuarta enzima es citosólica: Acetil CoA carboxilasa (ACC).

Los desórdenes hereditarios en el metabolismo de la biotina producen el síndrome conocido como Deficiencia Múltiple de Carboxilasas (DMC), el que se caracteriza por presentar una baja actividad de las enzimas para las cuales la biotina es cofactor. La DMC incluye dos formas, una de ellas debida a la deficiencia de la holocarboxilasa sintetasa (HS) (enzima que une a la biotina a la apocarboxilasa) y la otra causada por la deficiencia de biotinidasa, enzima encargada del reciclaje de la biotina endógena (degradación de la holocarboxilasa), así como del aprovechamiento de la biotina proveniente de la dieta.

Muchos de los efectos de mayor importancia producidos por deficiencia de biotina o por alteraciones en su metabolismo se localizan en el sistema nervioso central (SNC). Esto ha sido reconocido desde hace varios años tanto en animales como en humanos. Los síntomas varían entre los pacientes, sin embargo, la hipotonía, irritabilidad y las convulsiones se presentan frecuentemente.

A pesar de conocer las severas consecuencias neurológicas de la DMC, se sabe muy poco sobre el metabolismo de la biotina en el SNC, por lo que consideramos importante estudiar integralmente el estado funcional de esta vitamina en dicho sistema. Se midieron las actividades de las carboxilasas mitocondriales así como la concentración de biotina libre en el encéfalo de ratas cepa Wistar y en nueve regiones del mismo (amígdalas, tálamo, corteza frontal, hipotálamo, hipocampo, corteza posterior, corteza occipital y temporal, cerebelo y tallo encefálico). Dichos animales se mantuvieron alimentados ad libitum y con periodos de luz-oscuridad 12x12hrs.

En el encéfalo se encontraron diferencias notables entre las actividades de las tres carboxilasas mitocondriales. Dichas actividades concuerdan con algunas reportadas en la literatura (46). La PC por ser la enzima anaplerótica predominante en el SNC (12) presentó las mayores actividades. La PCC presentó actividades menores y estadísticamente diferentes a las de la PC ($p < 0.001$), sin embargo más altas a las esperadas y a las reportadas en la literatura (46). Mientras que la MCC presentó actividades diez veces menores a las de la PCC.

Cada una de las tres enzimas presentó diferencias en algunas de las regiones encefálicas en donde fueron medidas. Se observó que tanto la PC como la PCC presentaron un patrón de comportamiento similar, en donde el cerebelo para las tres enzimas, fue la región de todo el encéfalo que tuvo las mayores actividades mientras que para la MCC no hubo diferencias.

La distribución de las concentraciones de biotina libre en el encéfalo no fueron uniformes variaron de una región a otra siendo las amígdalas y el cerebelo las regiones que presentaron las mayores concentraciones de esta vitamina mientras que el tallo encefálico, el tálamo y el hipocampo, fueron los órganos que tuvieron las menores concentraciones. No se estableció correlación entre las concentraciones de biotina libre y las actividades de las carboxilasas ya que las primeras pueden variar dependiendo de la actividad de la biotinidasa y de la cantidad de biotina intersticial.

El presente constituye el inicio de un trabajo, los resultados nos sugieren realizar estudios en donde se mida la concentración de biotina unida a proteínas y la actividad enzimática de la biotinidasa para poder profundizar en el significado fisiológico de las diferentes distribuciones de las enzimas biotiniladas y biotina en el SNC.

INTRODUCCION

Hace tiempo, el hombre pensaba que consumir una dieta rica en proteínas, carbohidratos y lípidos era suficiente para mantenerlo en buenas condiciones de salud; sin embargo, a principios de este siglo se encontraron algunos factores químicos que son indispensables para el buen funcionamiento del cuerpo humano y que hasta entonces se desconocían.

La importancia de las vitaminas se ha demostrado en muchas ocasiones a pesar de que no se conoce perfectamente su función biológica. La biotina o vitamina H pertenece al grupo de vitaminas hidrosolubles del complejo B. Es requerida como factor para el funcionamiento de cuatro enzimas llamadas carboxilasas. En los mamíferos existen cuatro carboxilasas, tres de las cuales se encuentran en la mitocondria: propionil CoA carboxilasa (PCC), 3-metilcrotonil CoA carboxilasa (MCC) y piruvato carboxilasa (PC). La cuarta enzima es citosólica: acetil CoA carboxilasa (ACC). Los desórdenes hereditarios en el metabolismo de la biotina producen el síndrome conocido como Deficiencia Múltiple de Carboxilasas (DMC), el cual se caracteriza por presentar una baja actividad de las enzimas para las cuales la biotina es cofactor. Muchos de los efectos producidos por la deficiencia de biotina o por alteraciones en su metabolismo son localizados en el sistema nervioso central (SNC), sin embargo, el conocimiento acerca del estado funcional de esta vitamina en el SNC es muy escaso. Esta situación nos motivó a estudiar algunos aspectos del metabolismo de la biotina en el SNC de la rata.

ANTECEDENTES.

En el cuerpo humano se efectúan más de 2000 reacciones químicas enzimáticas para el adecuado funcionamiento del organismo. La mayoría de las enzimas involucradas requieren de un cofactor no proteínico que puede ser una molécula orgánica o un componente inorgánico como lo son algunos metales. Dichos cofactores se encuentran en pequeñas cantidades en las células y pueden participar directamente en el proceso catalítico o bien funcionar como acarreadores de grupos funcionales.

Las vitaminas son nutrimentos orgánicos requeridos en la dieta de los mamíferos y son los precursores esenciales de varios cofactores.(1)

La biotina, perteneciente al grupo de vitaminas hidrosolubles del complejo B, fue considerada por primera vez como vitamina esencial en los sistemas vivos en 1936, cuando se aisló a partir de la yema del huevo por Kögl y Tönnes (2), quienes más tarde probaron su actividad como factor de crecimiento para levaduras.

La estructura de esta vitamina fue determinada por Du Vigneaud en 1942 (3), confirmada más tarde al llevar a cabo su síntesis total y al ser analizada por rayos X. La biotina (ácido cis-hexahidro-2-ceto-1H-tieno(3,4)imidazol-4-valérico) es un heterociclo formado por un anillo de imidazol fusionado a un anillo de tiofeno al que a su vez se le une una molécula de ácido valérico (figura 1). Sólo el estereoisómero (+) tiene actividad biológica. Su peso molecular es de 244.3g/mol, es soluble en H₂O (0.02%p/v), etanol (0.08%p/v), y en álcalis diluidos. (5).

Biosíntesis de Biotina en Microorganismos.

Los estudios acerca de la biosíntesis de la biotina empezaron en 1942, cuando Du Vigneaud mostró que utilizando a esta vitamina como factor de crecimiento en cultivos de *Corynebacterium diphtheriae*, se podía reemplazar por el ácido pimérico. Al mismo tiempo, se encontró que la síntesis de biotina en el *Aspergillus niger* era fuertemente estimulada por dicho ácido. Esto permitió que se postulara en forma correcta que el ácido pimérico estaba involucrado en su biosíntesis. Actualmente se conoce la secuencia biosintética de la biotina e incluye las reacciones presentadas en la figura 2. (6,7)

Carboxilasas: Función y Biosíntesis.

En mamíferos y aves la biotina es cofactor de cuatro enzimas involucradas en la fijación de dióxido de carbono con requerimientos de adenosín trifosfato (ATP). Tres de dichas enzimas son mitocondriales: Propionil CoA Carboxilasa (PCC), β-Metilcrotonil CoA Carboxilasa (MCC) y Piruvato Carboxilasa (PC); y la cuarta es citosólica: Acetil CoA Carboxilasa (ACC). El

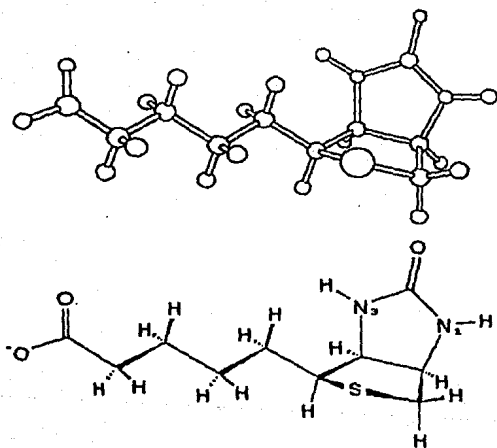


Figura 1. Estructura de la Biotina

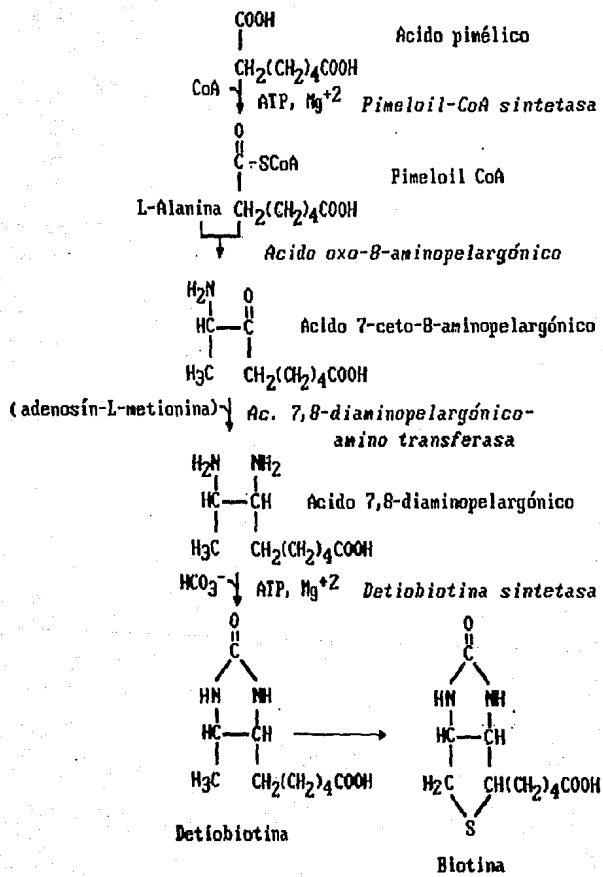
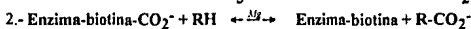
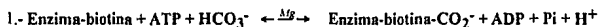


Figura 2. Biosíntesis de biotina en microorganismos

mecanismo de todas las carboxilasas involucra la formación de un complejo enzima-carboxibiotina y tiene lugar de acuerdo con las siguientes reacciones: (8,9)



La ACC (EC 6.4.1.2), es una enzima reguladora de la biosíntesis de ácidos grasos, cataliza la carboxilación de la acetil CoA para formar malonil CoA. Su estructura es compleja, está sujeta a regulación alostérica particularmente por citrato. La enzima de origen animal puede existir como protómero catalíticamente inactivo o en estado polimérico que es el estado activo. El citrato favorece la formación de polímeros. (10)

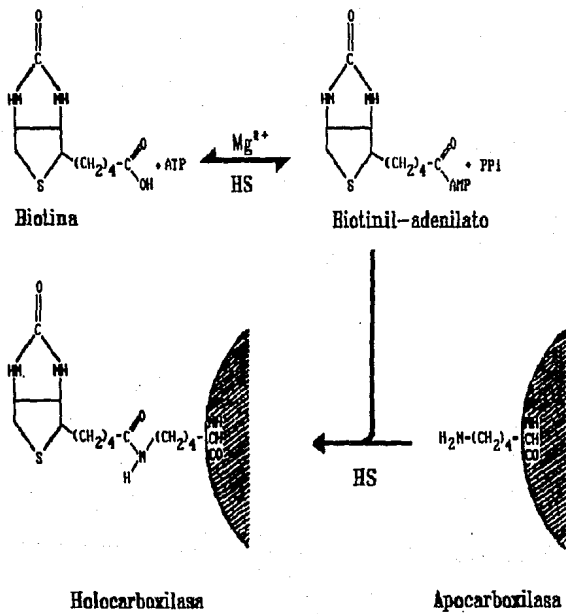
La PCC (E.C.6.4.1.3) está involucrada en el catabolismo de aminoácidos (isoleucina, valina, treonina y metionina), al igual que en el del colesterol y en el de los ácidos grasos de cadena impar. Cataliza la conversión de propionil CoA a metilmalonilCoA, la cual posteriormente es convertida a succinil CoA para que finalmente sea incorporada al ciclo de Krebs. (11)

La MCC (E.C.6.4.1.4) participa en la degradación de la leucina, formando 3-metilglutaconil CoA a partir de 3-metilcrotonil CoA; está compuesta de dos subunidades diferentes y la más grande es la que contiene la molécula de biotina. (9)

La PC (E.C.6.4.1.1) cataliza la síntesis de ácido oxaloacético a partir de piruvato. En tejidos glucogénicos como lo son el hígado y los riñones, funciona como una enzima reguladora de la gluconeogénesis. En otros tejidos animales participa en la anaplerosis del ciclo de Krebs proporcionando esqueletos carbonados para los aminoácidos aspartato, GABA y glutamato (12,13). En tejidos lipogénicos participa en la síntesis de ácidos grasos, en el transporte de grupos acetilo vía citrato y reduciendo grupos via malato de la mitocondria hacia el citosol. (14)

Las carboxilasas son sintetizadas en forma inactiva carentes de biotina como apocarboxilasas. La forma activa de holocarboxilasa se forma por la unión covalente de la biotina con la apocarboxilasa, reacción que es catalizada por la Holocarboxilasa Sintetasa (HS) (9). Esta enzima cataliza dos reacciones secuenciales (figura 3), la primera consiste en la activación de la biotina a través de su porción alifática, con un ATP para formar el biotinil adenilato que posteriormente reacciona con el grupo ε-amino de una lisina perteneciente al sitio activo de la apocarboxilasa formando un enlace covalente amido de d(+)biotinil-ε-N-L-lisina. Esta lisina biotinilada recibe el nombre de biocitina o biotinil-lisina.

La HS se encuentra tanto en el citosol como en la mitocondria pero no se sabe si las apocarboxilasas son activadas antes o después de su internalización a esta última. Parece existir sólo una HS para todas las carboxilasas. (15)



HS = Holocarboxilasa sintetasa

Figura 3. Formación de la Holocarboxilasa.

Biotinidasas

Las carboxilasas al igual que otras proteínas son degradadas por proteasas en el curso de la renovación celular. Sin embargo, a diferencia de las demás no llegan a producir aminoácidos libres, el proceso se detiene cuando se forman pequeños péptidos biotinilados, ya que la ruptura del enlace biotina-lisina requiere de una enzima especial, la biotinidasa (E.C.3.5.1.1.2). Se ha pensado que este proceso también es utilizado para la absorción intestinal de la biotina ya que normalmente se ingiere unida a proteínas. (16)

La biotinidasa fue inicialmente descrita por Thoma y Peterson (17), quienes observaron que en un extracto de hígado de cerdo la biotina era liberada por la biotinidasa sólo cuando había un previo tratamiento con tripsina. Esta observación indicaba que la biotinidasa no podía liberar a la biotina unida a largas cadenas de proteínas. En 1963 Koivusalo(18) apoya este postulado cuando encuentra que la biotinidasa del *Streptococcus faecalis* era incapaz de liberar la biotina de la PCC intacta.

El mecanismo de la biotinidasa fue estudiado por Knappe en 1963 (19) utilizando N-biotinil-p-amino-benzoato como sustrato. (figura 4)

Esta enzima se ha encontrado en suero sanguíneo y en muchos tejidos animales tales como el hígado, riñón y cerebro, sólo por mencionar algunos. (20,21)

Deficiencia Múltiple de Carboxilasas

Los desórdenes hereditarios en el metabolismo de la biotina producen el síndrome conocido como Deficiencia Múltiple de Carboxilasas (DMC), el que se caracteriza por presentar una baja actividad de las enzimas para las cuales la biotina es cofactor.(16)

Anteriormente, la DMC se clasificaba en 2 grupos en función de la edad en la que se inician los síntomas de la enfermedad: la forma neonatal o infantil y la forma juvenil o tardía. Actualmente es más conveniente usar nomenclatura bioquímica, que se basa en la deficiencia enzimática responsable del padecimiento.

La DMC debida a la deficiencia de la HS, que usualmente tiene una forma neonatal, se presenta en los primeros días de vida y se manifiesta con síntomas como cetosis, la consecuente acidosis metabólica, elevación de los diferentes metabolitos urinarios característicos de las deficiencias aisladas de las carboxilasas e hiperamonemia (16,22,25). En el suero se presenta una baja concentración de bicarbonato y un incremento en la brecha de aniones. Los pacientes que no mueren en los primeros días de vida desarrollan manifestaciones dermatológicas que al infectarse con *Monilia*, complican la apariencia clínica de las lesiones, esto es a consecuencia de las deficiencias inmunológicas (24-28). Adicionalmente, los síntomas neurológicos son predominantes: convulsiones(25), hipo e hipertonia, atetosis (17,24,26) e hipomielinización.

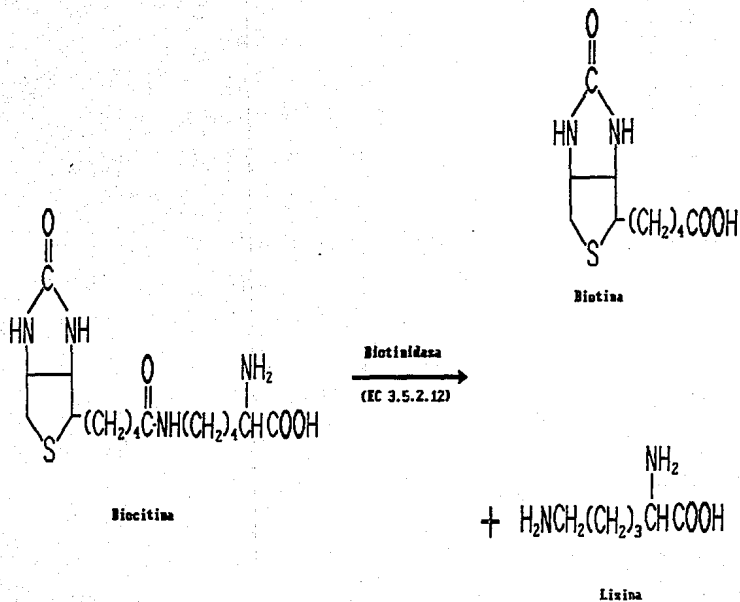


Figura 4. Reacción de la biotinidasa.

ACUSE DE RECIBIDO DE EJEMPLARES DE TESIS EN LA BIBLIOTECA CENTRAL

NOMBRE DEL ALUMNO:

Sánchez

González

Mónica Noel

NOMBRE DE LA TESIS O SEMINARIO: DISTRIBUCION REGIONAL DE BIOTINA
Y ENZIMAS BIOTINILADAS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL, DE LA
RATA.

ESCUELA O UNIVERSIDAD

Universidad La Salle

CARRERA

Químico Farmacéutico Biólogo

FECHA

DIA

MES

AÑO

30

03

1993

SELLO Y FIRMA

DE LA BIBLIOTECA
ENTREGO
DOS EJEMPLARES
DE TESIS EN
BIBLIOTECA
CENTRAL

- * FAVOR DE LLENAR POR TRIPLICADO A MAQUINA O CON LETRA DE MOLDE
- * ENTREGAR DOS EJEMPLARES DE LA TESIS EN LA BIBLIOTECA CENTRAL U.N.A.M.
- * EXIGIR QUE LE SELLEN Y LE FIRMEN LAS DOS COPIAS

La sintomatología de DMC debida a la deficiencia de biotinidasa, usualmente se presenta después de los tres meses de vida. Las manifestaciones dermatológicas pueden empezar a los tres meses o después de los 4 años, sin embargo, éstas son menos generalizadas que en la deficiencia de HS y se caracterizan por la presencia de dermatitis periorificial, cabello escaso en cabeza y cejas y se puede presentar alopecia.(29-34). Se han encontrado episodios de cetosis y acidosis parecidos a los de la deficiencia de HS, además de altas concentraciones de lactato y piruvato en fluido cerebrospinal. (39)

Las manifestaciones neurológicas predominantes en estos casos son: convulsiones que indican el inicio de la enfermedad; ataxia; retraso mental; hipotonía; falta de control sobre la cabeza y anomalías neurosensoriales como son atrofia óptica y pérdida de la audición. Algunos estos síntomas desaparecen con la administración de biotina.(35-39)

En este tipo de DMC, también hay deficiencias inmunológicas debidas a una mala función de las células B y T.(16)

Biotina y Sistema Nervioso

Los efectos de mayor importancia producidos por deficiencias de biotina o por alteraciones en su metabolismo son localizados en el sistema nervioso. Esto ha sido reconocido desde hace varios años tanto en animales como en el humano. Los síntomas varían entre los pacientes, sin embargo la hipotonía, irritabilidad y las convulsiones se encuentran frecuentemente.(40)

Zak y D'Ambrosio en 1985 describieron a un paciente de 12 meses de edad mantenido por 6 meses con nutrición parenteral total, al final de este tiempo presentó convulsiones severas, retraso en el desarrollo y problemas oftalmológicos; su estado mejoró notablemente al recibir una suplementación con biotina (41).

Suchy en 1985(42) y Di Rocco en 1984(43) describieron síntomas neurológicos en la deficiencia de biotinidasa y sugirieron que éstos eran debidos a la acumulación de metabolitos tóxicos en el cerebro.

Se han realizado exámenes neurológicos en encéfalos de niños que murieron con un diagnóstico de DMC y las observaciones al microscopio revelan una degeneración crónica del cerebelo.(26)

Suchy y Wolf en 1986(44) sugirieron que como los lípidos son componentes estructurales importantes tanto en el cerebro como en la piel, los defectos neurológicos y cutáneos presentados en la DMC o en la deficiencia de biotina podrían ser ocasionados por un problema en el metabolismo de estos. De este modo, realizaron un estudio en donde midieron las cantidades de colesterol total, libre y esterificado, tanto en hígado como en el encéfalo de ratas deficientes en

biotina no encontrando cambios al comparar los casos con los controles. Posteriormente Suchy y Wolf en ese mismo año(45), realizaron otro estudio en donde cuantificaron los ácidos grasos saturados en suero, hígado, cerebro y cerebelo, encontrando un contenido anormal de ácidos grasos saturados tanto en el suero como en el hígado pero no para el cerebro y el cerebelo. Los estudios realizados por este grupo indican que las alteraciones en el metabolismo de los lípidos no son causa de las anomalías neurológicas presentadas en la DMC.

Si bien los lípidos son esenciales en el sistema nervioso central, el papel del piruvato en el metabolismo oxidativo del cerebro también es de gran importancia. Tanto la piruvato deshidrogenasa, que forma acetil CoA a partir de piruvato, como la PC que forma oxaloacetato a partir del mismo, son enzimas cruciales para el buen funcionamiento del ciclo de Krebs. Una reducción en la actividad de la PC causa un decremento de oxaloacetato, lo que a su vez ocasiona una disminución en el metabolismo oxidativo y que el piruvato sea reducido a lactato.(46)

Hay otros errores innatos del metabolismo asociados con problemas neurológicos parecidos a los encontrados en la DMC, en particular la ataxia. Enfermedades como la de Hartnup están asociadas con el metabolismo de aminoácidos ramificados y con el metabolismo del piruvato.(47)

Los desórdenes en el metabolismo del piruvato, la acidosis láctica consecuyente y su asociación con problemas neurológicos llevaron a proponer una hipótesis en donde se postuló una distribución diferente de la PC en ciertas áreas del encéfalo (tallo encefálico, cerebelo, cerebro), algunas de las cuales serían más susceptibles a la deficiencia de PC que otras. Respecto a esto, Schrijver(48) y Sander (49) para comprobar dicha hipótesis realizaron trabajos en donde midieron la actividad de la PC en diferentes regiones del encéfalo de ratas sanas y maduras. El primero encontró que el tallo encefálico presentaba las mayores actividades, mientras que el segundo encuentra que es el cerebelo la región con las actividades más altas. Ambos grupos observaron el efecto de la deficiencia de biotina en la actividad de la PC en diferentes regiones del encéfalo encontrando resultados concordantes. Por otra parte, al seguir trabajando con ratas deficientes, Schrijver encuentra que en los encéfalos de estas ratas la actividad de la PC era 70% menor a la de los controles, mientras que Sander encuentra que es 65% menor; por lo que respecta al hígado, el primero reporta que en ratas deficientes la actividad de la PC es 85% menor a la de los controles, y el segundo que es 97% menor; es notable que la actividad de la PC en la deficiencia de biotina se preserva más en el encéfalo que en el hígado. Schrijver realiza además un estudio en donde analiza encéfalos de ratas en desarrollo que son deficientes en biotina y observa un retraso en el mismo.

En 1969, Berl et al.(50) propusieron que la actividad anaplerótica en el SNC debía estar compartimentalizada. Siendo la PC la enzima anaplerótica predominante en el SNC, ésta se iba a encontrar en compartimentos sintéticos localizados en los astrocitos. Shank et al. en 1989(51), realizaron estudios bioquímicos e inmunocitoquímicos con los que trataron de localizar a la PC en diferentes tipos celulares y concluyeron que esta enzima es un marcador de astrocitos. En estas

células hay una gran actividad de PC y de ellos salen hacia la neurona las cantidades de α -cetoglutarato y malato que se requieran en un momento determinado. Se comprobó la existencia de un sistema de transporte para estas moléculas que preceden la formación de aminoácidos neurotransmisores.(52)

Los trabajos antes mencionados son, hasta donde sabemos, todos los estudios en los que se midió la actividad de carboxilasas y como se puede observar además de presentar algunas contradicciones, en ninguno de ellos se incluyó a la PCC y a la MCC.

Por lo que respecta a la concentración de biotina, tenemos conocimiento de tan sólo tres trabajos en los que se ha medido esta vitamina en encéfalos humanos y en diferentes regiones del mismo(53-55). Sin embargo, no se puede llegar a una conclusión con estos datos ya que solamente se ha medido la concentración de biotina total y dado a que esta vitamina puede encontrarse libre o unida a proteínas, por lo que estos resultados indican muy poco acerca de su metabolismo.

JUSTIFICACION

La importancia de las alteraciones neurológicas presentadas en la DMC, nos indujo a estudiar integralmente el metabolismo de la biotina en el sistema nervioso central de animales de experimentación.

OBJETIVOS

- 1.- Medir las actividades de la PCC, MCC y PC en el encéfalo de la rata y en diferentes regiones del mismo.
- 2.- Medir la concentración de biotina libre en el encéfalo de la rata y en diferentes regiones del mismo

HIPOTESIS

- 1.- Existen diferencias entre las actividades enzimáticas de la PCC, MCC y PC en el encéfalo.
- 2.- Las actividades enzimáticas de la PCC, MCC y PC no se distribuyen de manera uniforme en el encéfalo.
- 3.- La concentración biotina no se distribuye de manera uniforme en el encéfalo.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

Los animales de estudio, ratas macho, cepa Wistar 200±20g., alimentados ad libitum, fueron perfundidos con solución salina 0.9% y decapitados para extraer el encéfalo libre de sangre. A continuación se realizó una disección sobre este último que consistió en separarlo en nueve regiones que lo conforman.

Tanto en el encéfalo entero como en sus regiones, se midieron las actividades enzimáticas de la PCC, MCC y PC por un método radioenzimático que mide la incorporación de $^{14}\text{CO}_2$ a los sustratos. Para medir la concentración de biotina libre, se utilizó un método de competencia entre la ^1H -biotina y la ^3H -biotina por su unión a la avidina para lo cual fue necesario extraerla primero del tejido en cuestión con alcohol etílico.

MATERIAL Y METODOS.

Modelo experimental.

Los animales de estudio fueron ratas macho cepa Wistar de 200 ± 20 g., alimentados "ad libitum" y mantenidos en periodos de luz-oscuridad 12X12hrs.

1. Perfusión.

Se requirió eliminar la sangre del tejido nervioso, para evitar efectos aditivos de los elementos sanguíneos a las concentraciones de biotina libre y a las actividades específicas de las carboxilasas. Para lo cual los animales fueron perfundidos intracardiácamamente con una solución de lavado.

1.1 Reactivos.

1.1.1 Solución salina 0.9% (p/v) a 7°C.

1.1.2 Pentobarbital sódico 0.0315 g/ml, 78µg/g.de peso.

1.2 Técnica

Los animales se anestesiaron con una inyección intraperitoneal (figura 5) de 500µl. de pentobarbital sódico. La dosis aseguró mantener vivo al animal por un periodo de 10 minutos.

Posteriormente se abrieron las cavidades intestinal y torácica teniendo cuidado de no maltratar los órganos, evitando así la muerte prematura del animal. Fue importante mantenerlo vivo pues el corazón ayudó a bombear la solución salina a todo el cuerpo.

Inmediatamente después se realizaron pequeños cortes en la aurícula derecha y en el ventrículo izquierdo del corazón, ya que a este último se conectó una cánula que inyectó la solución salina fría y por la aurícula salió la sangre con el líquido del lavado. (figura 6)

La cavidad abdominal se abrió pues hubo expansión de órganos, además de que el color de estos fue indicativo de un buen lavado.

2. Diseción del encéfalo.

2.1 Reactivos

2.1.1 Sacarosa (J.T. Baker) 30%

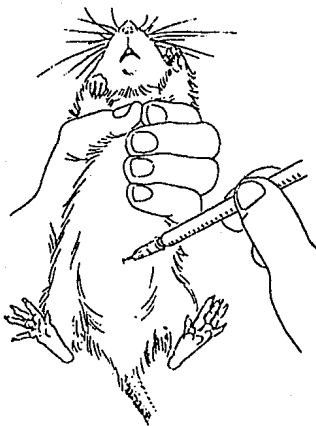


Figura 5. Inyección intraperitoneal.

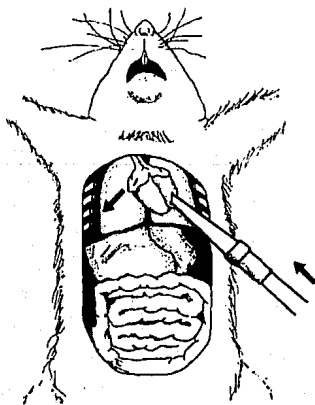


Figura 6. Perfusión intracardiaca

2.2 Técnica

Terminada la perfusión los animales fueron decapitados. Se expuso posteriormente el cráneo y se rompió con cuidado para poder extraer el encéfalo intacto. (figura 7)

El trabajo se dividió en dos partes, en la primera se trabajó con el encéfalo completo (sin tallo encefálico). En este caso una vez extraído, se lavó con solución salina fría, se secó con papel absorbente, se pesó, se deshidrató en sacarosa 30% por 4 hrs a 7°C., y posteriormente se homogenizó.

En la segunda parte, se procedió a deshidratar el encéfalo y posteriormente a disecarlo. La disección consistió en el aislamiento macroscópico de las siguientes regiones: a) amígdalas; b) hipotálamo; c) corteza frontal (C.F); d) tálamo; e) hipocampo; f) corteza parietal (C.P); g) corteza occipital y temporal (C.O.T); h) cerebelo e i) tallo encefálico.

El procedimiento se realizó sobre hielo y no tardó más de 10 minutos. Por último las regiones fueron almacenadas a -70°C.

3. Homogenización.

3.1 Reactivos

3.1.1 Amortiguador de fosfatos de potasio 50mM pH=7.4

Fosfato de potasio dibásico (J.T. Baker) 50mM

Fosfato de potasio monobásico (J.T. Baker) 50mM

3.2 Técnica

3.2.1 Encéfalo

Trascurrido el tiempo de deshidratación en sacarosa, los encéfalos se colocaron en un volumen de amortiguador de fosfatos de potasio 50 mM pH=7.4, para obtener una concentración de 0.045 g de tejido húmedo/ml de amortiguador.

Posteriormente se procesaron en frío en un homogenizador Brinkmann modelo PT 10/35, intensidad 4 por 15 segundos.

Los homogenados resultantes se guardaron a -70°C.

3.2.2 Regiones

El procesamiento de las regiones consistió en descongelarlas (-70 a -20°C, de -20 a 0°C, de 0 a 7°C y de 7 a temperatura ambiente), pesarlas y posteriormente agregarles un volumen de amortiguador de fosfatos de potasio 50 mM pH=7.4 con el que se ajustó la concentración a 0.045g de tejido húmedo/ml de amortiguador.

En seguida se homogenizaron en frío en un sonicador Branson modelo 200 con pulsos continuos, intensidad 3 equivalente a 20 watts y por un tiempo característico para cada región: (cuadro 1)

Cuadro 1

REGION	TIEMPO (seg)
Amígdala	15
Hipotálamo	5
C.F.	15
Tálamo	10
Hipocampo	20
C.P.	20
C.O.T.	20
Cerebelo	25
Tallo encefálico	40

C.F.=corteza frontal C.P.=corteza parietal C.O.T.=corteza occipital y temporal

Lo anterior se realizó momentos antes del ensayo.

4. Determinación de la actividad de PCC, MCC y PC.

Para la determinar las actividades enzimáticas de las carboxilasas, se empleó el método de Sweetman (56), el cual se basa en la incorporación de $^{14}\text{CO}_2$ procedente de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$, en el sustrato apropiado. De este modo al actuar la PCC sobre la propionil CoA el producto será ^{14}C -metilmalonil-CoA. El producto de la MCC al actuar sobre β -metilcrotonil CoA será β - ^{14}C -metilglutaconil CoA, parte de la cual es posteriormente hidratada a ^{14}C - β -hidroxi- β -metilglutaril CoA. El producto de la PC al actuar sobre piruvato es el ácido ^{14}C -oxaloacético el cual es inestable y es transformado al ácido ^{14}C -cítrico por la intervención de la citrato sintetasa añadida a la mezcla de reacción. La acetil CoA es el modulador alostérico de la PC, también sirve como sustrato ya que con el ácido oxaloacético forma el ácido ^{14}C -cítrico.

4.1 Reactivos

4.1.1 Amortiguador Tris 10x, pH=8

- Tris (Merck) 1 M
- MgCl_2 (J.T. Baker) 8mM
- KCl (J.T. Baker) 600mM
- EDTA (Merck) 6mM

4.1.2 Amortiguador de lisis, pH=8

- Tris (Merck) 50mM
- EDTA (Merck) 0.125mM

4.1.3 Propionil CoA (Sigma) 40mM

4.1.4 3-Metilcrotonil CoA (Sigma) 40mM

4.1.5 Acetil CoA (Sigma) 35mM

4.1.6 Solución stock: Tris 10x + ATP + Glutatión reducido (GSH)

- ATP (Sigma) 28.5 mM
- GSH (Merck) 20.0 mM
- Amortiguador Tris 10x pH=8

4.1.7 Piruvato de sodio (Sigma) 40mM

4.1.8 Citrato sintetasa (CS) (Sigma) 18.6 unidades/ml de piruvato de sodio 40 mM

4.1.9 Acido fórmico (Merck) 15% (v/v)

4.1.10 Bicarbonado de sodio radiactivo ($\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$) (Amersham)

Actividad específica: 3.81 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$.

Concentración: 0.12 M

4.1.11 Solución de centelleo (Bray)

- Naftaleno (J.T. Baker) 180g.
- PPO (difeniloxazol) (New England) 12g.
- Etilenglicol (Sigma) 60ml.
- Metanol (J.T. Baker) 300ml.
- Dioxano (J.T. Baker) c. b. p 3000ml.

4.1.12 Metanol (J.T. Baker) 50% (v/v).

4.2 Técnica

En tubos Eppendorf de 500 μl fueron preparadas las mezclas de reacción (MR) correspondientes a cada enzima con las siguientes proporciones de reactivos. (cuadro 2)

Cuadro 2

Reactivos	Blanco PCC- MCC	PCC	MCC	Blanco PC	PC
	I	II	III	IV	V
H ₂ O	25	25	25	-	-
ATP-GSH	25	25	25	25	25
CoA o H ₂ O	25(H ₂ O)	25(PCoA)	25(MCoA)	25(H ₂ O)	25(AcCoA)
NaH ¹⁴ CO ₃	25	25	25	25	25
CS/Piruvato	-	-	-	25	25
	100%	100%	100%	100%	100%

Una vez preparadas, se adicionaron 10µl de la mezcla de reacción correspondiente a cada tubo del ensayo.

Ya preparados los tubos con las mezclas de reacción, se realizó una dilución 1:10 del homogenado en amortiguador de lisis, de este modo se acondicionaron las muestras para el rompimiento de las mitocondrias y la subsecuente liberación de las enzimas contenidas en éstas. Este proceso se realizó por sonicación (sonicador Branson modelo 200), en frío, descargando 30 pulsos de 0.5seg cada uno, con un descanso intermedio de 40 seg. y una intensidad de 22 watts. Las condiciones de sonicación se establecieron en el laboratorio al montar la técnica de Sweetman para tejido nervioso. (ver resultados).

Inmediatamente después, se agregaron 10µl del sonificado a cada tubo del ensayo y se incubaron 1 hora a 32°C en baño maría con agitación.

La reacción se detuvo al meter los tubos en agua fría. Posteriormente se agregaron 10µl de ácido fórmico 15%, se mezclaron bien y se dejaron destapados 15 minutos para permitir el escape del NaH¹⁴CO₃ no reaccionado que se desprendió en forma de ¹⁴CO₂↑.

En tiras de papel Whatman 3MM se marcaron líneas divisorias cada 2.5cm y cada cuadro formado se marcó con el número del tubo correspondiente.

Pasado el tiempo de desprendimiento de ¹⁴CO₂, se colocaron 30µl de la mezcla reaccionada en su correspondiente cuadro de papel filtro y se secaron con pistola de aire (frío) por espacio de 15 min. Una vez seco el papel se procedió a agregar 30µl de ácido fórmico 15% y se dejó secando nuevamente por espacio de 30 minutos con pistola de aire, de este modo se aseguró la ausencia de NaH¹⁴CO₃ no reaccionado.

Las tiras ya secas fueron recortadas en pequeños fragmentos y colocadas en viales que contenían 7ml. de solución de Bray, 1 ml. de metanol al 50% y en los cuales se había medido el ruido de fondo.

Los viales se agitaron con vórtex para extraer la muestra y se contaron 10 minutos en un contador de centelleo líquido (Packard Tri-Carb 4000 Series) con estándar externo.

5. Determinación de proteínas (Lowry)(57)

5.1 Reactivos

5.1.1 Hidróxido de sodio (NaOH)(J.T. Baker)	0.1N
5.1.2 Carbonato de sodio (Na_2CO_3)(J.T.Baker)	2.0% en NaOH 0.1N
5.1.3 Sulfato cúprico (CuSO_4) (J.T.Baker)	1.0%
5.1.4 Tartrato doble de sodio-potasio	2.0%
5.1.5 Albúmina sérica bovina	0.1% (se guarda en alícuotas a -70°C)

5.2 Técnica

Solución A

-Carbonato de sodio	2% en hidróxido de sodio 0.1N	100 partes
-Sulfato cúprico	1%	1 parte
-Tartrato doble de sodio potasio	2%	1 parte

5.2.2 Solución B

-Reactivo de fenol (Folin-Ciocalteu)(Sigma) 50%

Tanto la solución A como la B se prepararon inmediatamente antes de usarse.

5.2.2 Curva estándar

Para realizar la curva estándar se tomaron volúmenes de albúmina equivalentes a 10, 20, 25, 30, 40 y 45 μg de albúmina (ver cuadro 3), se les agregó un volumen de amortiguador de lisis equivalente al volumen de muestra utilizada, en este caso serán 80 μl y por último se agregó agua cuanto bastó para completar 500 μl . Se adicionó el amortiguador de lisis porque se observó que el tris (hidroximetilaminometano) desarrollaba color.

Para las muestras se trabajó con un volumen de 80 μl del homogenado previamente sonicado y centrifugado 6470g x 3 min. Posteriormente se agregaron 2.5ml. de la solución A se mezcló y se

dejó incubando a temperatura ambiente 10min.

Para el desarrollo del color, proporcional al contenido de proteínas, se adicionó a todos los tubos 250µl de la solución B, se mezcló perfectamente y se dejó incubando 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se midieron las densidades ópticas con una longitud de onda de 700nm en un espectrofotómetro. El color fue estable por 2 horas.

Se graficó colocando en las abscisas los µg de albúmina (proteínas) y en las ordenadas las densidades ópticas obtenidas a 700nm. Se trazó la mejor recta respecto a los puntos obtenidos y se interpolaron las lecturas de las muestras.

Cuadro 3

Tubos	albúmina (µl)	muestra (µl)	Amortiguador lisis (µl)	H ₂ O (µl)	Soln. A (ml)	Soln. B (µl)
1,2 bco.	0	0	0	500	2.5	250
3,4 bco.	0	0	80	420	2.5	250
5,6	10	0	80	410	2.5	250
7,8	20	0	80	400	2.5	250
9,10	25	0	80	395	2.5	250
11,12	30	0	80	390	2.5	250
13,14	40	0	80	380	2.5	250
15,16	45	0	80	375	2.5	250
17....	0	80	0	420	2.5	250

6. Cálculo de las actividades específicas de las carboxilasas.

Con las concentraciones de proteínas las actividades específicas de las enzimas, se calcularon de la siguiente manera:

$$\frac{dpm - dpm \text{ blanco}}{60 \text{ min} \times \text{mg. prot.}} \times \frac{1 \mu Ci}{2.22 E6 dpm} \times \frac{1 \mu mol}{3.81 \mu Ci} \times \frac{1 pmol}{1 E -6 \mu mol} = \frac{pmol \text{ } ^{14}CO_2 \text{ fijadas}}{\text{min.} \times \text{mg. proteina}}$$

7. Determinación de biotina libre

Para determinar la concentración de biotina libre en los tejidos estudiados, se utilizó una técnica que se fundamenta en la competencia entre la biotina fría (¹HB) y biotina tritiada (³HB) por su unión a la avidina.(58) Dado que el complejo avidina-biotina no tiene un peso molecular muy grande no precipita por lo que es necesario unirlo a un anticuerpo antiavidina acoplado a sepharosa, de este modo se facilita la separación de la biotina libre y la unida por medio de centrifugación.

7.1 Preparación de muestras

7.1.1 Reactivos

7.1.1.1 Alcohol etílico absoluto (J.T. Baker)

7.1.1.2 Eter etílico (saturado con agua) (J.T. Baker)

7.1.1.3 Amortiguador Tris-ácido bórico-EDTA-manitol pH=8 0.09M (TBEM)

-Tris (Merck) 44.5mM

-Acido Bórico 44.5mM

-EDTA 1.0mM

-Manitol 100.0mM

-Azida de sodio 0.02%

7.1.2 Técnica

Los homogenados obtenidos en la sección 3 fueron utilizados para cuantificar biotina libre. Para lo cual se realizó inicialmente una extracción de lípidos con éter etílico (saturado con agua para evitar la incorporación de alguna porción de la fase acuosa), por una hora, ya que estos dificultaban la resuspensión de las muestras e interferían en el ensayo.

Con respecto al hipocampo y al tálamo para la muestra de cada una de estas regiones se combinaron los homogenados provenientes de dos animales diferentes.(cuadro 4)

Transcurrido el tiempo se realizó la extracción de biotina con 4 volúmenes de etanol absoluto por 18hrs. a -15°C. Una vez terminadas las 2 extracciones, se procedió a secar los extractos etanólicos en un evaporador al vacío (Savant).

Antes del ensayo estos extractos se resuspendieron en un volumen de TBEM correspondiente a una fracción del volumen original de la muestra.(cuadro 4)

Cuadro 4

Región	Fracción del volumen original en la que se resuspendió el extracto.	Número de animales que contribuyeron a la muestra.
Amígdala	0.35	1
Tálamo	0.25	2
C.F.	0.35	1
Hipotálamo	0.35	1
Hipocampo	0.25	2
C.P.	0.35	1
C.O.T.	0.35	1
Cerebelo	0.35	1
Tallo encefálico	0.35	1

C.F=corteza frontal C.P=corteza parietal C.O.T=corteza occipital y temporal

7.2 Reactivos

7.2.1 Biotina tritiada (^3HB) 45Ci/mmol, 1.0mCi/ml. (New England Nuclear Co.).

Con el propósito de trabajar con material de pureza radioquímica elevada, cada vez que fue necesario se purificaron alcuotas de 70 μCi de reactivo por cromatografía en placa fina de alta eficiencia (Whatman LHP-KF cat. 4806-410), con el sistema benceno-metanol-acetona-ácido acético (70:20:5:5). Los eluidos obtenidos se evaporaron a sequedad bajo corriente de nitrógeno. Estos extractos secos de ^3HB se almacenaron a -10°C ., y para el ensayo se resuspenden en 10ml. de TBEM para obtener 13,000 dpm/10 μl (36pg. de biotina).

7.2.2 Anticuerpo antiavidina acoplado a sepharosa.(Ab-Av-Sp)

La sepharosa 6B sin uniones cruzadas (Pharmacia Fine Chemicals) se activó con bromuro de cianógeno y se le acopló el anticuerpo antiavidina según el método descrito por March et al. en 1974 (59). La proteína acoplada a la sepharosa se almacenó en suspensión 1:1 (v/v) con NaCl 0.15M y azida de sodio al 0.02%.

7.2.3 Amortiguador Tris-ácido bórico-EDTA-manitol pH=8 0.09M (TBEM) (sección 7.1.1.3)

7.2.4 Avidina 40 μM (2.68mg/ml) en TBEM, solución A concentrada se almacenó en alcuotas de 10 μl a -15°C . En el momento del ensayo se hizo una dilución 1:100 de la solución A en TBEM para obtener una concentración 400nM (solución B), y por último se hizo una dilución 1:30 para obtener una concentración 13nM (Soln. C).

7.2.5 Solución concentrada de biotina (^1HB) en TBEM 5mg/dl (Soln. A). De esta solución se partió para preparar la solución B, por una dilución 1:100 en TBEM, que dió una concentración final de 500ng/ml, la cual a su vez se diluyó 1:10 en TBEM para obtener una concentración 5ng/ml (Soln. C), por último se partió de la solución C para que por una dilución 1:5 en TBEM, se obtuviera la solución D, que contiene 1pg de $^1\text{HB}/\mu\text{l}$.

La solución A se almacenó a -10°C , mientras que las B, C y D se almacenaron a 6°C .

7.2.7 Solución de Bray para centelleo líquido (ver sección 4)

7.3 Técnica

En el cuadro 4 se presenta el protocolo. Para la curva estándar, se agregaron diferentes volúmenes de las soluciones de trabajo de biotina fría, equivalentes a 10, 20, 40, 80, 160 y 320 pg. (10, 20, 40, 80, 160 μl de la soln. D y 64 μl de la soln. C respectivamente), los que se ajustaron a 210 μl con TBEM. En el caso de las muestras, se agregó un volumen previamente comprobado en el que la cantidad de biotina contenida se encontraba dentro de los límites de confianza del ensayo (ver montaje de la técnica). A este volumen se le agregó también un volumen de TBEM para alcanzar los 210 μl . Posteriormente a todos los tubos del ensayo se les adicionaron 10 μl de ^3HB y se agitaron perfectamente. De este modo se obtuvo una mezcla homogénea de las dos biotinas (^1HB y ^3HB) y cuando se inició la competencia, al agregar la avidina (soln. C), no hubo gradientes de concentración que interfirieran con los resultados. (cuadro 5)

El ensayo requirió que se midiera la unión inespecífica por lo que se prepararon tubos con muestra a los que no se les adicionó avidina; de tal modo que se permitiera determinar la cantidad de Ab-Av-Sp que se pegaba a moléculas diferentes a la avidina. Por otra parte también se midió la unión máxima que corresponde a los tubos a los que no se les agregó biotina fría pues se observó la cantidad máxima de ^3HB que se pega a la avidina. (cuadro 5)

Una vez terminado este proceso, los tubos del ensayo se taparon e incubaron a 4°C (cuarto frío) con agitación por 24 hrs.

Transcurrida la primera incubación, se sacaron los tubos del cuarto frío, se destaparon y se les agregaron 60 μl del anticuerpo antiavidina acoplado a sepharosa (Ab-Av-Sp). Este procedimiento se realizó con precaución, no se escurrió el Ab-Av-Sp por las paredes ya que se quedaban adheridas a éstas las esferas de sepharosa. No se mezcló fuertemente ni se centrifugó a más de 150g pues la sepharosa se fracturaba. Una vez agregado el Ab-Av-Sp se incubó de nuevo a 4°C por 24hrs. con agitación.

Terminado el tiempo de la segunda incubación los tubos se centrifugaron $150g \times 5min$. Se tomó una alícuota de $150\mu l$ del sobrenadante y se colocó en $2.5ml$ de solución de Bray contenida en un vial. Posteriormente se pusieron a contar las muestras en un contador de centelleo líquido por $5min$.

7.4 Cálculos

Las desintegraciones por minuto (dpm) obtenidas correspondieron a la cantidad de 3HB que no se unió a la avidina (biotina libre).

Se graficó en papel "logit-log" colocando en el eje de las abscisas los μg de biotina fría y en el de las ordenadas el porcentaje de unión al que corresponden (gráfica A). La cantidad de 3HB unida fue inversamente proporcional a la cantidad de biotina fría existente en la muestra.

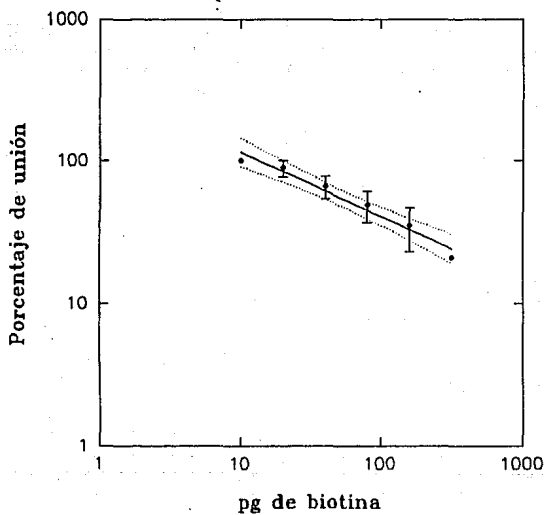
Los resultados obtenidos fueron corregidos por los valores de unión inespecífica y de unión máxima.

Cuadro 5

Tubos		B (μl)	muestra (μl)	TBEM (μl)	3HB (μl)	Avidina (μl)
1,2	unión inespecífica	0 (D)	0	220	10	0
3,4	unión máxima	0 (D)	0	210	10	10
5,6	10 μg 1HB	10 (D)	0	200	10	10
7,8	20 μg 1HB	20 (D)	0	190	10	10
9,10	40 μg 1HB	40 (D)	0	170	10	10
11,12	80 μg 1HB	80 (D)	0	150	10	10
13,14	160 μg 1HB	160 (D)	0	130	10	10
15,16	320 μg 1HB	64 (C)	0	146	10	10
17,....	-	0	variable	variable	10	10
....	unión inespecífica muestras	0	variable	variable	10	0

(D) solución D de biotina fría

(C) solución C de biotina fría



Gráfica A. Curva estándar de biotina

Procedimiento:

Tubos 1,2

$$dpm_{1,2} \times \frac{\text{volumen total}}{\text{allicuota contada}} = \frac{dpm}{13,000} \times 100 = \% \text{ de unión inespecifica}$$

Tubos 3,4

$$\frac{dpm_{3,4}}{dpm_{1,2}} \times 100 = \% \text{ de biotina libre}$$

$\% \text{ de biotina libre} - 100 = \% \text{ máximo de } ^3\text{HB unida}$

$$\frac{dpm_{C \text{ ó } M}}{dpm_{1,2}} \times 100 = \% \text{ } ^3\text{HB unida procedente de la muestra}$$

Curva estándar (C) y muestras (M)

$$\begin{array}{rcl} \text{cantidad máxima de } ^3\text{HB unida} & - & 100\% \\ \text{cantidad de } ^3\text{HB de la muestra} & - & X \end{array}$$

$X = \% \text{ corregido de } ^3\text{HB unida (cantidad a interpolar en la gráfica)}$

ANALISIS ESTADISTICO

El análisis de los datos, así como los métodos estadísticos aplicados se describen en la sección de resultados.

RESULTADOS.

1. Pesos de encéfalos enteros (sin tallo encefálico) y regiones.

En el cuadro 6 se presentan los pesos de los encéfalos y de las regiones que fueron analizadas. Como se puede apreciar, existen diferencias notables entre cada una de las regiones.

Cuadro 6

Región	n	peso en gramos
Amígdala	8	0.096±0.02
Tálamo	8	0.072±0.012
C.F	8	0.084±0.023
Hipotálamo	8	0.038±0.010
Hipocampo	8	0.102±0.015
C.P.	8	0.2193±0.045
C.O.T	8	0.192±0.046
Cerebelo	8	0.247±0.03
Tallo encefálico	8	0.461±0.05
Encéfalo entero s/T	8	1.617±0.049

C.F.=corteza frontal; C.P.=corteza parietal C.O.T=corteza occipital y temporal.

2. Estandarización de las condiciones de homogenización.

Para establecer las condiciones de homogenización, se probaron los siguientes medios:

- Amortiguador fosfatos de potasio 50mM pH=7.4
- Sacarosa 0.25M

Los homogenados se realizaron bajo las mismas intensidades, tiempos y temperaturas. Además de que las condiciones de almacenamiento fueron las mismas.

El cuadro 7 muestra los datos obtenidos con los diferentes medios de homogenización.

Cuadro 7

enzimas	sacarosa inicial *	sacarosa 1 semana *	A. fosfatos inicial *	A. fosfatos 1 semana *
PCC	671	598	687	682
MCC	179	-	190	-
PC	552	-	1016	-

* $\text{pmol}^{14}\text{CO}_2$ fijado min^{-1} mg proteína $^{-1}$

Sólo se hizo la determinación una semana después para PCC pues es la enzima más estable.

Se observa que las actividades son menores para el homogenado hecho en sacarosa con una semana de almacenamiento, mientras que en amortiguador de fosfatos no se aprecian diferencias después de dicho tiempo. Por esta razón, preparamos regularmente los homogenados en amortiguador de fosfatos y para mayor seguridad tratamos de utilizar los encefalos y sus regiones sin mucho tiempo de almacenamiento (máximo 1 semana).

3. Montaje de la técnica para determinar la actividad específica de las carboxilasas.

La técnica de Sweetman (56) se montó estableciendo: a) Las concentraciones de coenzimas y sustratos; b) Condiciones óptimas de sonicación (intensidad y tiempo); c) Concentración de proteínas en la muestra y d) El tiempo de incubación de la reacción. Todos los ensayos realizados para este fin, se repitieron varias veces. Aquí se presentan los resultados obtenidos en forma resumida o de uno de los más representativos.

a) Concentración de coenzimas y sustratos.

En nuestros primeros experimentos las actividades enzimáticas obtenidas fueron muy bajas, sobre todo para la PC. Esto nos hizo suponer que había una inhibición, en el caso de la PC, por exceso de acetil CoA que es su modulador alostérico. Para el caso de la PCC y la MCC se pensó que las bajas actividades eran debidas a la falta de sustrato.

Para comprobarlo se hicieron, para la PC, curvas de actividad enzimática contra concentración de coenzima encontrando de este modo la concentración de acetil CoA con la que se presentaron las mejores actividades. Los resultados son mostrados en el cuadro 8, las actividades están reportadas como $\text{pmol}^{14}\text{CO}_2$ fijado min^{-1} mg proteína $^{-1}$.

Hay que considerar además que la concentración original para la acetil CoA reportada por Sweetman es 19.2 mM pero por las bajas actividades obtenidas al trabajar con esta concentración, en el laboratorio se decidió utilizarla 35mM para muestras de linfocitos. Lo anterior nos hizo pensar que para tejido nervioso esta concentración podría variar.

Cuadro 8

Concentración de Acetil CoA	Actividad enzimática*
35 mM (condiciones originales)	4101
28 mM	3888
14 mM	3575
7 mM	3401

*pmol¹⁴CO₂ fijado min⁻¹ mg proteína⁻¹

Para comprobar si las bajas actividades eran debidas a la falta de sustrato, para las tres enzimas, se realizaron experimentos en donde se aumentaron las concentraciones de los reactivos en las siguientes proporciones:(cuadro 9)

Cuadro 9

Reactivos	condiciones originales (mM)	2a. condición (mM)	3a. condición (mM)
Propionil CoA	19.2	100	-
Metilcrotonil CoA	19.2	100	-
Acetil CoA	35.0	350	-
Piruvato de sodio	40.0	200	700
ATP	26.0	66	132
Tris	800.0	800	800
MgCl ₂	48.0	48	48
KCl	400.0	400	400
EDTA	4.0	4.0	4.0

Sin embargo, con las modificaciones, no se obtuvieron actividades ya que tanto el piruvato de sodio como el ATP acidificaron mucho el medio, quedando fuera de la capacidad de nuestro amortiguador, provocando que el NaH¹⁴CO₃ se transforme en ¹⁴CO₂↑ y por lo tanto no se pueda incorporar a las moléculas de sustrato.

Por lo anterior, se decidió aumentar la concentración del amortiguador en un 20% y probar con las siguientes concentraciones de coenzimas, dejando constantes las concentraciones originales de ATP y de piruvato de sodio. (cuadro 10)

Cuadro 10

Reactivos	concentración
Propionil CoA	40mM
β -Metilcrotonil CoA	40mM
Acetil CoA	35mM
Tris	1M
MgCl ₂	48mM
KCl	400mM
EDTA	4mM

De este modo se obtuvieron las mejores actividades (ver cuadro 16)

b) Condiciones de sonicación

Las condiciones de sonicación se determinaron con la PCC, debido a que es la enzima más estable y con el fin adicional de reducir el gasto de reactivos.

Las condiciones que se utilizaron y los resultados obtenidos fueron los siguientes: (cuadro 11)

Cuadro 11

Intensidad	número de pulsos	Actividad específica*
2	30 de 0.5seg. c/u	2806
3	20 de 0.5 seg. c/u	2775
3	30 de 0.5 seg c/u	2968
4	30 de 0.5 seg. c/u	2604

* $\text{pmol}^{14}\text{CO}_2$ fijadas $\text{min}^{-1}\text{mg. proteína}^{-1}$

Las intensidades y tiempos se escogieron con base en la experiencia del laboratorio donde se trabaja con muestras biológicas diferentes a tejido nervioso (linfocitos) y en las recomendaciones encontradas en el manual del aparato. Como puede observarse, las actividades obtenidas con las cuatro condiciones fueron equivalentes, pero se eligieron las presentadas en el recuadro (intensidad 3, dos series de 15 pulsos de 0.5seg cada uno, con un descanso intermedio de 30 segundos), porque

con ellas se presentaba menos espuma y porque además presentan actividades ligeramente mayores.

Con menores intensidades y tiempos cortos de sonicación no hay rompimiento de mitocondrias. Utilizando tiempos e intensidades mayores ocurre la desnaturalización de las enzimas con la consecuente pérdida de actividad.

c) Relación entre la concentración de proteínas y la velocidad enzimática.

Se realizaron ensayos para determinar la relación entre la concentración de proteínas y la velocidad enzimática. Se observó que nuestro método era lineal por arriba 4µg de proteínas para cada una de las enzimas. (ver cuadro 12 y gráficas 1, 2, y 3)

Cuadro 12

µg. proteína	PCC ^a	MCC ^a	PC ^a
0	0	0	0
0.94	1.98	0.97	5.48
2.61	6.24	2.50	12.2
3.61	8.03	3.63	16.0
4.16	10.3	4.19	22.0

* pmol¹⁴CO₂ fijados min⁻¹

d) Relación entre el tiempo de incubación y la actividad enzimática.

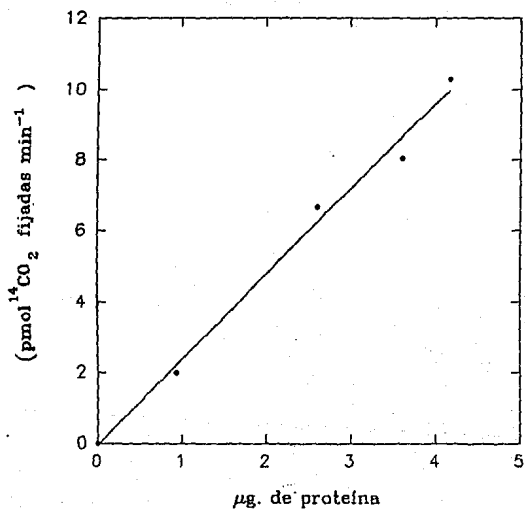
Se determinó la relación entre diferentes tiempos de incubación (30, 60, 90 y 120 minutos) a 32°C y la actividad enzimática. Nuestro método fue lineal hasta los 120 min. (Ver cuadro 13 y gráficas 4, 5 y 6)

Cuadro 13

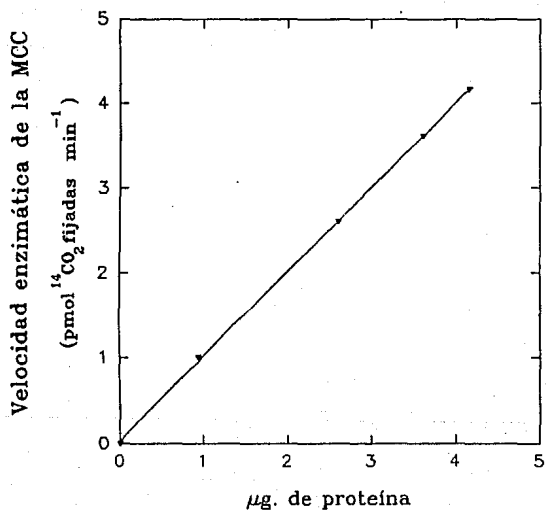
Tiempo(min.)	PCC ^a	MCC ^a	PC ^a
30	84,336	10,776	149,838
60	134,808	24,426	306,657
90	203,253	33,660	400,546
120	244,751	41,763	474,838

*pmol¹⁴CO₂ mg proteína⁻¹

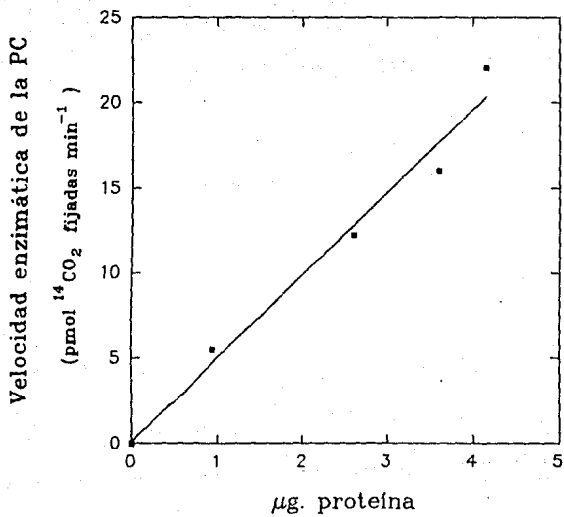
Velocidad enzimática de la PCC



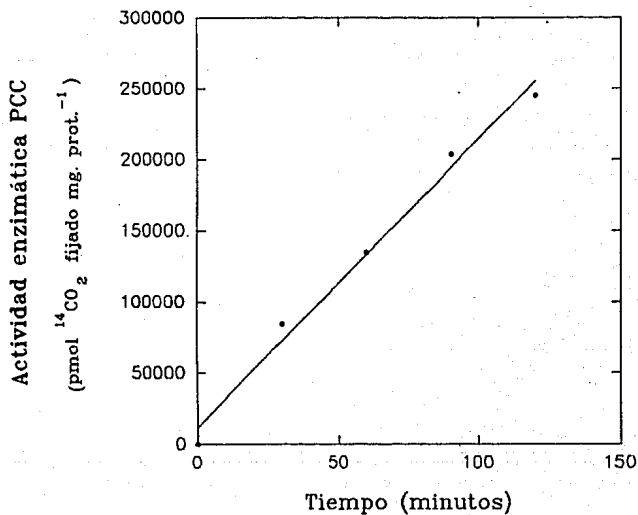
Gráfica 1. Efecto de la concentración de proteínas en la velocidad enzimática de la Propionil Co A Carboxilasa.



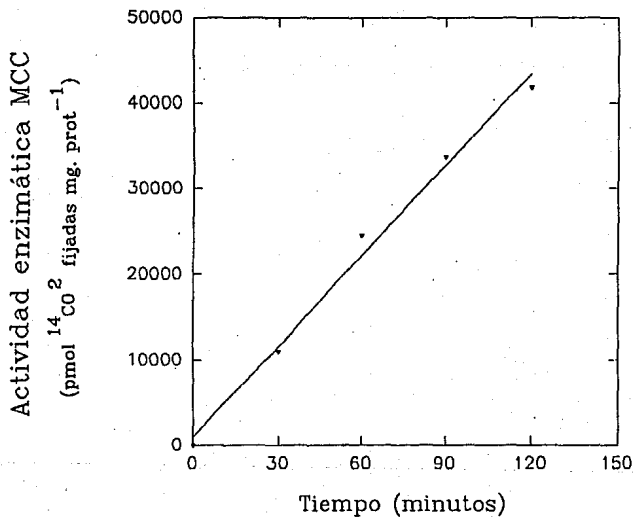
Gráfica 2. Efecto de la concentración de proteínas en la velocidad enzimática de la 3-Metilcrotonil CoA Carboxilasa.



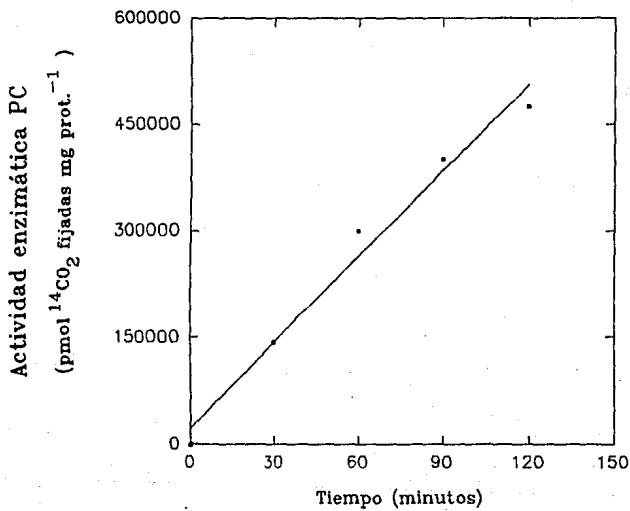
Gráfica 3. Efecto de la concentración de proteínas en la velocidad enzimática de la Piruvato Carboxilasa.



Gráfica 4. efecto del tiempo de incubación a 32°C sobre la actividad enzimática de la Propionil CoA Carboxilasa



Gráfica 5. Efecto del tiempo de incubación a 32°C sobre la actividad enzimática de la 3-Metilcrotonil CoA Carboxilasa



Gráfica 6. Efecto del tiempo de incubación a 32°C sobre la actividad enzimática de la Piruvato Carboxilasa.

3.1 Coeficiente de variación.

El coeficiente de variación intra e interensayo fue determinado considerando las actividades específicas de un sólo encéfalo. Los resultados reportados corresponden a la PCC que por ser la enzima más estable nos permitió realizar esta prueba. (cuadro 14)

Cuadro 14

Día	*	*	*	*	*	m±d.e	c.v.(%)
1	2484	2636	2309	2142	2423	2423±186	7.0
2	2554	2696	2627	2119	2374	2747±231	9.3
3	2196	2320	2035	2044	2246	2168±125	5.7
4	2362	2991	2810	2550	2636	2670±241	9.0

* $\text{pmol}^{14}\text{CO}_2$ fijadas $\text{min}^{-1}\text{mg. proteína}^{-1}$

m=media d.e=desviación estándar c.v.(%)=% de variación

Tomando en cuenta los datos anteriores, el coeficiente de variación intrasensayo fue en promedio 7.75%. (cuadro 14)

Cuadro 15

Día	media	d.e	c.v.(%)
1-4	2433.75	206	8.49

d.e=desviación estándar. c.v.(%)=porcentaje de variación

El coeficiente de variación interensayo fue 8.49. (cuadro 15)

4. Actividad específica de la PCC, MCC y PC en el encéfalo (sin tallo encefálico).

Con el fin de obtener los valores promedio de las actividades de la PCC, MCC y PC, se analizaron encéfalos completos y se obtuvieron los resultados mostrados en el cuadro 16 y en la gráfica 7. Se podrá apreciar que la PC fue la enzima que presentó las actividades más altas, la sigue la PCC y la que tuvo las actividades menores fue la MCC.

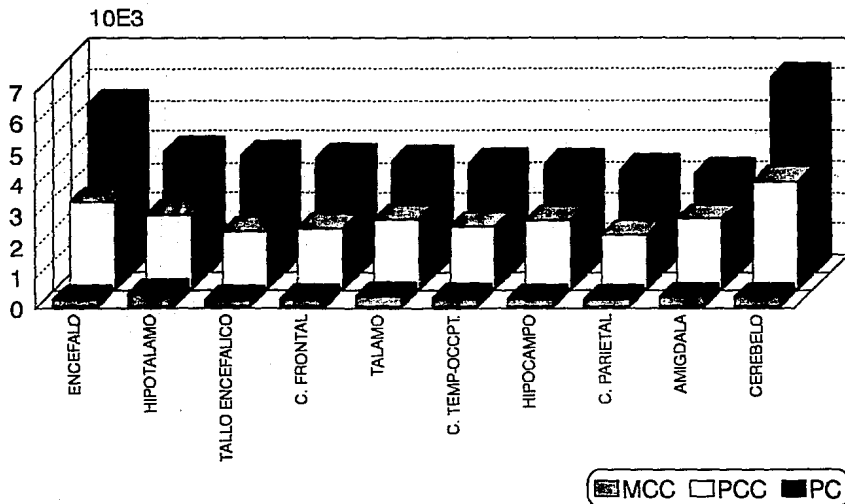
Cuadro 16

	PCC*	MCC*	PC*
n=8	2782±470	224.5±95	5408±775

* $\text{pmol}^{14}\text{CO}_2$ fijadas $\text{min}^{-1}\text{mg. proteína}^{-1}$

ACTIVIDAD DE CARBOXILASAS

(pmol $^{14}\text{CO}_2$ /min x mg proteína)



GRAFICA 7.

4.1 Análisis estadístico

Por los valores obtenidos de sesgo y curtosis, se pudo comprobar que los datos de las tres enzimas no seguían una distribución normal, por lo que para su análisis, se tuvo que recurrir a pruebas no paramétricas.

En primer lugar se buscó la existencia de diferencias entre los tres grupos por medio del análisis de varianza Kruskal Wallis y se encontró que sí había diferencias entre este grupo de enzimas con un valor de significancia estadística $p=0.001$. (60, 61)

Para identificar los grupos entre los cuales existían las diferencias encontradas, se decidió aplicar la prueba U de Mann-Whitney obteniéndose que los tres grupos de enzimas eran estadísticamente diferentes uno del otro con un nivel de significancia $p < 0.001$. (60, 61)

5. Actividad específica de PCC, MCC y PC en diferentes regiones del encéfalo.

Una vez conocidas las actividades de las tres enzimas en el encéfalo, se midieron las actividades en diferentes regiones del mismo. Los resultados se muestran en el cuadro 17 y en la gráfica 7. Es de notarse que para la PCC y la PC el cerebelo fue la región que presentó las actividades notablemente más altas.

Cuadro 17

Región	PCC*	MCC*	PC*
Amígdala	2238±221	307±96	3154±136
Tálamo	2225±380	328±188	3562±893
C.F.	1937±254	236±84	3634±330
Hipotálamo	2368±301	401±103	3855±616
Hipocampo	2184±370	243±61	3436±555
C.P.	1722±321	231±73	3276±359
C.O.T.	1988±188	272±69	3459±631
Cerebelo	3486±469	308±52	6229±754
Tallo encefálico	1847±238	197±16	3716±616
media	2205	284	3814
intervalo	1508-3994	127-627	2568-7389
mediana	2098	261	3431

* $\mu\text{mol}^{14}\text{CO}_2$ fijadas $\text{min}^{-1}\text{mg. proteína}^{-1}$

C.F.=corteza frontal; C.P.=corteza parietal C.O.T.=corteza occipital y temporal.

5.1 Análisis estadístico.

'Al igual que en el encéfalo completo, por los valores de sesgo y curtosis las actividades enzimáticas obtenidas en el estudio regional fueron analizadas por pruebas no paramétricas.

En primer lugar, se analizó, para cada enzima, la existencia de diferencias entre las nueve regiones. Para ello se empleó el análisis de varianza de Kruskal Wallis; el resultado fue que en el caso de la PCC y la PC la diferencia entre las nueve regiones tienen un valor de significancia estadística menor a 0.05 (para PCC, $p=0.0001$; para PC, $p=0.049$). (60, 61)

Para identificar entre qué regiones existían diferencias se recurrió a la prueba U de Mann-Whitney y se encontró que con un valor de significancia estadística menor a 0.05, tanto para la PC ($p=0.004$) como para la PCC ($p=0.004$), el cerebelo fue diferente a las demás regiones. (60, 61)

6. Concentración de proteínas en el encéfalo completo (sin tallo encefálico) y en regiones que lo conforman.

La concentración de proteínas obtenida por el método de Lowry, se presenta en el cuadro 16. Como se puede observar se presentan diferencias en la concentración de proteínas de una región a otra. (cuadro 18)

Cuadro 18

Regiones	n	µg. de prot./g. tejido húmedo
Amígdala	6	48.88±4.43
Tálamo	6	16.80±5.60
C.F.	6	50.22±9.77
Hipotálamo	6	40.00±9.50
Hipocampo	6	46.66±10.60
C.P.	6	61.77±14.66
C.O.T.	6	58.88±12.88
Cerebelo	6	43.33±3.33
Tallo encefálico	6	56.66±12.66
Encéfalo s/Tallo	6	53.33±5.33

C.F.=corteza frontal; C.P.=corteza parietal C.O.T.=corteza occipital y temporal.

7. Montaje de la técnica para determinar la concentración de biotina libre.

La validez de la técnica consistió en la adecuación de la siguientes variables: a) Número de regiones utilizadas por ensayo, b) Volúmenes de muestra y c) Rendimiento en las extracciones.

a) Número de regiones utilizadas por ensayo.

Para validar la técnica de medición de biotina en tejido nervioso, se trabajó inicialmente con el encéfalo completo (sin tallo encefálico) y se calculó la cantidad de biotina por miligramo de tejido húmedo (2.06 pg biotina libre/mg tejido húmedo). Se relacionó esta concentración con el peso de las regiones considerando tener una distribución de biotina uniforme en todo el encéfalo. Posteriormente se realizó un ensayo piloto donde se observó que las concentraciones se encontraban dentro de los límites de sensibilidad del ensayo. De esta afirmación sólo el tálamo y el hipocampo son las excepciones ya que las concentraciones de biotina se encontraban muy por debajo de estos límites.

Se decidió por lo tanto combinar, para estas dos regiones, los homogenados obtenidos de dos animales diferentes, y se concentraron aún más resuspendiéndolas en una cuarta parte del volumen original, de este modo las concentraciones de biotina se encontraron dentro de la región más confiable de la curva estándar.

Nota: La concentración de tejido es la misma para todas las regiones 0.045g de tejido húmedo/ml. de amortiguador.

b) Volumen de los extractos para analizar.

En la validez de la técnica tanto para encéfalo como para cada una de las regiones que lo componen, se buscaron los volúmenes de muestra ideales con los que se trabajaría. De este modo se utilizaron 3 volúmenes diferentes (50, 100 y 150 μ l) de los cuales se escogería aquel con el que la cantidad de biotina se ubicara dentro de los límites de sensibilidad del ensayo además de quedar en la zona confiable de la curva estándar.

Los volúmenes fueron variables para cada región.

c) Rendimiento de las extracciones.

La prueba para cuantificar el rendimiento consistió en agregar a un homogenado 0.031 μ Ci (70,000dpm) de 3 HB, procesar la muestra por vía normal y en una fracción de la suspensión final se midió la radiactividad final. Los resultados fueron los siguientes: (cuadro 19)

Cuadro 19

dpm originales	dpm	rendimiento
65,518	48,087	73%
65,518	59,430	91%
65,518	70,203	107%
65,518	58,000	88%
65,518	46,000	70%
65,518	42,000	64%
rendimiento promedio	-	82.16%

8. Concentración de biotina libre en el encéfalo (sin tallo encefálico)

Inicialmente se midió la concentración de biotina libre en el encéfalo completo.

Los resultados obtenidos son los siguientes:

Biotina libre: 2.06pg/mg. tejido húmedo,
47.00pg/mg. proteína

9. Concentración de biotina libre en las regiones

Una vez conocida la concentración de biotina libre en el encéfalo, se procedió a medirla en las diferentes regiones y se obtuvieron los siguientes resultados: (cuadro 20 y gráfica 8)

Cuadro 20

Región	n	pgBL/ μ g proteína
Amígdala	5	0.103 \pm 0.014
Tálamo	8	0.050 \pm 0.010
C.F.	5	0.081 \pm 0.016
Hipotálamo	5	0.065 \pm 0.004
Hipocampo	6	0.032 \pm 0.001
C.P.	5	0.054 \pm 0.010
C.O.T.	5	0.06 \pm 0.030
Cerebelo	5	0.102 \pm 0.020
Tallo encefálico	5	0.047 \pm 0.008
n total	49	-
media	-	0.070
intervalo	-	0.023-0.126
mediana	-	0.063

C.F.=corteza frontal; C.P=corteza parietal C.O.T=corteza occipital y temporal.

9.1 Análisis estadístico.

Por los valores de sesgo y curtosis se comprobó que nuestros datos no seguían una distribución normal por lo que se recurrió a pruebas no paramétricas para su análisis. En primer lugar como en los dos casos anteriores, se utilizó el análisis de varianza de Kruskal Wallis para verificar la existencia de diferencias entre las nueve regiones; el resultado obtenido indica que existen diferencias con un valor de significancia estadística menor a 0.05 ($p=0.003$). (60,61).

Como en los casos anteriores, para identificar los grupos entre los cuáles se presentaban dichas diferencias, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney. Los resultados, con un valor de significancia estadística menor a 0.05, fueron los siguientes: (60, 61)

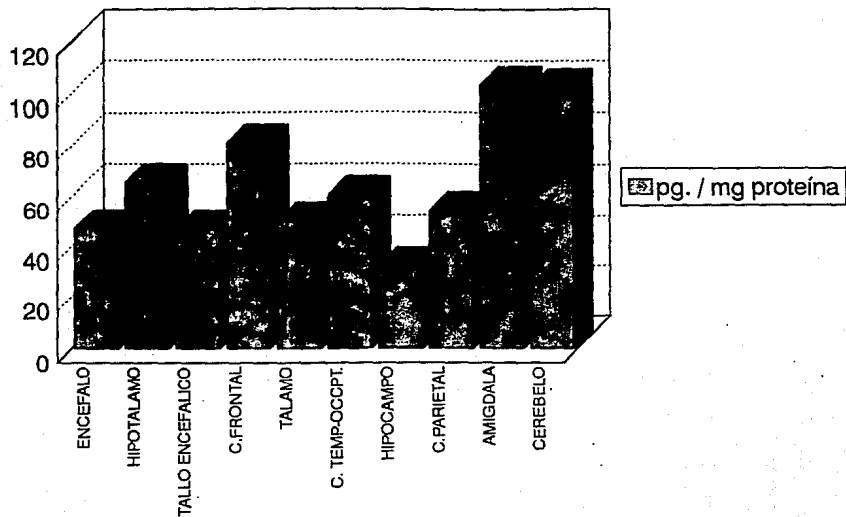
amígdala>tálamo, hipotálamo, hipocampo, COT, CP, tallo encefálico ($p=0.004$)

cerebelo>tálamo, hipotálamo, hipocampo, COT, CP, tallo encefálico ($p=0.004$)

corteza frontal>hipotálamo, hipocampo, tallo encefálico ($p=0.004$)

hipotálamo>hipocampo, tallo encefálico ($p=0.004$)

CONCENTRACION DE BIOTINA LIBRE



GRAFICA 8.

DISCUSION DE RESULTADOS

Los hallazgos en este estudio fueron:

1.- En el encéfalo se encontraron diferencias notables entre las actividades de las 3 carboxilasas mitocondriales.

Las actividades obtenidas concordaron con algunas reportadas en la literatura (46, 48):

La PC por ser la enzima anaplerótica predominante en el SNC (12) presentó las mayores actividades.

La PCC presentó actividades menores y estadísticamente diferentes a las de la PC, esta enzima participa en el catabolismo de aminoácidos ramificados, de ácidos grasos de cadena impar y del colesterol. Para esta enzima, nuestros resultados fueron mayores a las actividades reportadas en la literatura (46).

La MCC, que también es una enzima catabólica, presentó actividades concordantes con las reportadas en la literatura y diez veces más bajas a las de la PCC.(46)

Son de llamar la atención las altas actividades de la PCC ya que las fuentes que preceden a la propionil, CoA no son muy abundantes en el SNC (como los aminoácidos de cadena ramificada)(63), o si son abundantes, su metabolismo poco activo (ácidos grasos de cadena impar y colesterol). (45,46). La actividad de esta enzima se ha medido en diversos tipos celulares y siempre ha presentado actividades más altas a las de la MCC y en algunos otros hasta mayores a las de la PC (linfocitos).(46,56)

Lo anterior nos podría dar pie a especular acerca de las funciones de la PCC en el encéfalo. Hay indicios de que esta enzima tiene un papel anaplerótico importante en el músculo esquelético y en el cardiaco en donde repleta pozas de malato (62). En consecuencia se podría pensar en un papel semejante para la PCC en el SNC. De este modo la gran porción de α -cetoglutarato que es convertido a glutámico, GABA y a glutamina, se recuperaría a través de la PCC. Esta enzima mantendría constantes los niveles de los intermediarios del ciclo de Krebs suplementando, de manera indirecta, succinato así se produciría malato para la formación de aspártico (aminoácido abundante en el SNC) y también se producirían equivalentes reductores (NADH y FADH₂)

Es difícil, con nuestros resultados, apoyar dicha función anaplerótica en el SNC debido a que la PCC no sigue un patrón de comportamiento similar en los tejidos en los que se ha medido; en algunos presenta mayores actividades enzimáticas que en otros (46, 56) y su actividad en la deficiencia de biotina se conserva más en el encéfalo que en otros tejidos (46, 56), lo que nos habla

de mecanismos de regulación diferentes y desconocidos que impiden realizar dichas comparaciones.

No obstante, se pueden realizar posteriormente estudios con los que se apoye o no la función propuesta.

2.- Cada una de las tres enzimas presentó diferencias en algunas de las regiones encefálicas en donde fueron medidas.

Se observa que tanto la PC como la PCC presentan un patrón de comportamiento similar, siendo el cerebelo, la región de todo el encéfalo que presentó las mayores actividades, mientras que la MCC no presentó diferencias. Por lo que respecta a la PC, nuestros resultados concuerdan con los reportados por Sander en 1982(49) y que a su vez estaban en discordancia con los reportados por Schijver en 1979(48). Este último reportó una mayor actividad en el tallo encefálico.

En el cerebelo se ha encontrado que la densidad celular es cuatro veces mayor a la del resto del encéfalo(64) además el metabolismo del GABA es muy activo y las concentraciones de los ácidos aspártico y glutámico son muy grandes (65).

3.- La distribución de las concentraciones de biotina libre en el encéfalo, no fueron uniformes. La biotina como vitamina ha sido estudiada desde hace ya varias décadas y su importancia se ha ligado a la de su papel como cofactor de carboxilasas en mamíferos. Dentro de los estudios hechos acerca de la biotina, se encuentran aquellos en donde se ha medido su concentración en varios órganos, entre los cuales se ha incluido al encéfalo, órgano que ha apasionado e intrigado a los seres humanos durante siglos.

Desde 1962 a la fecha, se han reportado en la literatura trabajos en los que se ha medido la concentración de biotina total en encéfalos humanos y en algunas regiones del mismo.(53-55). Sin embargo, debido a que la biotina se puede encontrar en varias formas; unida a las holocarboxilasas, como biocitina o como biotina libre, estos estudios contribuyen muy poco a aclarar aspectos de su metabolismo.

Los resultados presentados en esta tesis constituyen el inicio de un trabajo que tiene como fin dilucidar el metabolismo de la biotina en el SNC. Nosotros medimos las concentraciones de biotina libre en diversas regiones del encéfalo y encontramos que éstas variaban de una región a otra. Las amígdalas y el cerebelo fueron los órganos que presentaron las mayores concentraciones de esta vitamina, mientras que el tallo encefálico, los tálamos y el hipocampo, fueron los órganos que presentaron las menores concentraciones además de ser estadísticamente diferentes a los demás. No se intentó determinar si había correlación entre las concentraciones de biotina libre y las actividades de las carboxilasas, ya que las cantidades de biotina libre pueden variar dependiendo de la actividad de la biotinidasa, de la cantidad de biotina intersticial.

Los resultados de este trabajo, nos sugieren realizar estudios en donde se mida la concentración de biotina unida a proteínas y la actividad enzimática de la biotinidasa, en diferentes regiones del encéfalo.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

CONCLUSIONES.

Existen diferencias notables entre las actividades de las tres carboxilasa mitocondriales en el encéfalo de la rata. La PCC presentó actividades más altas a las esperadas y reportadas en la literatura.

La PC y la PCC no se distribuyen de manera uniforme en el encéfalo, siguen un comportamiento similar; las dos son abundantes en el cerebelo. En el caso de la MCC no se encontraron diferencias entre las actividades de las regiones estudiadas.

La concentración de biotina libre no se presenta de manera uniforme en el encéfalo existen grandes diferencias. Las regiones en donde abundan son el cerebelo y las amígdalas; existen pequeñas cantidades de esta vitamina en el hipocampo, tálamos y tallo encefálico.

BIBLIOGRAFIA

1. Lehninger A. L. (1975). Vitaminas y coenzimas en Biochemistry. Capítulo 13, pp. 341-369. Ediciones Omega, Barcelona, España..
2. Kögl, F., Tonnis, B., (1936). Über das bios-problem. Darstellung von Krystallisiertem biotin aus eigelbz. *Physiol. Chem.* 242:43-73.
3. Du Vigneaud, W., Melville, D.B., Folkers, K.. (1942) The structure of biotin: A study of desthiobiotin. *J. Biol. Chem.* 146:474-85.
4. Harris, S.A. & Wolf, D.E. (1943). Synthetic Biotin. *Science* 97:447-48.
5. Dakshinamurti, K., Chauhan, J. (1988). Regulation of biotin enzymes. *Ann. Rev. Nutr.* 8:211-33.
6. Izumi, Y., Tani, Y. & Ogata, K. (1979). Microbiological biosynthesis of biotin. *Meth. Enzym.* 62:326-327.
7. Stoner, G.L., Eisenberg, M. A. (1975). Biosynthesis of 7,8-diaminopelargonic acid aminotransferase. An enzyme in the biotin synthetic pathway. *J. Biol. Chem.* 250:4029-4036.
8. Wood, H.G. & Barden, R.E. (1977). Biotin enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 46:385.
9. Achuta, P.N., Mistry, S.P. (1972). Synthesis of biotin-dependent carboxylases from their apoproteins and biotin. *J. Sci. Ind. Res.* 31:554-63.
10. Guckhait, R.B., Zwergel, E.E., Lane, D.M. (1974). Acetyl CoA Carboxylase subunit structure of the protomeric form of the avian liver enzyme. *J. Biol. Chem.* 249:4776-4780.
11. Kaloush, F., Daringo, M.D., Rosenberg, L.E. (1980). Isolation and characterization of propionyl CoA carboxylase from normal human liver. Evidence for a protomeric tetramer of non identical subunits. *J. Biol. Chem.* 255:60-65.
12. Sweetman L., Nyhan, W. (1986). Inheritable biotin-treatable disorders and associated phenomena. *Ann. Rev. Nutr.* 6:317-43.
13. Seiss, E.A., Kientsch-Engel, R.I., Wieland, O.H. (1984). Concentration of free oxaloacetate in the mitochondria compartment of isolated liver cells. *Biochem. J.* 218:171.
14. Ballard, I.J. & Hanson, R.W. (1967). The citrate clearance pathway and lipogenesis in rat adipose tissue. Replenish of oxaloacetate. *J.Lipid.Res.* 8:73-79.
15. Chiang, G.S., Mistry, S.D. (1975). A competitive study of pyruvate holocarboxylase synthesis in rat liver and kidney preparation. *Int. J. Biochem.* 6:527-38.
16. Nyhan, W. (1987). Inborn errors of biotin metabolism. *Arch. Dermatol.* 123:1696-1698.
17. Thoma, R.W. & Peterson, W.H. (1954) The enzymatic degradation of soluble bound biotin. *J. Biol. Chem.* 210:569-579.
18. Koivusalo, M. & Pispá, J. (1963). Biotinidase activity in animal tissues. *Acta Physiol. Scand.* 58:13-19.
19. Knappe, J., Brümer, W. & Bierderbick, K. (1963). Reinigung und eigenschaften der biotinidase aus schweinehirsen und *Lactobacillus casei*. *Biochem. Z.* 338:599-613.
20. Pispá, J. (1965). Animal biotinidase. *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.* 43:suppl. 5:5-39.
21. Hayakawa K. & Oizumi, J. (1986). Determination of biotinidase activity by liquid chromatography with fluorometric detection. *J. Chromat.* 383:148-152.
22. Burri, B.J., Sweetman, L. & Nyhan, L. (1981) Mutant Holocarboxylase Synthetase: Evidence for the enzyme defect in early infantile biotin-responsive multiple carboxylase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 34:590-601.
23. Lehnert, W., Niederhoff, H., Junker, A., et al. (1979). A case of biotin responsive 3-methylcrotonylglycinuria and 3-hydroxyisovaleric aciduria. *Eur. J. Pediatr.* 132:107-114.
24. Packman, S., Sweetman, L., Baker, H., et al. (1981). The neonatal form of biotin-responsive multiple carboxylation. *J. Pediatr.* 99:418-420.

25. Leonard, J.V., Seakins, J.W.T., Bartlett, K., et al. (1981). Inherited disorders of 3-methylcrotonyl CoA carboxylation. *Arch. Dis. Child.* 56:53-59.
26. Sander, J., Malmud, N., Cowan, M., Pacman, S., Amman, A. & Wara, D. (1980). Intermittent ataxia and immunodeficiency with multiple carboxylase deficiencies: A biotin responsive disorder. *Ann. Neurol.* 8:544-547
27. Wolf, B., Hsia, E., Sweetman, L., et al. (1981). Multiple carboxylase deficiency: Clinical and biochemical improvement following neonatal biotin treatment. *Pediatrics* 68:113-118.
28. Saunders, M.E. & Shrood, W.G. (1981). Evidence for a defect of holocarboxylase synthetase activity in cultured lymphoblasts from a patient with biotin-responsive multiple carboxylase deficiency. *J. Clin. Invest.* 68:1491-1495.
29. Saudobray, J. (1981). Search for the biochemical basis of biotin dependent multiple carboxylase activation in cultured fibroblasts. *Clin. Chim. Acta.* 122:241-248.
30. Wolf, B., Grier, R.E., Parker, W.D. et al. (1983). Deficient biotinidase activity in late-onset multiple carboxylase deficiency. *N. Engl. J. Med.* 308:161.
31. Wolf, B., Grier, R.E., Allen, R.J., et al. (1983). Phenotypic variation in biotinidase deficiency. *J. Pediatr.* 103:233-237.
32. Sweetman, L. (1981). Two forms of biotin-responsive multiple carboxylase deficiency. *J. Inherited. Metab. Dis.* 4:53-54.
33. Bartlett, K. & Leonard, J.V. (1980). A combined defect of three mitochondrial carboxylases presenting as biotin-responsive 3-methylcrotonil glycinuria and 3-hydroxyisovaleric aciduria. *Clin. Chim. Acta.* 100:183-186.
34. Thoene, J., Baker, H., Yosino, M., et al. (1981). Biotin-responsive carboxylase deficiency associated with subnormal plasma and urinary biotin. *N. Engl. J. Med.* 304:817-820.
35. Nyhan, W.L. (1987). Multiple carboxylase deficiency: Biotinidase deficiency, in *Diagnostic Recognition of Genetic Disease* Nyhan, W. L. (ed). Philadelphia, Lea & Febiger, pp 58-65.
36. Schubiger, G., Caffish U., Baugartner, R., et al. (1984). Clinical course and biochemical findings. *J. Inherited. Metab. Dis.* 7:129-130.
37. Charles, B.M., Hosking, G., Green, A., et al. (1979). Biotin-responsive alopecia and developmental regression. *Lancet* 2:118-120.
38. Kecton, B.R., Moosa, A. (1981). Organic aciduria: Treatable cause of floppy infant syndrome. *Arch. Dis. Child.* 51:636-638.
39. Thuy L.P., Zielinska, B., Zammarchi, E., et al. (1986). Multiple carboxylase deficiency due to deficiency of biotinidase. *J. Neurogenet.* 3:357-363.
40. Di Rocco, M., Superti-Furga, A., Durand, P., et al. (1984). Different organic acid patterns in urine and cerebrospinal fluid in a patient with biotinidase deficiency. *J. Inherited Metab. Dis.* 7(suppl.2):119-120.
41. Sebrell, W. H. & Harris, R.S. Eds. *The Vitamins.* Academic Press New York, 1968. 261.
42. Zak, T.A., & D'Ambrosio, J. (1985). Nutritional nystagmus in infants. *J. Pediatr. Ophthalmol. Strabismus.* 22:140-142.
43. Suchy, S., Mc Voy, J.S. & Wolf, B. (1985). Neurological symptoms of biotinidase deficiency: Possible explanation. *Nerology* 35:1510-1511.
44. Rosenberg, R.N. (1981). Biochemical genetics of neurologic disease. *N. Engl. J. Med.* 305:1181.
45. Suchy, S.F. & Wolf, B. (1986). Effect of biotin deficiency and supplementation on lipid metabolism in rats: cholesterol and lipoproteins. *Am. J. Clin. Nutr.* 43:831-838.
46. Suchy, S.F., Rizzo, W. & Wolf, B. (1986). Effect of biotin deficiency and supplementation on lipid metabolism in rats: saturated fatty acids. *Am. J. Clin. Nutr.* 44:475-480.
47. Dakshinamurti, K., Chauhan, J.(1989). Biotin, in *Vitamins and hormones* vol.45 Academic Press.

48. Schrijver, J., Dias, Th. & Hommes, F.A. (1979). Some biochemical observations on biotin deficiency in the rat as a model for human pyruvate carboxylase deficiency. 23:179-191.
49. Sander, J., Packman, S. & Townsends, J. (1982). Brain pyruvate carboxylase and the pathophysiology of biotin-dependent diseases. *Neurology* 32:878-880.
50. Berl, S. & Clark, D. (1969) Metabolic compartmentation of glutamate in the CNS, en *Handbook of neurochemistry*, A., Lajtha (Ed.) Vol. 1, pp.168-197. Plenum Press. New York.
51. Shank, R., Bennet, G., Freytag, S. & Campbell, G. (1985). Pyruvate carboxylase: an astrocyte-specific implicated in the replenishment of aminoacid neurotransmitter pools. *Brain Res.* 329:364-367.
52. Shank, R. & Campbell, G. (1984). α -Ketoglutarate and malate uptake and metabolism by synaptosomes: further evidence for an astrocyte-to-neuron metabolic shuttle. *J. Neurochem.* 42:1153-1161.
53. Baker, H., Frank, O., Matovich, B., Pasher, I., Aaronson, S., Hutner, S. & Sobotka, H. (1962). A new assay method for biotin in blood, serum, urine and tissues. *Anal. Biochem.* 3:31-39
54. Gerstl, B., Lehwalt, M. & Glick, D. (1964). Quantitative regional distribution of biotin in human brain. *J. Neurochem.* 11:873-875.
55. Baker, H., Frank, O., Chen, T., Feingold, S., De Angelis, B. & Baker, E. (1984). Vitamin content of some normal human brain segments. *J. Neurosci. Res.* 11:419-435.
56. Sweetman, L.: Protocol miniaturized assay. Comunicación personal.
57. Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. & Randall, R. (1961). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
58. Bácz, A. Manuscrito en preparación.
59. March, S., Parikh, I. & Cuatrecasas, P. (1974). A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography. *Anal. Biochem.* 60:142-152.
60. Siegel, S. (1990). El caso de k muestras independientes, en *Estadística no paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta*. Capítulo 8, pp.204-224. Editorial Trillas, México.
61. Castilla, S.L. y Cravioto, J.C. (1991). Pruebas estadísticas no paramétricas, en *Estadística simplificada para la investigación en ciencias de la salud*. Capítulo 3 pp.163-235. Editorial Trillas, México.
62. Davis, E., Spydevold, Q. & Bremer, J. (1980). Pyruvate carboxylase and and propionyl CoA caboxylase as anaplerotic enzymes in skeletal muscle mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 110:255-262
63. Siegel, G., Agranoff, B., Albers, R. & Molinoff, P. (1989). Intermediary metabolism en *Basic Neurochemistry*. Cp. 28, pgs.541-563, Raven Press. USA
64. Nummerger, J. & Gordon, M. *Ultrastructure and cellular chemistry of neural tissues*. Edit. Waclesch. New York 1957.
65. Shank, R. & Aprison M. (1971). Post mortem changes in the content and specific radioactivity of several aminoacids in four areas of the rat brain. *J. Neurobiol.* 2:145-151.