



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

SECRETARIA DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA



11237
153

2ej
ATZ
ALIAZ

EFFECTOS DE LA SUPLEMENTACION CON BIOTINA
SOBRE LAS CARBOXILASAS LINFOCITARIAS Y
LA BIOTINA PLASMATICA EN LA DESNUTRICION
ENERGETICO - PROTEINICA GRAVE

TESIS DE POSGRADO

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
ESPECIALISTA EN PEDIATRIA MEDICA

P R E S E N T A

MARGARITA DE LOURDES TERAN GARCIA

MEXICO, D. F.

1994

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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA
División de Estudios de Postgrado

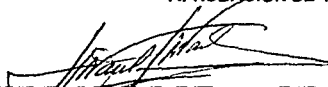
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA
Secretaría de Salud


EFFECTOS DE LA SUPLEMENTACION CON BIOTINA SOBRE LAS
CARBOXILASAS LINFOCITARIAS Y LA BIOTINA PLASMATICA EN LA
DESNUTRICIÓN ENERGETICO-PROTEINICA GRAVE

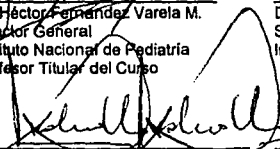
TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE ESPECIALISTA EN PEDIATRIA
MEDICA PRESENTA LA

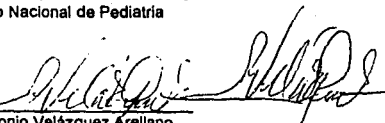
Dra. Margarita de Lourdes Terán García

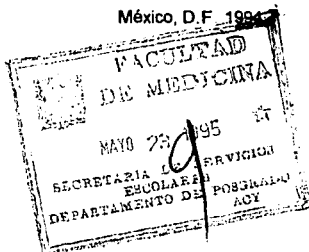
APROBACION DE TESIS


Dr. Héctor Fernández Varela M.
Director General
Instituto Nacional de Pediatría
Profesor Titular del Curso


Dr. Rigoberto Martínez Benavides
Subdirector General de Enseñanza
Instituto Nacional de Pediatría


Dr. Luis Heshiki Nakandakari
Jefe del Departamento de
Pre y Postgrado
Instituto Nacional de Pediatría


Dr. Antonio Velázquez Arellano
Jefe de la Unidad de Genética de la
Nutrición, Instituto de Investigaciones
Biomédicas, UNAM
Instituto Nacional de Pediatría
Asesor de Tesis



EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN LA UNIDAD DE GENETICA DE LA NUTRICION DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO, Y EN EL SERVICIO DE NUTRICION DEL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA DE LA SECRETARIA DE SALUD, BAJO LA DIRECCION DEL DR. ANTONIO VELAZQUEZ.

ESTE TRABAJO FUE SUBVENCIONADO POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE MEXICO Y POR EL PROGRAMA UNIVERSITARIO DE INVESTIGACION EN SALUD DE LA UNAM.

LA Q.F.B. GRACIELA AGUILAR DE LOS LABORATORIOS GROSSMAN PREPARO Y DONO LOS FRASCOS CONTENIENDO EL PLACEBO Y LA BIOTINA PARA EL ESTUDIO DOBLE CIEGO.

DEDICATORIA

A mis padres **Jesús y Margarita**, les dedico esta tesis por su constante apoyo para poder realizar mis metas, porque me han dado comprensión, estímulo y tiempo, que hubiera podido disfrutar con ellos, para dedicarlo a mi trabajo,

Con amor les doy las gracias.

A mis hermanos
Jesús, Alma y Yolanda,
con gran cariño.

A tí familiar y amigo que me diste...
una mirada, una palabra o tú tiempo,
tu ternura, confianza o aliento,
para que fuera posible este momento.

Al Dr. Antonio Velázquez por su invaluable apoyo para la realización de este trabajo, por ser mi maestro y transmitirme su entusiasmo y compromiso con la vocación científica.

Además de distinguirme con su amistad, le agradezco sus palabras y acciones, siempre sabias y generosas, que han guiado mi camino en los últimos años.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a valiosa colaboración de las personas citadas, este proyecto de investigación ha sido realizado de manera exitosa. La autora lo agradece profundamente, aclarando que durante los 4 años de desarrollo del mismo muchas otras contribuyeron de una u otra forma, especialmente, y por orden alfabético a:

M. en C. Armida Baez Saldaña, UGN, IIBM-UNAM, INP-SS.

Dra. Judith Gutiérrez Aguilar, Pediatra, INP-SS.

Dr. Bartolomé Pérez Ortiz. Jefe del Servicio de Nutrición, INP-SS.

Sra. Martha Raya Avila. UGN, IIBM-UNAM, INP-SS.

Biol. Rocío Rodríguez Meléndez, UGN, IIBM-UNAM, INP-SS.

y al personal de enfermería del Servicio de Nutrición, INP-SS.

INDICE

	pag.
RESUMEN.....	1
I.- INTRODUCCION.....	2
II.- ANTECEDENTES	
DESNUTRICION.....	3
Definición y clasificación	
Cuadros clínicos de desnutrición	
BIOTINA.....	7
Aspectos históricos	
Distribución	
Biotina y carboxilasas	
Biotinilación y liberación de biotina	
Deficiencia de biotina	
III.- HIPOTESIS.....	20
IV.- OBJETIVOS.....	21

V.-	JUSTIFICACION.....	22
VI.-	MATERIAL Y METODOS.....	23
	Selección de pacientes.....	23
	Población objetivo	
	Criterios de inclusión	
	Criterios de exclusión	
	Criterios de eliminación	
	Diseño experimental.....	24
	Extracción de linfocitos a partir de sangre completa	
	Determinación de la concentración de biotina plasmática	
	Determinación de la actividad enzimática de las carboxilasas	
	Indicadores de la investigación.....	30
	Consideraciones éticas.....	30
	Carta de consentimiento informado.....	31
	Análisis estadístico.....	32
VII.-	RESULTADOS	33
VIII.-	DISCUSION	50
IX.-	BIBLIOGRAFIA	56
X.-	ANEXO I (fotografías clínicas de algunos pacientes).....	63

RESUMEN:

A 22 niños con desnutrición energético proteínica grave (DEP) (5 con kwashiorkor, 10 con marasmo, 7 "sugar babies") y a 14 controles bien nutridos les estudiamos la concentración plasmática de biotina y la actividad de las carboxilasas de piruvato (PC) y de propionil Coenzima A (PCC) en linfocitos, así como el efecto sobre ellas de un suplemento de biotina (10 mg/día) o de un placebo, utilizando un diseño experimental tipo "doble ciego". Encontramos diferencias significativas entre los desnutridos y los controles para la PCC, pero la actividad de esta enzima no fué diferente entre las tres variedades clínicas de desnutrición. Seis de los pacientes presentaron las actividades de ambas carboxilasas (PC y PCC) por abajo del límite inferior de los controles normales. No se encontró correlación entre las concentraciones de biotina y las actividades de las carboxilasas en pacientes individuales. La actividad específica de las dos carboxilasas aumentó más de 4 veces en los pacientes que recibieron el suplemento de la vitamina que en los que recibieron el placebo, pero esta diferencia se observó únicamente en aquellos con actividades enzimáticas subnormales al inicio de la administración del tratamiento. En contraste, no observamos una respuesta consistente de las carboxilasas relacionada con las concentraciones iniciales de biotina en el plasma. Estos resultados indican que dichas deficiencias enzimáticas son la consecuencia de una carencia nutricional de biotina; que las carboxilasas linfocitarias y especialmente la PCC son mejores indicadores del estado de la biotina en pacientes individuales que las concentraciones de la vitamina en plasma; y que en algunos pacientes desnutridos esta deficiencia vitamínica puede ser un paso metabólico limitante para su homeostasis nutricional.

Biotin supplementation affects lymphocyte carboxylases and plasma biotin in severe protein-energy malnutrition¹⁻³

Antonio Velázquez, Margarita Terán, Armida Bdez, Judith Gutiérrez, and Rocio Rodríguez

ABSTRACT We studied the effect of a supplement of biotin (10 mg/d) or a placebo under double-blind conditions on plasma biotin concentrations and lymphocyte propionyl CoA carboxylase (PCC) and pyruvate carboxylase (PC) in 22 children with severe protein-energy malnutrition (PEM) (5 with kwashiorkor, 10 with marasmus, and 7 "sugar babies"). There were significant differences between the malnourished and control subjects only for PCC, although not among the three PEM types. Six of the patients had both PC and PCC activities below the lowest of the normal control subjects; there was no correlation between biotin concentrations and carboxylase activities in individual patients. In response to biotin supplementation, the greatest change in lymphocyte carboxylase activities was detected in patients who had abnormally decreased initial carboxylase activities, but the response was not related to initial plasma biotin concentration. These results indicate that these enzyme deficiencies are the result of a nutritionally determined biotin deficiency, that carboxylases and especially PCC are better indicators of the biotin status in individual patients than is the plasma biotin concentration, and that in some malnourished patients biotin deficiency may be rate-limiting in their nutritional homeostasis. *Am J Clin Nutr* 1995; 61:1-8.

KEY WORDS Propionyl CoA carboxylase, pyruvate carboxylase, biotin, protein-energy malnutrition, kwashiorkor, marasmus, sugar baby, lymphocyte

Introduction

Protein-energy malnutrition (PEM) is a heterogeneous disorder, both clinically and biochemically (1). Vitamin deficiencies are very frequent in PEM but their role in its metabolic disturbances and clinical course is not as well known as are the deficiencies of protein and energy (2). One of the least-studied vitamins is biotin, despite its prominent role in intermediary metabolism, perhaps because its isolated deficiency is very rare (3). The clinical manifestations of this deficiency include periorificial erythematous squamous dermatitis, alopecia, hypotonia, irritability, lethargy, immune deficiency, and failure to thrive (4). Similar manifestations may also be observed in PEM, although they are deemed unspecific since they may be caused by other nutrient deficiencies. Since PEM is a multifactorial disorder, there may be different rate-limiting steps for nutritional rehabilitation in different patients. Therefore, it is important both for theoretical and for practical reasons to know

whether biotin deficiency is rate-limiting in the nutritional homeostasis of some of them. In this case, biotin supplementation could be useful; vitamin supplements are not usually part of infant malnutrition treatment.

Biotin is the cofactor of carboxylases and as such has an important role in gluconeogenesis and Krebs cycle anaplerosis (pyruvate carboxylase, PC), branched-chain amino acid and odd-chain fatty acid catabolism (propionyl CoA carboxylase, PCC), leucine catabolism (3-methyl crotonyl CoA carboxylase, MCC), and fatty acid synthesis and elongation (acetyl CoA carboxylase, ACC) (5).

Our group has presented preliminary evidence for biotin deficiency in some patients with PEM (6), consisting of subnormal plasma biotin concentrations and lymphocyte carboxylase activities. In this paper these observations have been extended to three clinical varieties of PEM, and the effect of a supplement of biotin on lymphocyte PCC and PC in children with severe PEM has been studied to better define the children's biotin status and some of its metabolic and clinical implications. On the basis of our previous results, it appears that only some malnourished children are biotin deficient; hence, this analysis is largely based on data from individual patients.

Subjects and methods

Patients

Twenty-two patients with third-degree malnutrition admitted at Mexico's National Institute of Pediatrics were studied: 5 with classical kwashiorkor and 10 with marasmus, in terms of the Wellcome classification (7); the other 7 patients were classified as "sugar babies." This term was coined by Platt (8) to describe malnourished infants with a body weight 60-80% normal for age, edema, and some subcutaneous adipose tissue, but with only minimal changes in the skin and hair that he

¹From the Unidad de Genética de la Nutrición, Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM, and the Instituto Nacional de Pediatría, México.

²Supported by research grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México and from Programa Universitario de Investigación en Salud de la UNAM.

³Address reprint requests to A. Velázquez, Instituto Nacional de Pediatría, Apartado Postal 101-48, México, DF 04530.

Received March 24, 1994.

Accepted for publication September 9, 1994.

INTRODUCCIÓN

La desnutrición energético-proteínica (DEP) es un trastorno heterogéneo, tanto clínica como bioquímicamente [1]. Las deficiencias vitamínicas son muy frecuentes en la DEP, pero su efecto en los trastornos metabólicos y en el curso clínico de los desnutridos no ha sido tan bien dilucidado como el de la carencia de energía y proteínas [2]. De entre las distintas vitaminas, la menos conocida es la **biotina**, a pesar de su participación destacada en el metabolismo intermediario, probablemente porque su deficiencia aislada es muy rara en humanos [3]. A continuación se señalarán los antecedentes respecto a algunos aspectos básicos de la desnutrición energético proteínica grave (DEP), y posteriormente de la vitamina biotina, a partir de lo cual se plantea la justificación para el estudio de los efectos de la suplementación con biotina en pacientes desnutridos de tercer grado.

DESNUTRICION

Definición y clasificación

La desnutrición energético-proteínica (DEP) es un problema de salud pública importante. En la encuesta nacional sobre el estado de nutrición en el medio rural se detectó que al menos 40% de la población menor de 5 años tiene algún grado de desnutrición y se ha reportado que del 2 al 5% de ellos presenta desnutrición de tercer grado [4].

Según la definición del Dr. Ramos Galván la desnutrición energético-proteínica es "un estado patológico, inespecífico, sistémico y potencialmente reversible que se origina como resultado de la deficiente utilización por las células del organismo de los nutrientes esenciales; que se acompaña de variadas manifestaciones clínicas de acuerdo a los factores ecológicos y que reviste diversos grados de intensidad" [5].

Se han realizado múltiples intentos para clasificar a la desnutrición [6-8], sin embargo, la clasificación propuesta por el Dr. Gómez sigue siendo clásica y de acuerdo a él se consideran tres grados de acuerdo al porcentaje de déficit de peso para la edad, a saber:

Grados	Porcentaje de déficit peso para la edad
I.- Leve	10 - 24%
II.- Moderada	25 - 39%
III.- Grave	mayor de 40%

La modificación del Dr. Bengoa [5] considera además como desnutrición de III grado si se presenta edema de origen nutricional. Esta es la clasificación utilizada en nuestro Instituto para los pacientes que ingresan al Servicio de Nutrición.

Con la ventaja de poder prescindir de la edad cronológica, se utilizan también los porcentajes de peso/talla para clasificar el grado de deterioro [7], y de acuerdo a ello se conocen tres grados:

Grados	Porcentaje de peso para la talla
I.- Leve	90 - 80%
II.- Moderada	79 - 70%
III.- Grave	menor del 70%

Otro índice para evaluar la desnutrición es el déficit de talla para la edad, que nos habla de la cronicidad de la misma y que, según Waterlow, [8] se clasifica como atrofia, a saber hay tres grados:

Grados	Porcentaje de talla para la edad
I.- Leve	95 - 90%
II.- Moderada	89 - 85%
III.- Grave	menor del 85%

Cuadros clínicos de desnutrición

Definimos al **kwashiorkor** como el paciente con desnutrición grave que presenta panículo adiposo en cantidad variable, edema el cual es un signo característico y lesiones cutáneas descamativas, existiendo también alteración en mucosas y cabello de diversa intensidad, las faneras están necesariamente afectadas, el paciente además se encuentra irritable. El **marasmo** es aquel desnutrido grave que, como característica principal, presenta ausencia de panículo adiposo, tiene fascie senil, no tiene edema y sus lesiones en mucosas son de poca intensidad, el déficit de peso para la edad es mayor al 40% [6-9]. "**Sugar baby**" es el término acuñado por Platt para definir al paciente desnutrido de tercer grado con un peso corporal del 60 al 80% del normal para su edad, con panículo adiposo en cantidad variable, con o sin edema y/o hepatomegalia, además de cambios mínimos en la piel y cabello, él pensaba que este cuadro clínico era producido por una dieta baja en proteínas y alta en carbohidratos [10].

En la figura 1 se muestran algunas características principales del kwashiorkor y marasmo.

KWASHIORKOR

MARASMO NUTRICIONAL

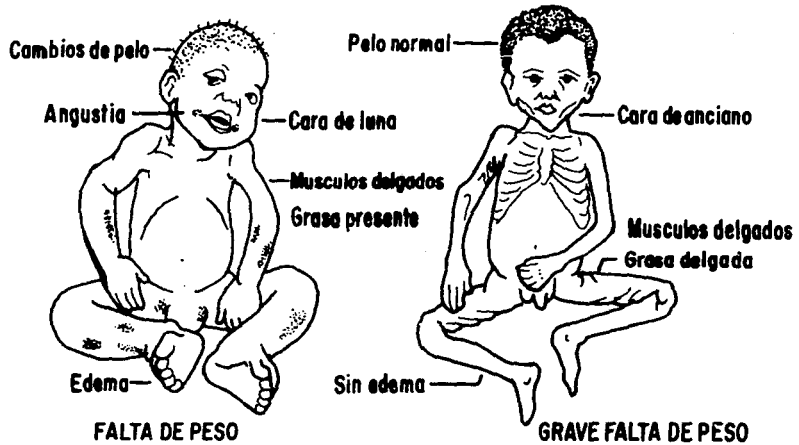


FIGURA 1

CUADROS CLÍNICOS DE DESNUTRICIÓN

BIOTINA

Aspectos Históricos

El descubrimiento de la biotina y la elucidación de su estructura, así como su papel en el metabolismo, comprende extensas investigaciones durante varias décadas [11].

La historia se remonta hasta 1901 con algunos experimentos del microbiólogo belga E. Wildiers sobre el cultivo de levaduras, quien observó que estas células no solo requerían de sales y glucosa para su crecimiento, sino también de un factor esencial que provenía del mosto de cerveza. Este factor fue llamado "Bios" e inmediatamente empezaron los esfuerzos para su aislamiento. [12]. En los siguientes 30 años, se encontró que bios era una mezcla de diferentes compuestos; el primero llamado bios I, fue más tarde identificado como meso-inositol; posteriormente se aisló el bios IIA que resultó ser ácido pantoténico y el tercer componente de la mezcla, el bios IIB, fue aislado por F. Kogl y B. Tonnis en 1936 a partir de yema de huevo, levaduras autolizadas y preparaciones de hígado. Este último aislamiento condujo a la primera cristalización de un nuevo factor al cual llamaron biotina [13].

Las observaciones más notables que permitieron el descubrimiento de la biotina fueron:

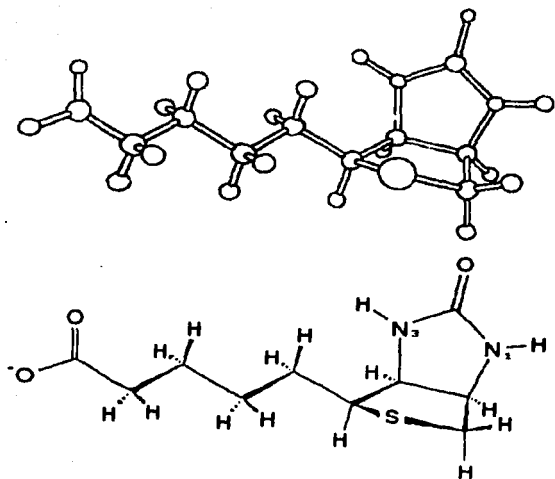
a) En 1898 F. Sternitz reportó la aparición de lesiones en la piel al alimentar ratas con huevos crudos, observó que este efecto desaparecía con

un factor estable presente en el hígado y en las levaduras, el cual fue llamado vitamina H (por Hautt, que en alemán significa piel).

b) En 1939, Gyorgy encontró que la vitamina H, era en realidad biotina [14]. Poco después en 1941 E. Snell descubrió que la avidina era un inhibidor de la biotina y que ésta era la causante de la toxicidad de los huevos crudos.

La estructura de la biotina fue determinada en 1942 por Du Vigneaud y colaboradores [15] y confirmada en 1943 por S. Harris mediante experimentos de síntesis total y análisis de rayos X [16]. Gracias a estos estudios se demostró que la biotina es el ácido (+)cis-hexahidro-2-oxo-1H-tieno [13,14] imidazol-4-valérico (Fig. 2).

Los primeros estudios sobre la biosíntesis de biotina fueron realizados en bacterias también por Du Vigneaud, quién mostró que en *Corynebacterium diphtheriae*, la biotina puede ser reemplazada como factor de crecimiento por el ácido pimérico [17]. Al mismo tiempo se encontró que la síntesis de biotina en *Aspergillus niger* es frecuentemente estimulada por el ácido pimérico. Desde entonces se postuló que este ácido participa en la biosíntesis de biotina en microorganismos. En la actualidad se sabe que los mamíferos no la biosintetizan (Fig. 3).



FALLA DE ORIGEN

FIGURA 2

ESTRUCTURA DE BIOTINA

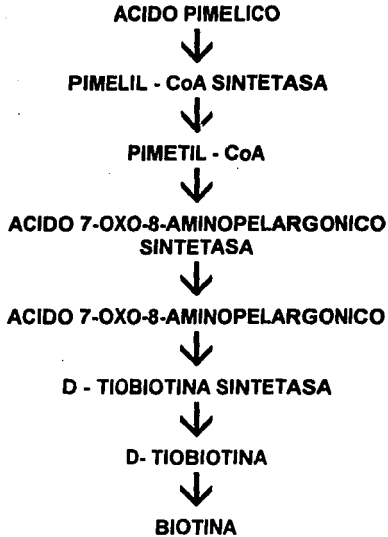


FIGURA 3

BIOSINTESIS DE BIOTINA EN MICROORGANISMOS

Distribución

La biotina es un importante factor nutricional. Se han encontrado bajas concentraciones de esta vitamina respecto a las otras en plantas y tejidos animales y puede ser sintetizada por una amplia variedad de bacterias, incluyendo algunas del tracto gastrointestinal humano y de otras especies animales.

Se encuentra en forma libre en la leche, las frutas, la yema de huevo y algunas verduras; y unida a proteínas en tejidos animales como hígado, riñón, así como en cereales y levaduras. [18]. Esta unión a proteínas es por medio de un enlace covalente entre el grupo carboxilo de la porción alifática de la biotina y el grupo épsilon-amino de la lisina; y el sitio de biotinilación es altamente conservado con respecto a especies y enzimas [19] (Fig 4). Esta unión requiere de una enzima llamada holocarboxilasa sintetasa (HS). La biotinilación de las apocarboxilasas comprende al intermediario de biotinil adenilato seguido por la transferencia de biotina a la apocarboxilasa para producir la holocarboxilasa [20].

Biotina y Carboxilasas

El papel más importante de la biotina es el de actuar como grupo prostético de diferentes enzimas. Las cuatro principales enzimas que contienen biotina son: Propionil Coenzima A carboxilasa (PCC), Piruvato carboxilasa (PC), β -Metilcrotonil-Coenzima A carboxilasa (MCC) y Acetil Coenzima A carboxilasa (ACC) (Fig. 5). La ACC es una enzima citosólica, mientras que las otras tres son mitocondriales. La biotina participa en el sitio

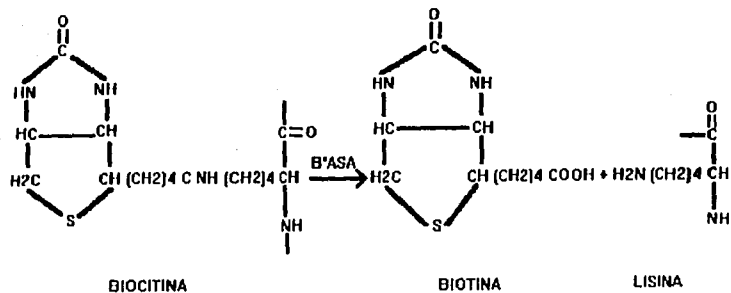


FIGURA 4

ESTRUCTURA DE BIOTINA UNIDA COVALENTEMENTE A UN RESIDUO DE LISINA DE UNA CARBOXILASA (BIOCITINA) Y REACCION DE LA BIOTINIDASA

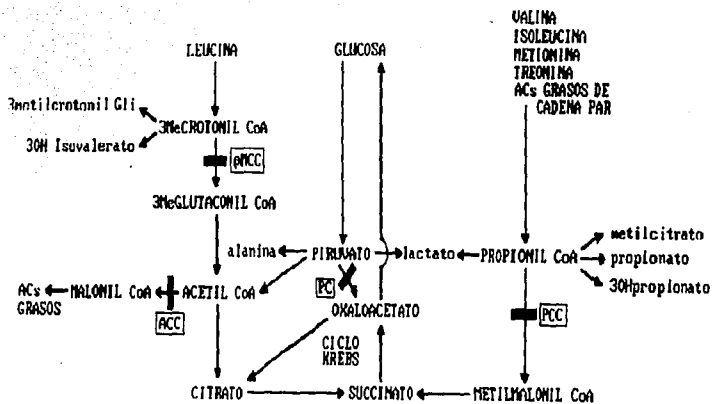


FIGURA 5

**VIAS METABOLICAS EN LAS QUE ACTUAN LAS 4
CARBOXILASAS DEPENDIENTES DE BIOTINA**

activo de estas carboxilasas [19] funcionando como un acarreador de CO₂ que incorpora a los diferentes sustratos, siendo dicha incorporación dependiente de ATP [21].

La ACC cataliza la carboxilación de Acetil-CoA, que lleva a la formación de Malonil-CoA la cual es el primer intermediario en la síntesis de ácidos grasos y participa en la regulación de la lipogénesis y de la β -oxidación; por lo tanto también interviene en la génesis de la membrana celular. La ACC tiene una estructura compleja, sujeta a regulación alostérica, particularmente por el citrato; puede encontrarse en un estado protomérico, catalíticamente inactiva, y en estado polimérico, el cual es el estado activo de la enzima [22].

La PC es una enzima clave de la gluconeogénesis en el hígado y en el riñón, donde cataliza el primer paso de esta vía metabólica. Está también presente en tejidos lipogénicos (hígado, tejido adiposo, glándula mamaria y suprarrenal) en los que actúa en la síntesis de ácidos grasos participando en el transporte de la mitocondria al citosol de grupos acetilo vía citrato y de equivalentes reducidos vía malato [23]. En todos los tejidos tiene un papel anaplerótico del ciclo de los ácidos tricarbóxicos al catalizar la formación de oxaloacetato [24]. Es una enzima tetramérica, compuesta de subunidades idénticas y cada polipéptido contiene una molécula de biotina.

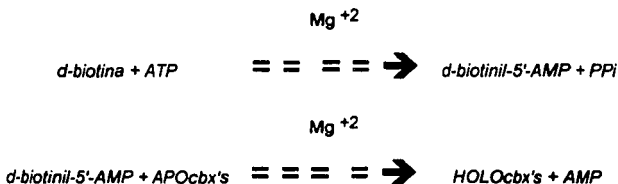
La PCC cataliza la conversión de la propionil CoA a metilmalonil CoA, en la vía catabólica de los ácidos grasos de cadena impar, de los aminoácidos isoleucina, treonina, metionina y valina y del colesterol [25]. En

esta forma estos compuestos ingresan al ciclo de los ácidos tricarbóxicos vía succinil CoA. Ha sido aislada y purificada a partir de mitocondrias de riñón de res y de hígado humano. Es un tetrámero compuesto por dos subunidades no idénticas; la que tiene el peso molecular más elevado es la que tiene la molécula de biotina.

La MCC cataliza la conversión de la β -metilcrotonil-CoA a β -metilglutaconil-CoA, en la vía degradativa de leucina. La MCC está compuesta de dos subunidades no idénticas y al igual que la PCC, la subunidad mayor es la que está unida a la biotina [11].

Biotinilación y liberación de la biotina

Las carboxilasas aquí arriba descritas son sintetizadas como apocarboxilasas, que carecen de actividad enzimática. Cada enzima es activa sólo cuando se encuentra unida covalentemente a la biotina y entonces es llamada holocarboxilasa. Este proceso llamado biotinilación requiere de una enzima que una la biotina a la apocarboxilasa y es conocida como holocarboxilasa sintetasa. Su mecanismo de reacción es el siguiente:



En el primer paso se lleva a cabo la formación de un intermediario de alta energía a partir de biotina, ATP y Mg^{+2} y después la transferencia del grupo biotinilo a la apocarboxilasa formando la holocarboxilasa [26].

Parece existir una sola holocarboxilasa sintetasa para todas las carboxilasas. Chiang y Mistry [27] fueron los primeros en demostrar que la sintetasa localizada en el citosol puede activar tanto a la apopiruvato carboxilasa (enzima mitocondrial) como a la apoacetil CoA carboxilasa (enzima citosólica), sugiriendo que quizá pueda activar a todas las apocarboxilasas. Posteriormente se observó que en humanos, un defecto genético en la sintetasa resulta en deficiencia de todas las carboxilasas [28].

La biotinidasa (biotina-amida aminohidrolasa) es la enzima que cataliza la hidrólisis del producto de degradación de las carboxilasas llamado biocitina (épsilon-n-biotinil-lisina); los productos de esta reacción son biotina y lisina. La biotina liberada de la biocitina es reutilizada por el organismo (Fig. 6). Además, la biotinidasa participa en el aprovechamiento de la biotina proveniente de la dieta que, como se señaló anteriormente, en su mayor parte se encuentra unida a proteínas. Esta enzima fue descubierta en hígado de cerdo por Thomas y Peterson en 1954 [29]. En el mismo año Wright [30] describió una enzima en plasma sanguíneo humano que hidrolizaba la biocitina y en 1963, Koivusalo y colaboradores purificaron la biotinidasa de *Streptococcus faecalis* [31]. Más recientemente la biotinidasa ha sido purificada del plasma y suero humano, que es en donde se encuentra en mayor cantidad [32,33]. La biotinidasa es una glicoproteína que contiene residuos de ácido siálico [33].

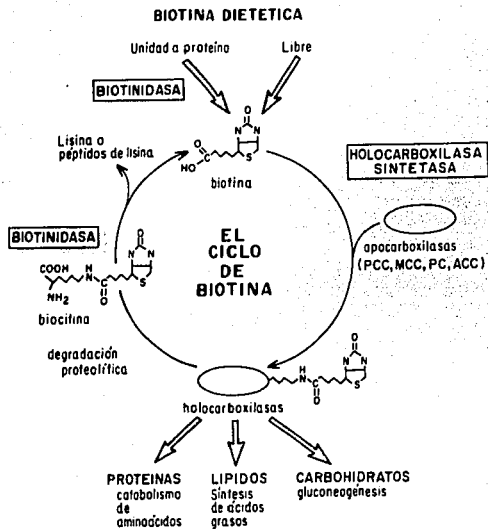


FIGURA 6
EL CICLO DE BIOTINA

DEFICIENCIA DE BIOTINA

Se han descrito casos aislados de deficiencia de biotina, a saber:

- 1) Asociados a la ingesta de grandes cantidades de clara de huevo, la cual contiene avidina;
- 2) En humanos sometidos a alimentación parenteral total por tiempo prolongado;
- 3) Humanos en hemodiálisis crónica [34], y
- 4) En personas afectadas por algunos errores innatos del metabolismo [35-37].

Cuando hay carencia de esta vitamina se establece una deficiencia múltiple de carboxilasas (DMC), resultando bloqueos en la gluconeogénesis, anaplerosis del ciclo de Krebs, de la síntesis y elongación de los ácidos grasos y el catabolismo de varios aminoácidos y lípidos. Todos estos complejos trastornos metabólicos ocasionan manifestaciones clínicas graves que pueden llevar a la muerte. Estas manifestaciones clínicas incluyen: dermatitis periorificial, conjuntivitis, alopecia, irritabilidad o letargia, ataxia, inmunodeficiencia y retraso en el crecimiento y desarrollo, además de crisis convulsivas y acidosis metabólica [35].

En el caso de humanos con deficiencia múltiple de carboxilasas determinada genéticamente, se han descubierto dos clases de mutaciones: [36] en el gen de la holocarboxilasa sintetasa y en el de la biotinidasa. Estas mutaciones muestran una correlación del cuadro clínico según la edad en que se inicia: en la primera, cerca del nacimiento, con cuadro muy agudo y

grave, y de aparición más tardía y curso más crónico en la segunda [28,39-41]. Los pacientes con deficiencia de biotinidasa no son capaces de reciclar la biotina endógena y degradar completamente las holocarboxilasas, acumulándose la biocitina [41]. La sintomatología es muy similar a la que se observa en la deficiencia nutricional de biotina. En la deficiencia de holocarboxilasa sintetasa, de aparición generalmente neonatal, lo que predomina es una grave acidosis metabólica, rápido deterioro neurológico y frecuentemente la muerte en unos pocos días. Ambos tipos de DMC responden satisfactoriamente a la administración de grandes cantidades de biotina oral, con lo que desaparecen los síntomas clínicos. Se han descrito también deficiencias aisladas de cada una de las carboxilasas y para cada caso existen síntomas específicos [36].

HIPOTESIS

Algunos de los pacientes con desnutrición energético-proteica de tercer grado presentan ciertas alteraciones clínicas y bioquímicas que son debidas a deficiencia de biotina.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Comprender el significado de la deficiencia de biotina en la desnutrición energético-proteica (DEP) de tercer grado.

Objetivos Específicos:

- 1) Determinar el estado de la biotina en los desnutridos de tercer grado, mediante la medición de carboxilasas linfocitarias y de la biotina plasmática.
- 2) Determinar si la adición de biotina al tratamiento convencional de la DEP acelera la desaparición de algunas de las alteraciones clínicas y bioquímicas que presenten los pacientes.

JUSTIFICACION

La desnutrición energético proteínica es un importante problema de salud pública y si bien las deficiencias vitamínicas son muy frecuentes, su efecto en los trastornos metabólicos y en el curso clínico de los desnutridos no ha sido tan bien dilucidado como el de la carencia de energía y proteínas [2]. De entre las distintas vitaminas, la menos conocida es la **biotina**, a pesar de su participación destacada en el metabolismo intermediario, probablemente porque su deficiencia aislada es muy rara en humanos [3].

En un estudio preliminar se encontró evidencia sugestiva de deficiencia de biotina en algunos niños con desnutrición energético-proteínica [42]: sus niveles plasmáticos de esta vitamina eran subnormales y además la actividad de las carboxilasas mitocondriales en sus linfocitos estaba deficiente. Dado que algunas de las características clínicas de los desnutridos presentan similitud con las que se observan en enfermos con errores innatos del metabolismo de la biotina se propuso que en la desnutrición se presenta una fenocopia éstos. Wolff ha propuesto una participación de la deficiencia de biotina para la diferenciación de la desnutrición en sus variedades clínicas de kwashiorkor y marasmo [43].

En el presente trabajo se muestran las observaciones en tres variedades clínicas de DEP, se investigó el efecto de la suplementación con biotina sobre las carboxilasas linfocitarias de piruvato y de propionil coenzima A en niños con DEP grave, para conocer el estado de la vitamina y algunas de las implicaciones metabólicas y clínicas de su deficiencia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Selección de Pacientes

Población objetivo

Se estudiaron a 22 niños del Instituto Nacional de Pediatría con desnutrición energético-proteínica de tercer grado: 5 con kwashiorkor y 10 con marasmo, de acuerdo a la clasificación de la comisión Wellcome [44]. Los otros siete pacientes fueron clasificados como "sugar babies" [10], definidos así por tener un peso corporal del 60-80% del normal para la edad, edema, persistencia del panículo adiposo, y cambios mínimos en la piel y cabello. Los controles normales fueron niños básicamente sanos de edades similares a las de estos pacientes, con peso y talla dentro de los percentuales 5 a 95 para su edad, a quienes se les tomó sangre para estudios previos a cirugía electiva por problemas menores (ej. reparación de paladar hendido). Previamente los padres de los pacientes otorgaron su consentimiento informado.

Criterios de Inclusión

Desnutridos de tercer grado en cualquiera de las tres variedades clínicas: Marasmo, Kwashiorkor o "Sugar baby".

Criterios de Exclusión

Transfusión de sangre total los 4 meses previos al ingreso; condiciones clínicas que no permitan obtener la cantidad mínima necesaria de la muestra sanguínea.

Criterios de Eliminación

Se eliminaron del estudio los niños a los que por error se les dió un tratamiento diferente al que les correspondía según el protocolo y aquellos a los que se les transfundió paquete globular. También se eliminaron a los que fallecieron antes de haber obtenido la segunda muestra de sangre, a los 15 días de su ingreso al protocolo.

Diseño experimental

Todos los pacientes recibieron el tratamiento habitual de la desnutrición (*vide infra*); la mitad de ellos recibieron el suplemento de biotina (Laboratorios Grossman, México) y la otra mitad, un placebo, efectuándose el estudio en forma "doble ciego". Se prepararon conjuntos de frascos, un conjunto para cada enfermo con un frasco para cada día de tratamiento. Dentro de cada variedad clínica de desnutrición, (kwashiorkor, marasmo, *sugar babies*) los conjuntos se numeraron progresivamente y se administraron a los pacientes en el orden consecutivo de su ingreso al estudio. El contenido de cada conjunto de frascos correspondió en forma aleatoria al suplemento de biotina o al placebo.

La dosis de biotina fué de 10 mg/día, la cual puede compararse con la ingestión recomendada (RDA) por la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos (NRC-NAS) para niños que es de 50 µg para esta vitamina [3]. Esta dosis de 10 mg/día, aunque considerablemente alta, ha mostrado ser efectiva para lograr una desaparición rápida, en término de días, de las manifestaciones de deficiencia de biotina en neonatos y niños con carencia de esta vitamina debida a deficiencia genética de biotinidasa o a nutrición parenteral total prolongada sin biotina [45]. A pesar de ser tan alta la dosis, en ningún caso se han observado efectos colaterales indeseables o manifestaciones de toxicidad, por lo que se considera inocua [46].

El tratamiento habitual de la DEP, una vez que se ha restablecido el equilibrio hidro-electrolítico, consiste en la administración de soluciones parenterales durante el tiempo requerido para iniciar la tolerancia a la vía oral y en el momento en que ésta existe se indica una fórmula preparada con caseinato de calcio, glucosa, aceite de maíz y KCl (esta fórmula no contiene biotina adicional); cantidades crecientes de leche en polvo (iniciando con 8 gr. por 100 ml de fórmula) se agregan tan pronto como son toleradas, usualmente dos días después del ingreso del paciente al hospital. Esta alimentación proporciona una cantidad de biotina por debajo de la RDA durante las primeras dos semanas, ya que la leche de vaca contiene aproximadamente un promedio de 3.2 µg por dl [3]. Posteriormente se agrega dieta complementaria, según los requerimientos calóricos de los pacientes.

La suplementación con biotina o placebo por vía intravenosa se

La suplementación con biotina o placebo por vía intravenosa se administró durante el tiempo que se mantuvo una vena canalizada, posteriormente se continuó con el suplemento por vía oral a la misma dosis de 10 mg/día.

El estudio se inició tres a cinco días después de que los pacientes ingresaron al Instituto Nacional de Pediatría, una vez estabilizados hemodinámicamente y recuperados de la enfermedad intercurrente (gastroenteritis, bronconeumonía, infección urinaria, etc.) que agravó su estado y motivó su internamiento. En este lapso, sin embargo, la gravedad de la desnutrición no se había modificado sensiblemente. Se obtuvo el consentimiento informado de los padres o tutores, la historia clínica y dietética, examen físico y pruebas de laboratorio de rutina que se realizaron en el Instituto Nacional de Pediatría (biometría hemática, química sanguínea, electrolitos séricos, albúmina, examen general de orina, coprocultivo y estudios coproparasitológicos). Se midieron el peso corporal, la talla y el perímetro cefálico con la metodología de Jelliffe [47]. Se usaron los valores normales de referencia para niños mexicanos, publicadas por Ramos Galván [48]. Se registró fotográficamente la presencia de dermatitis eritemato-escamosa y si su distribución era o no predominantemente periorificial. Aunque esta dermatitis puede estar asociada a otras deficiencias nutricias, es la manifestación clínica más característica de la deficiencia aislada de biotina y responde en forma muy rápida a la administración de esta vitamina [3,35,45,49]. Una misma persona practicó las evaluaciones clínicas y antropométricas. Las muestras de sangre para las determinaciones de

Extracción de plasma y aislamiento de linfocitos a partir de sangre completa.

Los linfocitos se aislaron a partir de 3 ml de sangre venosa, la cual se colocó en tubos de centrifuga de 15 ml con 380 μ l de anticoagulante (ACD), mezclándose suavemente.

La muestra se centrifugó durante 10 minutos a 1700 x g, al término de esta se retiró el plasma, el cual se congeló en alícuotas para posteriores determinaciones de biotina y albúmina. Al paquete globular que quedó en el tubo se le adicionaron 45 ml de TBS a temperatura ambiente, evitando producir hemólisis. En tubos de centrifuga de 15 ml se colocaron 4 ml de Ficoll-Hypaque F400 y sobre él se agregó lentamente la sangre diluida, evitándose la mezcla. Al terminar de agregar la mezcla, se observaron dos fases: la inferior incolora (Ficoll-Hypaque) y la superior roja (sangre). Se centrifugó durante 30 minutos a 700 x g. Al término de la centrifugación, se observaron en los tubos 4 fases, que en orden descendente fueron: TBS, linfocitos, Ficoll-Hypaque y eritrocitos.

Posteriormente con una pipeta pasteur se retiró y desechó el TBS, hasta aproximadamente 0.5 cm de la banda opaca de linfocitos, la cual se colectó y se transfirió a un tubo de centrifuga de 15 ml y se le agregó 10 ml de TBS, se mezcló suavemente y se centrifugó a 1700 x g con el fin de concentrar en el fondo los linfocitos, retirando después el sobrenadante, decantándolo y dejándolo escurrir 5 minutos sobre papel secante. Una vez retirado el sobrenadante, se adicionaron 300 μ l de agua helada para producir un choque hipotónico e hipotérmico y de esta manera lisar los

decántandolo y dejándolo escurrir 5 minutos sobre papel secante. Una vez retirado el sobrenadante, se adicionaron 300 µl de agua helada para producir un choque hipotónico e hipotérmico y de esta manera lisar los eritrocitos remanentes, agitándose en vortex durante 30 seg. Se agregó 10 ml de TBS para seguir lavando y se centrifugó a 1700 g durante 10 minutos.

Una vez retirado el sobrenadante se recuperaron los linfocitos, colocándolos en tubos eppendorf, centrifugándolos nuevamente. El sobrenadante se desechó y las paredes del tubo se secaron posteriormente con la boca del mismo hacia abajo. Los linfocitos se congelaron a -70°C en el ultracongelador Revco hasta el día del ensayo enzimático.

Determinación de la concentración de biotina plasmática.

Se determinaron las concentraciones de biotina en plasma por un ensayo de dilución isotópica desarrollado en la Unidad de Genética de la Nutrición, que se fundamenta en la competencia entre biotina radiactiva y no radiactiva ("fría") por su unión a la avidina.

En síntesis, el método consiste en extraer la biotina libre de la muestra plasmática (generalmente 1mL) con 4 volúmenes de etanol, mezclado y centrifugado a 1500 x g por 10 minutos. El sobrenadante se evaporó hasta sequedad en un evaporador rotatorio (Savant, Framingdale, NY). El extracto seco se resuspendió en un volumen de amortiguador del ensayo (ver adelante) equivalente al del plasma extraído. El amortiguador del ensayo (TBE, pH 7.4) contiene 44.5 milimoles por litro de Tris(hidoximetil)aminometano-HCl, 44.5 milimoles por litro de ácido bórico y 1 milimol por litro de EDTA. Se ajustó el volumen total a 210 µL con

agregaron 10 μ L de avidina 16 nM y se incubó a 6°C por 24 horas. Para separar la biotina radiactiva libre de la unida a avidina, se utilizó un anticuerpo anti-avidina unido a Sepharosa después de una nueva incubación bajo las mismas condiciones. Los resultados fueron obtenidos a partir de una curva estándar en papel logit-log (0-320 pg), después de medir la radioactividad en el sobrenadante. El coeficiente de variación (C.V.) intra-ensayo fue menor al 5% y el C.V. inter-ensayo fue menor al 10%.

Determinación de la actividad enzimática de las carboxilasas de piruvato y de propionil CoA.

La actividad de las carboxilasas de piruvato y de propionil CoA se midió con el método reportado por Sweetman [39], por el cual se determina la incorporación de radiactividad proveniente de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ al sustrato de la enzima en estudio. De este modo, al actuar la PCC sobre la propionil CoA el producto será ^{14}C -metilmalonil 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 -citríco por intervención de la citrato sintetasa añadida a la mezcla de reacción. El producto radiactivo es cuantificado en un contador de centelleo líquido, mientras que el bicarbonato radiactivo que no reaccionó es eliminado como $^{14}\text{CO}_2$.

La actividad específica de estas enzimas se reportó en relación a la cantidad de proteína medida por el método de Lowry [50].

Indicadores de la investigación

Al ingreso se establecieron los déficits de peso/edad, peso/talla y talla/edad, los valores de hemoglobina, albúmina, leucocitos y linfocitos totales y se compararon sus determinaciones entre el grupo que recibió biotina y el que recibió el placebo para evaluar su estado de nutrición y permitir establecer el grado de similitud entre ambos grupos.

La respuesta de los indicadores del estado de la biotina que utilizamos (concentración de biotina, actividades de carboxilasas) fué determinada dividiendo el valor final (después de 15 días del inicio del estudio) entre el inicial (al principio del estudio); a este cociente le llamamos Índice de Respuesta.

Consideraciones éticas y carta de consentimiento.

El protocolo de investigación fue aprobado por los Comités de Investigación y de Ética del Instituto Nacional de Pediatría (INP), en la siguiente página se aprecia la carta de consentimiento informado que se presentó a los padres o tutores de los pacientes.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo _____

(nombre del padre, madre o tutor)

declaro libremente que estoy de acuerdo en que mi hijo (a) participe en esta investigación.

Se me explico que esta investigación consiste en darle a algunos niños enfermos una vitamina llamada biotina, que le falta a los niños desnutridos. Se trata de averiguar si el darles esta sustancia ayuda a que los niños enfermos se recuperen más rápidamente.

También se me dijo que esta sustancia no hace ningún daño y pudiera ser benéfica. A algunos de los niños que participan en este estudio no se les dará esta sustancia. Sólo al terminar el estudio se sabrá si a mi hijo (a) se le dió o no.

Esta explicación se me dió con palabras que pude comprender bien y se me aclararon mis dudas.

Declaro que los investigadores me han ofrecido aclarar cualquier duda o contestar cualquier pregunta que al momento de firmar la presente no hubiese expresado o que surja durante el desarrollo de la investigación.

Se me ha manifestado que puedo retirar mi consentimiento de participación en cualquier momento, sin que ello signifique que la atención médica que se le proporciona a mi hijo (a) se vea afectado por este hecho.

Se me ha informado que el que mi hijo (a) participe en este estudio no repercutirá en el costo de la atención médica que se le debe brindar y que toda la información que se obtenga sobre la identidad y participación de mi hijo será confidencial.

Para los fines que estimen convenientes, firmo la presente junto al investigador que me informó y de un testigo, conservando una copia.

México, D.F. a _____ de 19__.

Investigador: Nombre y Firma _____

Participante: Nombre y Firma _____

Testigo (1): Nombre y Firma _____

Testigo (2): Nombre y Firma _____

Análisis estadístico:

El análisis estadístico de las diferencias entre las variedades clínicas de desnutridos fué realizado mediante el análisis de varianza de una vía por el método de Kruskal-Wallis [51]. Para este análisis y para la realización de correlaciones utilizamos una computadora personal con los paquetes estadísticos para investigación biomédica Tadpole III (Elsevier-Biosoft, Cambrige, U.K.) y Sigma Plot (San Rafael, California, USA).

Los resultados se reportan como promedio \pm ESM (error estándar de la media). En análisis de regresión se seleccionó la ecuación lineal o curvilínea con mayor significancia. Se consideró un valor de p menor a 0.05 como significativo.

RESULTADOS

Valores al ingreso de los pacientes en estudio

Respecto a los valores iniciales, sólo para la PCC se observó diferencia estadísticamente significativa entre los desnutridos y los controles normales; el promedio de la actividad de esta enzima en los pacientes fue de casi la mitad del grupo control (Tabla 1). No se encontraron diferencias significativas entre las tres variedades clínicas de desnutrición tanto para ambas carboxilasas como para la biotina plasmática.

TABLA 1

Carboxilasas linfocitarias y biotina plasmática en niños desnutridos y controles normales*

Variedad clínica	PCC†	PC‡	Biotina (nmol/L)
Marasmo	188.7 ± 26.4 (10)§	21.2 ± 5.2 (10)	1.4 ± 0.6 (8)
Kwashiorkor	144.9 ± 22.8 (5)§	24.3 ± 9.0 (5)	3.6 ± 0.9 (4)
Sugar babies	178.3 ± 29.4 (7)§	21.1 ± 3.5 (7)	4.1 ± 0.8 (6)
Controles Normales	369.4 ± 51.3 (14)	24.6 ± 3.8 (11)	4.0 ± 0.3 (14)

Promedio ± ESM. Número de individuos entre paréntesis.

† PCC: propionil CoA carboxilasa, pmol CO₂ fijadas por min⁻¹ mg proteína¹.

‡ PC: piruvato carboxilasa, pmol CO₂ fijadas por min⁻¹ mg proteína¹

§ Diferencia significativa de los controles normales, p = 0.002.

Dado que la edad de los tres grupos de desnutridos fue diferente, con diferencia significativa ($p = 0.05$) entre el grupo de Kwashiorkor con Marasmos y "Sugar Babies", se practicaron comparaciones adicionales entre cada grupo de desnutridos y un subgrupo de controles de edad similar. Estos resultados no fueron diferentes a los descritos, y se muestran en la tabla 2.

TABLA 2

Carboxilasas linfocitarias y biotina plasmática en niños desnutridos y controles normales, de acuerdo a las edades*

Variedad clínica	Edad (m)	PCC†	PC‡	Biotina (nmol/L)
Marasmo	9.2 ± 1.6	188.7 ± 26.4 (10)§	21.2 ± 5.2 (10)	1.4 ± 0.6 (8)
Kwashiorkor	29.6 ± 4.7	144.9 ± 22.8 (5)§	24.3 ± 9.0 (5)	3.6 ± 0.9 (4)
Sugar babies	13.6 ± 2.6	178.3 ± 29.4 (7)§	21.1 ± 3.5 (7)	4.1 ± 0.8 (6)
Control A ¶	6.9 ± 1.2††	349.7 ± 47.9 (8)	26.5 ± 5.2 (8)	3.5 ± 0.4 (8)
Control B **	33.0 ± 5.0††	395.7 ± 107.0 (6)	22.0 ± 6.1 (6)	4.5 ± 0.6 (6)

* Promedio ± ESM. Número de individuos entre paréntesis.

† PCC: propionil CoA carboxilasa, pmol CO₂ fijadas por min⁻¹ mg proteína¹.

‡ PC: piruvato carboxilasa, pmol CO₂ fijadas por min⁻¹ mg proteína¹.

§ Diferencia significativa de los controles normales, $p = 0.002$.

¶ Control A: Controles normales con rango de edad de 3 a 13 meses.

** Control B: Controles normales con rango de edad de 18 a 45 meses.

†† Diferencia significativa de la edad entre los grupos control, $p = 0.001$.

Los datos principales de cada paciente se describen en la tabla 3; los pacientes se agruparon de acuerdo a la variedad clínica de desnutrición y al tratamiento (suplemento de biotina o placebo) que recibieron. La Tabla 4 muestra los resultados individuales de los controles bien nutridos.

En las gráficas 1, 2 y 3 se muestra la actividad inicial de las carboxilasas de piruvato y propionil CoA, así como de biotina en las diferentes variedades clínicas de desnutrición; como puede observarse, hubo pacientes *individuales* cuyas actividades iniciales de carboxilasas y/o concentraciones de biotina se encontraron claramente debajo de lo normal, seis de ellos (27.3%): M4, M10, M19, K23, K28 y SB60 mostraron actividades de ambas carboxilasas (PC y PCC) por debajo de la más baja encontrada en los controles normales, así como del límite inferior de confianza al 99%. Además, otros siete niños desnutridos (M6, M8, K22, K35, SB55, SB56 y SB57) mostraron actividad subnormal de PCC, aunque la actividad de PC se encontraba dentro de lo normal. Por otra parte, ningún paciente con actividad de PC subnormal tuvo PCC normal.

Seis pacientes mostraron concentraciones subnormales de biotina (M1, M2, M14, M16, M19 y SB60); pero sólo 4 de ellos tenían actividades de carboxilasas normales. Otros tres pacientes con baja actividad de carboxilasas (M4, K23 y K28) tenían concentraciones de biotina normales.

TABLA 3
Datos individuales de los pacientes

Pacientes*	Tratamiento, Momento de la muestra	Sexo	Edad (m)	DMick (%) Peseoedad	Actividad de PCC ¹	Indice de respuesta de PCC §	Actividad de PC ²	Indice de respuesta de PC	Biotina plasmática (mM)	Indice de respuesta de Biotina
M4	Placebo, Inicial	M	11	58	108		5.8		4.7	
	Final				53					
M6	Placebo, Inicial	M	4	57	108		13.0	1.6	0.8	0.5
	Final				53					
M8	Placebo, Inicial	F	4	57	158		11.0	3.5	N.D.	6.8
	Final				55					
M14	Placebo, Inicial	M	11	47	252	1.8	33.0	2.1	1.4	N.D.
	Final				45					
M16	Placebo, Inicial	F	6	53	310	2.0	50.0	1.3	0.8	15.9
	Final				54					
M1	Biotina, Inicial	M	4	51	235	1.2	19.0	0.8	1.3	36.2
	Final				53					
M2	Biotina, Inicial	M	6	51	241	1.0	47.0	1.0	0.2	245.0
	Final				47					
M9	Biotina, Inicial	M	15	42	280	0.9	20.0	2.5	N.D.	N.D.
	Final				34					
M10	Biotina, Inicial	M	18	44	64.0	4.7	7.0	8.3	N.D.	N.D.
	Final				41					
M19	Biotina, Inicial	F	13	56	113.0	4.0	6.0	10.8	0.8	78.3
	Final				55					
KW 22	Placebo, Inicial	M	27	5.7	138.5	1.2	18.6	1.0	3.5	0.8
	Final				6.8					
KW 27	Placebo, Inicial	F	23	+1.7	209.0	3.3	53.1	0.5	N.D.	N.D.
	Final				10.6					
KW 35	Placebo, Inicial	M	33	33.0	155.4	1.1	36.0	1.0	2.2	0.8
	Final				37.0					
KW 23	Biotina, Inicial	M	19	16.2	154.6	2.7	10.3	6.0	2.8	39.4
	Final				15.2					
KW 28	Biotina, Inicial	M	46	24.0	68.9	4.9	3.6	15.9	6.1	18.9
	Final				24.0					
SB 96	Placebo, Inicial	F	11	20.3	117.0	1.6	22.7	1.7	4.9	0.8
	Final				12.3					
SB 57	Placebo, Inicial	M	5	32.6	150.2	1.4	24.2	1.4	N.D.	1.0
	Final				35.6					
SB 59	Placebo, Inicial	M	18	31.0	227.0	1.1	30.7	1.5	4.0	14.1
	Final				25.0					
SB 53	Biotina, Inicial	M	18	20.3	171.0	2.0	12.0	4.3	2.7	18.1
	Final				19.9					
SB 55	Biotina, Inicial	M	24	32.0	154.0	2.3	23.1	2.6	4.8	20.5
	Final				26.0					
SB 56	Biotina, Inicial	F	6	42.5	329.0	1.2	30.0	3.4	6.9	47.4
	Final				40.4					
SB 60	Biotina, Inicial	F	13	34.0	100.2	3.7	5.2	3.6	1.2	148.8
	Final				29.0					

* La lista corresponde a la numeración clínica de asignación: M: masculino; F: femenino; SB: sujeto balanceado.

§ El número representa el porcentaje.

1 Número de la muestra inicial al momento de ingreso final 7 semanas después.

2 PCC: presión CO₂ latente arterial (mmHg) dividido por el volumen minuto (l/min) multiplicado por 100.

3 Índice de Respuesta: Valor porcentual.

4 PC: presión capilar pulmonar arterial (mmHg) dividido por el volumen minuto (l/min) multiplicado por 100.

N.D. No determinado.

TABLA 4**Datos clínicos y bioquímicos de los controles normales**

Sexo	Edad (m)	Diagnóstico	PCC*	PC†	Biotina (nmol/L)	
1	F	3	Comunicación interventricular	331.0	28.9	3.3
2	M	3	Hernia Inguinal	404.0	38.4	5.3
3	F	4	Paladar hendido	288.0	10.9	3.4
4	M	8	Nefropatía por reflujo	386.0	18.2	5.0
5	M	8	Paladar hendido	611.0	19.3	2.2
6	F	8	Reflujo gastroesofágico	393.0	56.3	2.2
7	F	8	Hernia Inguinal	174.0	17.7	3.3
8	M	13	Pie equinovaro	211.0	22.2	3.2
9	F	18	Paladar hendido	846.0	10.5	4.2
10	M	18	Malformación anorectal	161.0	27.6	2.9
11	F	36	Hernia Inguinal	572.0	12.6	6.4
12	M	36	Criptorquidia bilateral	287.0	49.0	4.1
13	M	43	Balanopostitis	290.0	10.2	3.8
14	M	45	Amigdalectomía	218.0	22.2	6.1

* PCC: propionil CoA carboxilasa, pmol CO₂ fijadas por min⁻¹ mg proteína¹.

† PC: piruvato carboxilasa, pmol CO₂ fijadas por min⁻¹ mg proteína¹.

GRAFICAS 1, 2 y 3

Valores individuales iniciales (al ingreso) de niños con marasmo (MAR), kwashiorkor (KW), sugar babies (SB) y controles normales.

Gráficas 1: propionil CoA carboxilasa (PCC), y 2: piruvato carboxilasa (PC); las actividades de las enzimas linfocitarias se expresan como pmoles CO₂ fijadas min⁻¹ mg proteína⁻¹.

Gráfica 3: concentraciones de biotina plasmática (nmol/L). Los números junto a los símbolos identifican a individuos que presentaban actividades de ambas carboxilasas por debajo del límite inferior de los controles normales.

No encontramos correlación entre las concentraciones iniciales de biotina plasmática y las carboxilasas linfocitarias. En la gráfica 4 se muestra que para la PCC y biotina hubo una $r = 0.19$, con $p = 0.46$. Para la PC y biotina la correlación se muestra en la gráfica 5, con $r = 0.29$ y $p = 0.25$.

Por otra parte, las actividades de PC y PCC sí correlacionaron substancialmente encontrando r de 0.79 y $p = 0.001$ (gráfica 6).

Efectos de la suplementación con biotina

Para conocer cuales de estos parámetros reflejan mejor el estado de la biotina, los pacientes fueron sometidos a un estudio doble ciego, en el que al azar, unos recibieron un suplemento de biotina mientras que otros recibieron un placebo.

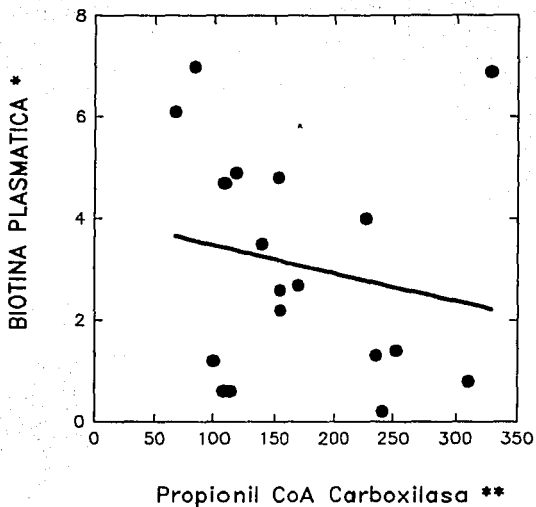
Los dos grupos no mostraron diferencias significativas respecto a los siguientes parámetros: edad, déficits de peso para la edad, peso para la talla y talla para la edad, albúmina en plasma, concentración de hemoglobina y número de leucocitos totales y de linfocitos (Tabla 5).

El grupo que recibió el suplemento de biotina, es por lo tanto, enteramente comparable al que recibió el placebo.

Quince días después, aquellos que recibieron la vitamina mostraron concentraciones plasmáticas mucho más altas que aquellos que recibieron placebo (gráfica 7).

$$r = 0.19$$

$$p = 0.46$$



GRAFICA 4

CORRELACION ENTRE CONCENTRACIONES INICIALES DE
BIOTINA Y PROPIONIL CoA CARBOXILASA

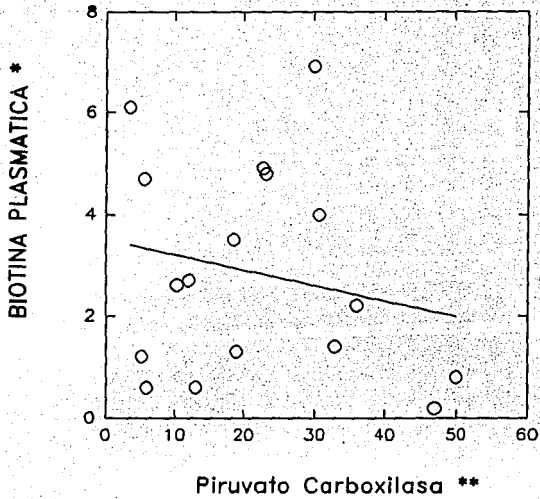
* Biotina plasmática, nmol/L.

** Propionil CoA carboxilasa, pmol CO₂ fijadas por min⁻¹ mg proteína⁻¹.

FALLA DE ORIGEN

$$r = 0.29$$

$$p = 0.25$$



GRAFICA 5

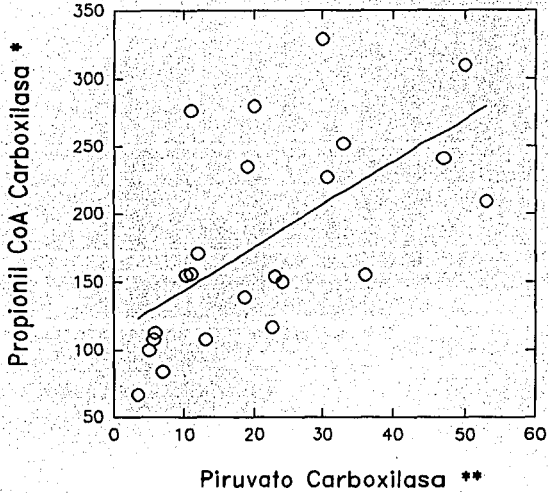
**CORRELACION ENTRE CONCENTRACIONES INICIALES DE
BIOTINA Y PIRUVATO CARBOXILASA**

* Biotina plasmática, nmol/L.

** Piruvato carboxilasa, pmol CO₂ fijadas por min⁻¹ mg proteína¹.

$$r = 0.79$$

$$p = 0.001$$



GRAFICA 6

CORRELACION ENTRE CONCENTRACIONES INICIALES DE CARBOXILASAS DE PROPIONIL CoA Y PIRUVATO

* Propionil CoA carboxilasa, pmol CO₂ fijadas por min⁻¹ mg proteina⁻¹.

** Piruvato carboxilasa, pmol CO₂ fijadas por min⁻¹ mg proteina⁻¹.

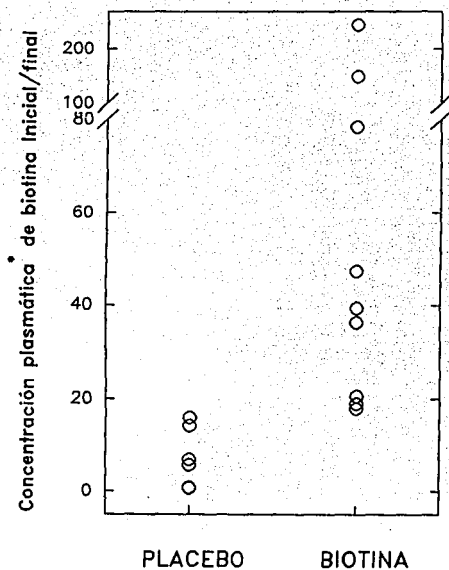
TABLA 5
Datos comparativos de los grupos de pacientes que recibieron biotina o placebo

Pacientes*, tratamiento, momento de la muestra †	Déficit de Peso/edad (%) ‡	Déficit de Talla/edad (%) ‡	Déficit de Peso/talla (%) ‡	Albumina (g/L) ‡	Hemoglobina (mmol/L) ‡	Leucocitos Totales (x 10 ⁹ células/L) ‡	Número de linfocitos (x 10 ⁶ células/L) ‡
M, P, I	54.4 ± 2.0	14.6 ± 2.4	29.4 ± 3.4	28 ± 2	1.43 ± 0.12	9.88 ± 2.07	4.00 ± 0.94
M, P, F	52.0 ± 1.8	12.8 ± 1.5	29.0 ± 3.8				
M, B, I	48.8 ± 2.6	13.0 ± 1.9	29.8 ± 4.7	26 ± 3	1.80 ± 0.31	8.90 ± 1.42	3.99 ± 1.07
M, B, F	46.0 ± 3.9	11.8 ± 1.2	31.4 ± 2.3				
KW, P, I	12.3 ± 10.5	5.5 ± 3.7	6.2 ± 6.7	11 ± 1	1.26 ± 0.12	11.07 ± 3.34	6.33 ± 1.91
KW, P, F	18.1 ± 9.5	4.9 ± 3.6	13.2 ± 4.9				
KW, B, I	20.1 ± 3.9	6.6 ± 1.5	10.6 ± 1.6	15 ± 2	1.43 ± 0.40	6.82 ± 1.75	2.82 ± 0.44
KW, B, F	19.6 ± 4.4	5.2 ± 1.9	11.2 ± 1.4				
SB, P, I	28.0 ± 3.9	9.3 ± 3.3	11.9 ± 2.6	22 ± 3	1.70 ± 0.19	9.72 ± 2.30	5.03 ± 0.95
SB, P, F	24.0 ± 6.7	8.0 ± 4.1	10.1 ± 5.0				
SB, B, I	32.2 ± 4.6	10.3 ± 2.6	13.8 ± 3.0	19 ± 2	1.56 ± 0.05	11.96 ± 3.15	5.11 ± 1.09
SB, B, F	29.3 ± 4.2	10.0 ± 2.3	11.0 ± 2.6				

* Las primeras letras corresponden a la variedad clínica de desnutrición energético-proteínica. M: marasma; K: kwashiorkor; SB: "sugar babies". La segunda letra corresponde al tratamiento. P: placebo, B: biotina.

† Momento de la muestra: I: inicial, al momento del ingreso; F: final, 2 semanas después.

‡ Reportados con promedio ± ESM



GRAFICA 7

**INDICE DE RESPUESTA EN PACIENTES SUPLEMENTADOS
CON BIOTINA O PLACEBO**

* Biotina plasmática, nmol/L.

Sólo aquellos pacientes que mostraron muy baja actividad inicial de carboxilasas y que además recibieron el suplemento con biotina, mostraron un alto índice de respuesta para las enzimas linfocitarias (gráficas 8 y 9). Por ejemplo, este índice fue superior a 3.5 sólo en aquellos desnutridos que recibieron la vitamina y cuyas actividades de PC y PCC fueron menores a 120 y 15 pmoles CO₂ fijadas por minuto y por mg de proteína, respectivamente. En correspondencia, ningún paciente que recibió placebo y tampoco ninguno con carboxilasas dentro del rango normal presentó un índice de respuesta superior a 3.5.

De los 6 pacientes con ambas carboxilasas por debajo del rango normal, cinco (M10, M19, K23, K28 y SB60) recibieron el suplemento de biotina y presentaron un alto índice de respuesta, mientras que M4 fue el único que recibió placebo y su índice de respuesta fue cercano a 1.0. Por otro lado, la respuesta de carboxilasas no mostró relación con la concentración inicial de biotina (gráficas 10 y 11).

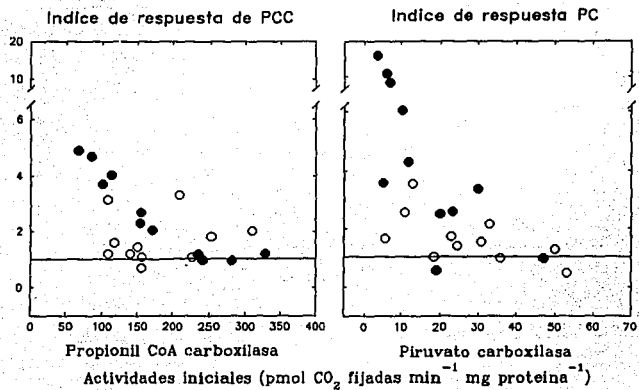
Sólo seis de los niños desnutridos presentaron dermatitis eritematoescamosa periorificial (Anexo I). Tres de ellos (M10, K23, K28) tuvieron actividades de ambas carboxilasas por debajo del rango normal. Los tres recibieron biotina, mostraron altos índices de respuesta de carboxilasas y la dermatitis desapareció dos semanas después de haber ingresado al estudio. Los otros tres con dermatitis mostraron una (M8, K35) o ambas (K27) carboxilasas dentro del rango normal, recibieron placebo y continuaron con las lesiones dérmicas 15 días después. Por otra parte, los 3 pacientes con actividades subnormales de ambas enzimas (M4, M19 y SB60) no

presentaron ninguna manifestación sugestiva de deficiencia de biotina. Se encontraron concentraciones plasmáticas normales de esta vitamina en tres pacientes con dermatitis (K23, K28 y K 35).

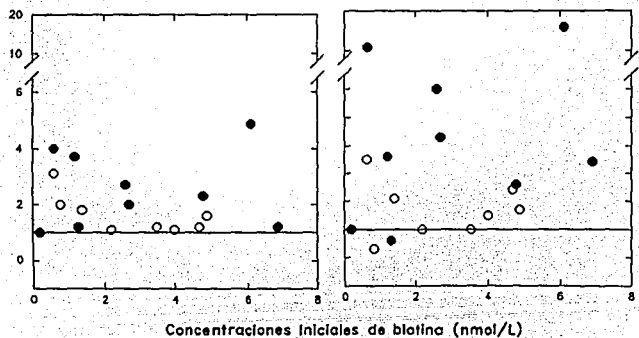
GRAFICAS 8, 9,10 Y 11

Indices de respuesta (actividades de enzimas linfocitarias, final/inicial) a la administración de placebo (o) y suplementación con biotina (10 mg/d) (*), de carboxilasas de propionil CoA (PCC, panel izquierdo, **gráficas 8 y 10**) y piruvato (PC, panel derecho, **gráficas 9 y 11**) de niños desnutridos, en función de las actividades iniciales de las carboxilasas o las concentraciones iniciales de biotina. Valores iniciales: cuando los pacientes fueron admitidos al estudio; valores finales: 2 semanas después de la admisión. La línea horizontal indica que no hay cambio en el valor final comparado con el inicial. (I.R.=1.0).

GRAFICAS 8 Y 9



GRAFICAS 10 Y 11



DISCUSIÓN

En este estudio hemos ampliado las observaciones preliminares [42] acerca las concentraciones plasmáticas de biotina y las actividades de las carboxilasas linfocitarias en niños gravemente desnutridos y se estudió la respuesta de sus carboxilasas a la suplementación con biotina.

Con respecto a los valores iniciales, se demostró diferencia estadísticamente significativa entre los pacientes y los controles normales sólo para PCC (Tabla 1). Sin embargo, algunos pacientes individuales mostraron valores subnormales de la actividad de la PC y/o de la concentración de biotina. Por ello, decidimos centrar nuestro análisis en los resultados individuales.

Casi un tercio de los niños gravemente desnutridos estudiados, sin importar la variedad clínica de desnutrición, presentaron actividad de PC y PCC deficiente (gráficas 1, 2 y 3, Tabla 6). Casi el 60% de los pacientes desnutridos presentaba una actividad linfocitaria de PCC deficiente. Las concentraciones plasmáticas de la biotina se encontraron por abajo del rango normal en 6 de los pacientes (27%), si bien sólo en dos tanto la concentración de la vitamina como la actividad enzimática estuvieron disminuidas.

TABLA 6
Datos de los pacientes y los controles normales respecto al estado de la vitamina

Pacientes*, tratamiento, momento de la muestra †	Sexo M/F	Edad (m) ‡	Actividad § de PCC ¶	Índice de respuesta ‡ de PCC ¶	Actividad § de PC **	Índice de respuesta de PC †	Biotina Plasmática (nmol/L) †	Índice de Respuesta de Biotina †
M, P, I	3/2	11.2 ± 2.7	186.8 ± 40.5		22.6 ± 8.3		1.9 ± 1.0	
M, P, F			331.4 ± 98.4	1.8 ± 0.4	43.5 ± 11.2	2.2 ± 0.4	8.9 ± 2.8	7.2 ± 3.2
M, B, I	4/1	7.2 ± 1.6	190.6 ± 38.6		19.8 ± 7.4		0.7 ± 0.3	
M, B, F			325.4 ± 42.5	2.4 ± 0.8	45.6 ± 9.4	3.3 ± 1.4	32.7 ± 9.4	119.8 ± 63.8
KW, P, I	2/1	27.7 ± 2.9	167.6 ± 21.3		35.9 ± 10.0		2.8 ± 0.6	
KW, P, F			341.6 ± 176.2	1.9 ± 0.7	26.6 ± 4.7	0.8 ± 0.2	9.1 ± 7.0	0.7 ± 0.1
KW, B, I	2/0	30.0 ± 16.0	110.7 ± 43.8		7.0 ± 3.4		4.4 ± 1.8	
KW, B, F			369.0 ± 42.6	3.8 ± 1.1	64.6 ± 2.6	10.9 ± 5.0	109.0 ± 6.0	29.2 ± 10.2
SB, P, I	2/1	11.3 ± 3.8	164.7 ± 32.6		25.9 ± 2.4		4.4 ± 0.4	
SB, P, F			214.7 ± 17.5	1.3 ± 0.2	40.1 ± 3.7	1.4 ± 0.1	30.0 ± 15.4	5.2 ± 4.4
SB, B, I	2/2	15.2 ± 3.8	188.5 ± 49.2		17.8 ± 5.5		3.9 ± 1.2	
SB, B, F			365.7 ± 9.8	2.3 ± 0.5	57.6 ± 19.9	3.5 ± 0.3	162.3 ± 60.8	58.7 ± 30.8
Controles normales	8/6	17.9 ± 4.1	369.4 ± 51.3		24.6 ± 3.8		4.0 ± 0.3	

* Las primeras letras corresponden a la variedad clínica de desnutrición energético-proteínica. M: marasmo; K: kwashiorkor; SB: "sugar babies". La segunda letra corresponde al tratamiento. P: placebo; B: biotina.

† Momento de la muestra: inicial, al momento del ingreso; final, 2 semanas después.

‡ Repetidos con promedio ± ESM.

§ PCC: propionil CoA carboxilasa, pmol CO₂ fijadas por min⁻¹ mg proteína⁻¹.

¶ Índice de Respuesta: Valor inicial / final.

** PC: piruvato carboxilasa, pmol CO₂ fijadas por min⁻¹ mg proteína⁻¹.

Por otra parte, la falta de diferencias significativas entre las variedades clínicas de desnutrición con respecto a la actividad enzimática o a las concentraciones de la vitamina (Tabla 1), está en contra de la hipótesis de Wolff [43] sobre una participación de la deficiencia de biotina en la diferenciación de la desnutrición en kwashiorkor y marasmo.

Los resultados de la suplementación con biotina mostraron un incremento sustancial en la actividad enzimática sólo en aquellos con actividades iniciales de carboxilasas bajas que recibieron el suplemento vitamínico (gráficas 8 y 9). Esto apoya nuestra hipótesis [42] de que algunos niños gravemente desnutridos tienen deficiencia de biotina.

Esta respuesta a la administración de biotina pudiera ser consecuencia de biotinización de apocarboxilasas inactivas por deficiencia del cofactor, ya que las apocarboxilasas de piruvato y propionil CoA se almacenan en el hígado de ratas deficientes de biotina [19, 52-53]. Algunos pacientes del grupo que recibió placebo mostró un incremento sustancial, pero menor al del grupo que recibió biotina, en estos índices de respuesta; este aumento es probablemente resultado simplemente de la rehabilitación nutricional debida al tratamiento convencional de la desnutrición.

La concentración inicial de biotina plasmática no mostró correlación con la respuesta de las carboxilasas a la suplementación de la vitamina. (Tablas 3 y 6). La observación, en apariencia paradójica, de actividades bajas de carboxilasas en algunos pacientes con concentraciones plasmáticas de biotina normales, podría ser explicada por el recambio más

rápido de sustancias de bajo peso molecular en el plasma, que el de las proteínas enzimáticas celulares. Las primeras cambian rápidamente en respuesta a eventos tales como la ingesta reciente de vitamina, como lo muestra el gran aumento de la concentración de biotina en pacientes que recibieron el suplemento de la vitamina en comparación con aquellos que recibieron el placebo, independientemente de su estado original (gráfica 7). Además, el ensayo de unión a avidina mide todas las sustancias presentes en el plasma que se pueden unir a avidina. En vista de la evidencia presentada por Mock [en prensa Am J Clin Nutr 1994], respecto a la presencia de otras sustancias capaces de unirse a avidina (e.g., bisinorbiotina) en cantidades apreciables en plasma de sujetos normales, es de destacar que nuestros "niveles plasmáticos de biotina" pueden no representar únicamente a la biotina *per se*.

Debido a su recambio lento, las carboxilasas reflejarían mejor el estado de la biotina a largo plazo [19,52]. Además, la *cantidad* de la proteína enzimática (apocarboxilasa) pudiera también estar disminuida en la deficiencia de biotina [54], aunque esta hipótesis está actualmente en controversia [55]. También cabe la posibilidad de que la desnutrición energético proteínica, por sí misma, altere la cantidad de proteína enzimática. Las diferencias estadísticamente significativas entre las actividades iniciales de PCC entre los desnutridos y el grupo control (Tabla 1), junto con los resultados individuales mostrados en las gráficas 1 a 3, sugieren además que la PCC es un mejor indicador que la PC del estado de la biotina.

Estos resultados son similares a los reportados en estudios en animales [56] y concuerdan con los del trabajo referido previamente en pacientes adultos con alimentación parenteral total prolongada que no recibieron biotina durante varios meses [46]. No hay datos en la literatura que permitan explicar el porqué la PCC es el indicador más sensible de la deficiencia de biotina; podría estar relacionado, por ejemplo, con posibles diferencias en la velocidad de recambio de las distintas carboxilasas de los linfocitos.

Es probable que la deficiencia de biotina que presentan algunos desnutridos tenga implicaciones metabólicas. En la Unidad de Genética de la Nutrición se ha encontrado una excreción urinaria anormalmente elevada de metabolitos de ácidos orgánicos característicos de esta deficiencia vitamínica en algunos desnutridos [observaciones no publicadas]. Estos metabolitos, evidenciados por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, fueron los ácidos metilcítrico, hidroxipropiónico, 3-hidroxiisovalérico y láctico, los cuales son también anormalmente excretados por pacientes con deficiencia múltiple de carboxilasas de causa genética [57].

Resulta más especulativa una posible relación entre la deficiencia de carboxilasas y la existencia de manifestaciones clínicas, en particular la dermatitis eritemato-escamosa periorificial, en algunos desnutridos [Anexo I] Estas manifestaciones son muy inespecíficas en un trastorno multicarencial como es la desnutrición. En el grupo de pacientes que estudiamos, hubo algunos con esta dermatitis que tuvieron actividades normales de

carboxilasas y vice versa. Llama sin embargo la atención el que en los tres pacientes con deficiencia de ambas carboxilasas y con dermatitis, que recibieron el suplemento de biotina, las lesiones dérmicas desaparecieron más rápidamente que en aquellos afectados de manera similar pero que recibieron el placebo. Esto pudo haber sido simplemente una coincidencia, pero cabe la posibilidad de que, en algunos desnutridos, uno de los pasos limitantes en su homeostasis nutricional esté dado por la deficiencia de esta vitamina y que en ellos esta deficiencia llegue a rebasar el umbral clínico. Si esto se llegase a comprobar en estudios futuros, tendría implicaciones terapéuticas.

BIBLIOGRAFIA

1. Alleyne GAO, Hay RH, Picou DI, Stanfield JP, Whitehead RG. Desnutrición energético proteínica. Londres: Edward Arnold Publishers, 1977.
2. Coward WA, Lunn PG. Biochemistry and physiology of kwashiorkor and marasmus. *Brit Med Bull.* 1981;37:19-24.
3. Friedrich W. Biotina. En: Vitaminas. Berlin: Walter de Gruyter, 1988:753-805.
4. Encuesta Nacional de Alimentación en el medio rural 1989. Resultados preliminares publicados por el Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán en el Boletín Informativo de agosto de 1989.
5. Ramos-Galván R., Mariscal C., Viniegra A., Pérez-Ortiz B., Desnutrición en el niño. Capítulo 1 "Clasificación". México, D.F. 1967. p. 5-17.
6. Bhattacharyya A. K. Protein-energy malnutrition (kwashiorkor-marasmus syndrome): terminology, classification and evolution. *Wd Rev Nutr Diet.* 1986;47:80-133.
7. Mc Laren Donald S., Burmon David. Textbook of paediatric nutrition. En "Protein energy malnutrition (PEM)". Segunda edición. Churchill Livingstone 1982.p. 103-112.
8. Waterlow J.L. Classification and definition of protein energy malnutrition. *Br Med J.* 1972;3:566-569.

9. Ramos Galván R, Mariscal C, Vinegra A, Pérez Ortiz B. Cuadros clínicos de la desnutrición. Desnutrición en el niño. 1969. p. 337-351.
10. Platt B.S. Colonial nutrition and its problems. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 1947;40:379-398.
11. Dakshinamurti K. and Chahuan J. Biotin. *Vitamins and hormones*. 1989; 45:338.
12. Friedrich, W. *Vitamins (Biotin)*. Walter de Gruyter. Berlin. 1988: 753-805.
13. Kogl, F., Tonnis, B. Plant growth substance XX. The bios problem. Isolation of crystalline biotin from egg yolk. *Physiol Chem.* 1936; 242: 43-73.
14. Gyorgy P. The curative factor (vit H) for egg white injury, with particular reference to its presence in diferent foodstuffs and in yeast. *J Biol Chem.* 1939; 131: 733-44.
15. Du Vigeneaud, V. *et al.* On the structure of biotin. *J Am Chem Soc.* 1942; 64: 188-189.
16. Harris, S. and Wolf, D. Synthetic biotin. *Science.* 1943; 97: 447-48.
17. Du Vigeneaud, V. *et al.* Growth stimulating effect of biotin for diphtheria bacillus in absence of pimelic acid. *Science.* 1942; 96: 183-187.
18. Hoffmann, La Roche. *Vitamin Compendium* 1980.

19. Moss, J. and Lane M. The biotin-dependent enzymes. *Adv Enzymol.* 1971; 35: 321-441.
20. Siegel, L. et al. Propionil -CoA holocarboxilase synthesis from biotinyl adenylate and the apocarboxylase in the presence of an activating enzyme. *Biochem Biophys Res Commun.* 1965. 13; 307-312.
21. Bartlett, K. et al Enzyme studies in biotin-responsive disorders. *J Inher Metab Dis.* 1985; 1 (suppl 8): 46-52.
22. Guckhait, R. et al. Acetyl coenzyme A carboxylase. Subunit structure of the protomeric form of the avian liver enzyme. *J Biol Chem.* 1974; 249: 4776-4780.
23. Ballard, F. and Hanson, R. The citrate clavage pathway and lipogenesis in rat adipose tissue: replenishment of oxaloacetate. *J Lipid Res.* 1967; 8: 73-79.
24. Nakano, E. et al. The identification of aserum viability factor for SV3T3 cell as biotin and its possible relationships to the maintenance of krebs cycle activity. *Arch Biochem Biophys.* 1982; 215: 556-563.
25. Rosenberg, L. E. Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. 5th ed., Mc Graw Hill. New York. 1983; 474-479.
26. Achuta, M and Mistry, S. Some aspects of biotin binding to protein catalizaed by biotin deficient chicken liver preparations. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1974: 145; 564-570.

27. Chiang, G. S. and Mistry, S.D. A comparative study of pyruvate holocarboxylase synthesis in rat liver and kidney preparation *Int J Biochem.* 1975;6: 527-531.
28. Saunders, M.E. and Sherwood, W.G. Evidence for a defect of holocarboxylase synthetase activity in cultured lymphoblasts from a patient with biotin-responsive multiple carboxylase deficiency. *J Clin Invest.* 1981; 68: 1491-1495.
29. Thoma, R.W. and Peterson, W.H. The enzymatic degradation of soluble bound biotin. *J Biol Chem.* 1954; 210: 569-579.
30. Wright, L. et al. Biotinidase, an enzyme concerned with hydrolytic cleavage of biocytin. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1954; 86: 335-337.
31. Koivusalo, et al. Bacterial biotinidase. *J Biol Chem.* 1963; 238: 1038-1042.
32. Craft, D.V.; Gross, N.H.; Chandramouli, N.; Wood, H.G. Purification of biotinidase from human plasma and its activity on biotinyl peptides. *Biochem.* 1985; 24: 2471-2476.
33. Chauhan, J.; Dakshinamurti, K. Purification and characterization of human serum biotinidase. *J Biol Chem.* 1986; 261: 4268-4276.
34. Yatsidis, H. et al. Biotin in the management of uremic neurologic disorders. *Nephron.* 1984; 36: 183-185.

35. Baugh CM, Malone JH, Butterworth Jr CE. Human biotin deficiency. *Am J Clin Nutr.* 1968;21:173-182.
36. Nyahan, W. Inborns Error of biotin metabolism. *Arch Dermatol.* 1987; 123: 1696-1698a.
37. Wolf, B. Feldman, G. The biotin dependent carboxylase deficiencies. *Am J Hum Genet.* 1982; 34: 699-716.
38. Sweetman, L. Two forms of biotin responsive multiple carboxylase deficiency. *J Inher Metab Dis.* 1981; 4: 53-54.
39. Burry, B.J.; Sweetman, L.; Nyahan, W. Heterogeneity of holocarboxylase synthetase in patients with biotin-responsive multiple carboxylase deficiency. *Am J Hum Genet.* 1985; 37: 326-337.
40. Wolf, B. Grier, R.E.; Parker, W.D. et al. Biotinidase deficiency: The enzymatic defect in late-onset multiple carboxylase deficiency. *Clin Chem Acta.* 1983; 131: 273-281.
41. Wolf, B. et al Deficient biotinidase activity in late-onset multiple carboxylase deficiency. *N Eng J Med.* 1983; 308: 161-164.
42. Velázquez A, Martín-del-Campo C, Báez A, et al. Biotin deficiency in protein-energy malnutrition. *Eur J Clin Nutr.* 1988;43:169-173.
43. Wolff JA, Margolis S, Bujdoso-Wolff K, Matusick E, Mac Lean Jr WC. Plasma and red blood cell fatty acid composition in children with protein-calorie malnutrition. *Pediatr Res.* 1984; 18: 162-166.

44. Wellcome Trust Working Party. Classification of infantile malnutrition. *Lancet*. 1970;2:302-303.
45. Mock DM, Baswell DL, Baker H, Holman RT, Sweetman L. Biotin deficiency complicating parenteral alimentation: diagnosis, metabolic repercussions and treatment. *Ann NY Acad Sci*. 1985;447:314-333.
46. Nyhan WL. Clinical problems relating to biotin. *Ann NY Acad Sci*. 1985;447:222-224.
47. Jelliffe B. Evaluación del Estado de Nutrición de la Comunidad. Geneva: World Health Organization, 1968. [Monographic series 53:10-101].
48. Ramos Galván. Somatometría Pediátrica (Pediatric somatometry. *Arch Invest Med*. 1975;6(Supl),83-96.
49. Mock DM, Baswell DL, Baker H, Holman RT, Sweetman L. Biotin deficiency complicating parenteral alimentation. *J Pediatr*. 1988;106:762-769.
50. Lowry OH. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265-275.
51. Siegel S. Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences. New York: McGraw-Hill Book Co., 1956:184-193.
52. Dakshinamurti K, Chauhan J. Regulation of biotin enzymes. *Ann Rev Nutr*. 1988: 211-233.

53. Taroni F, Rosenberg LE. The precursor of the biotin-binding subunit of mammalian propionyl-CoA carboxylase can be translocated into mitochondria as apo- or holoprotein. *J Biol Chem.* 1991;266:13267-13271.
54. Bartlett K, Ghneim HK, Stirk JH, Wastell HJ, Sherratt HSA, Leonard JV. Enzyme studies in combined carboxylase deficiency. *Ann NY Acad Sci.* 1985;447:235-251.
55. Shriver BJ, Roman-Shriver C, Allred JB. Depletion and repletion of biotinyl enzymes in liver of biotin-deficient rats: evidence of a biotin storage system. *J Nutr.* 1993;123:1140-1149.
56. Whitehead CC. Assessment of biotin deficiency in animals. *Ann NY Acad Sci.* 1985; 447:86-96.
57. Sweetman L, Nyhan WL, Sakaati NA et al. Organic aciduria in neonatal multiple carboxylase deficiency. *J Inher Metab Dis.* 1982;5:49-53.

ANEXO I
FOTOGRAFIAS CLINICAS

PACIENTE 23

INGRESO



EGRESO



PACIENTE 27

INGRESO



EGRESO

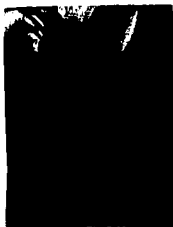


PACIENTE 28

INGRESO



EGRESO



PACIENTE 35

INGRESO



EGRESO

