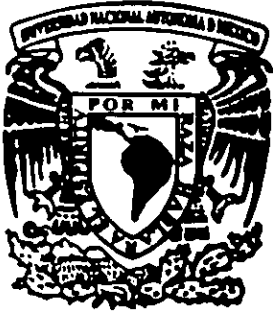


00581

24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**CAMBIOS EN LAS PROPORCIONES DE LOS  
LINFOCITOS DE BAZO Y TIMO CAUSADOS POR  
LA DEFICIENCIA DE BIOTINA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS QUÍMICAS (BIOQUÍMICA)**

**PRESENTA:**

**M. en C. ARMIDA BÁEZ SALDAÑA**

**TUTOR:**

**DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO**

**DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

1998 268250



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

El jurado designado por el Comité Académico para el examen de grado de Doctor en Ciencias Químicas (Bioquímica) es el siguiente:

Presidente:	Dr. Jorge Vázquez Ramos
Primer Vocal:	Dr. Marco Antonio Juárez Oropeza
Segundo Vocal	Dr. Rafael Saavedra Durán
Tercer Vocal:	Dr. Pascal Herión Scohy
Secretario:	Dra. Susana Kofman E.
Primer Suplente:	Dr. Fernando García Tamayo
Segundo Suplente:	Dr. Armando Tovar Palacios

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Enrique Ortega del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

La dirección estuvo a cargo del **DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO**

Los miembros del comité tutorial además del Dr. Ortega fueron:

Dr. Fernando Montiel Aguirre

Dr. Jorge Vázquez Ramos

**El trabajo de esta tesis fue realizado con el financiamiento otorgado por  
CONACYT (3154P-N9607) y DGAPA (IN204696)**

UNA PARTE DE ESTA INVESTIGACIÓN FUE PUBLICADA EN UNA  
REVISTA CIENTÍFICA DE CIRCULACIÓN INTERNACIONAL CON EL  
TÍTULO:

**Biotin deficiency induces changes in subpopulations of spleen  
lymphocytes in mice. Am J Clin Nutr 1998;67:431-7.**

Una copia de este trabajo se puede consultar en el Apéndice A.

## **AGRADECIMIENTOS**

**DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO**

Por su valioso apoyo, por su confianza y de manera muy importante por sus enseñanzas y orientación científica.

**DR. JORGE VÁZQUEZ RAMOS**

**DR. FERNANDO MONTIEL AGUIRRE**

De quienes recibí importantes observaciones científicas y constante estímulo para lograr este objetivo.

**DR. CARLOS LARRALDE RANGEL**

Por otorgarme las facilidades para llevar a cabo este objetivo.

**DRA. AMELIA FARRÉS GONZÁLEZ-SARAVIA**

Por su amable apoyo durante el proceso final de este trabajo.

**M:V:Z: GEORGINA DÍAZ**

Por sus enseñanzas en el experto manejo de los ratones y por la cuidadosa atención que siempre les proporcionó.

**Q.F.B. CLAUDIA GARAY**

Por darme constante apoyo en el laboratorio así como por la organización de éste, haciendo más fácil el trabajo experimental.

**A TODOS LOS COMPAÑEROS DEL BIOTERIO DEL INSTITUTO DE  
INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

Por su excelente servicio y atención a los animales de experimentación.

**A TODOS LOS COMPAÑEROS DE LA BIBLIOTECA DEL INSTITUTO DE  
INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

Por su excelente servicio y constante apoyo.

## **INDICE**

1.- Resumen	pág. 7
2.- Abstract	pág. 9
3.- Introducción	pág. 11
4.- Antecedentes	pág. 16
5.- Objetivos	pág. 33
6.- Materiales y Métodos	pág. 34
7.- Resultados	pág. 46
8.- Discusión	pág. 71
9.- Apéndice A	pág. 80
10.- Apéndice B	pág. 81
11.- Apéndice C	pág. 83
12.- Apéndice D	pág. 84
13.- Bibliografía	pág. 91



## RESUMEN

La biotina es una vitamina que actúa como grupo prostético de enzimas que fijan  $\text{CO}_2$  en diversas reacciones metabólicas. Se puede inducir la deficiencia de biotina en animales de experimentación, cuando se les proporciona una dieta que contiene clara de huevo cruda como única fuente de proteína. En humanos se han descrito dos defectos en el ciclo de aprovechamiento de la biotina que se conocen como Deficiencia Múltiple de Carboxilasas (DMC). Animales de experimentación deficientes de biotina y humanos con DMC, presentan alteraciones en el funcionamiento del Sistema Inmune. La patogénesis del daño inmunológico no se entiende todavía.

En esta investigación se establece un modelo experimental murino que permite profundizar en el estudio del proceso involucrado en la relación que existe entre la deficiencia de biotina y la función del Sistema Inmunitario. Tres grupos de ratones macho Balb/cAnN de 4 semanas de edad recibieron durante 20 semanas, dieta control, depletante de biotina y suplementada con biotina. No se observaron diferencias significativas entre los grupos control y suplementado para ninguno de los parámetros determinados. Desde las dos semanas con dieta depletante de la vitamina, los ratones Balb/cAnN tuvieron una ganancia de peso significativamente menor, en comparación con los ratones de los grupos control y suplementado. Durante las 20 semanas de experimentación, en los ratones deficientes el desarrollo del hígado y las actividades de dos enzimas biotiniladas, - propionil CoA carboxilasa (PCC) y piruvato carboxilasa (PC)-, fueron significativamente menores que en los animales del grupo control. Con respecto al efecto de la deficiencia de biotina sobre el Sistema Inmunitario, los ratones deficientes de biotina en comparación con los ratones con dieta control, tuvieron reducciones estadísticamente significativas en el desarrollo de hígado.

bazo y timo; en la celularidad del bazo, en la proliferación de linfocitos T del bazo inducida por mitógenos, así como alteraciones en las proporciones de las subpoblaciones de linfocitos de bazo y timo.

Estos hallazgos sugieren que la biotina puede tener un efecto importante en la maduración de los linfocitos, así como en la respuesta a diversos estímulos y consecuentemente en la capacidad del Sistema Inmune a responder ante un reto antigénico. Debido a que no se observaron correlaciones directamente proporcionales entre la disminución de la actividad específica de las carboxilasas PCC y PC y los cambios en el peso corporal, desarrollo de hígado, bazo y timo, proporciones de subpoblaciones de linfocitos de bazo y timo y celularidad en el bazo, es posible que estos efectos se lleven a cabo indirectamente por las enzimas biotiniladas, o directamente por la biotina.

## ABSTRACT

Biotin is a water-soluble vitamin of the B complex that serves as a cofactor of four enzymes which fix  $\text{CO}_2$  and participate in various pathways of the cellular metabolism. Biotin deficiency is induced in experimental animals by giving them a diet whose only source of protein is raw egg white. There are two defects in the biotin cycle that have been observed in humans, and both of them are known to cause Multiple Carboxylase Deficiency (MCD). Humans with MCD and biotin-deficient experimental animals have an altered Immune System functioning, but the process that takes place in it is not known yet. For the sake of this study, a murine experimental model was established in order to allow an insight into the process involving biotin deficiency and the Immune System functioning. In the model, three groups of 4 weeks old Balb/cAnN male mice received control, biotin depleted and biotin supplemented diets for 20 weeks. There were no significant differences between mice from the control and supplemented groups for any parameter determined.

In comparison with control and supplemented groups, mice with biotin depleting diet showed a significantly slowed growth rate from the 2<sup>nd</sup> week on. From weeks 3 to 7 the weight remained constant, and from weeks 8 to 20 there was a significantly progressive weight loss. The liver, spleen and thymus of biotin-deficient mice, showed a diminished growth rate weight as compared to the control and supplemented mice. From weeks 4 to 20 the specific activities of two biotin-dependent enzymes -pyruvate carboxylase (PC) and propionyl CoA carboxylase (PCC)- were significantly low in liver, spleen and thymus of the biotin-deficient mice. With respect to the effects of biotin deficiency on the Immune System, statistically significant changes in the total number of spleen cells and in the proportions of spleen and thymus cells carrying different phenotypic markers were observed. Also, the

mitogen-induced proliferation of spleen cells was slower in biotin-deficient mice than in mice on control diet.

These observations suggest that biotin could have an important role in lymphocyte maturation and in responsiveness to stimulation, and consequently in the capacity of the Immune System and its response to an antigenic challenge. A direct correlation between the decrease in specific activities of PCC and PC in the organs studied, and the alterations described (corporal weight; liver, spleen and thymus development; cellularity in the spleen; induced proliferation of spleen lymphocytes, and proportions of subpopulations of spleen and thymus lymphocytes) was not found. Thus, this lack of correlation suggests the possibility that the alterations found could be caused indirectly by biotinilated enzymes or directly by the biotin.

# INTRODUCCIÓN

## INMUNOLOGÍA NUTRICIONAL

Desde tiempos ancestrales se sabe que la salud está directamente relacionada con el estado nutricional. Escritos antiguos de Egipto, India y bíblicos incluyen recomendaciones acerca de los alimentos y la salud (5). Al igual que en muchas otras disciplinas, los conocimientos de la relación nutrición-salud surgieron inicialmente como observaciones aisladas y posteriormente se efectuaron estudios diseñados para aclarar algunos temas en particular. Paralelamente a estas observaciones dispersas, también se ha desarrollado el conocimiento de la función del Sistema Inmunitario así como de otros aspectos de la Biología, los cuales ocasionaron el surgimiento, hace poco menos de 20 años, de la subdisciplina científica que actualmente se conoce como **Inmunología Nutricional** o **Inmunonutrición** (5).

J. F. Menkel es considerado actualmente como el padre de la inmunología nutricional porque fue el científico que, por primera vez, en 1810 correlacionó la desnutrición con la atrofia tímica (6). Según Ranjit Kumar Chandra, esta subdisciplina ha pasado por varias etapas sucesivas, en sus inicios por observaciones anecdóticas y de importancia histórica y recientemente por sofisticadas investigaciones a nivel celular y molecular (7). Es un hecho que millones de personas del tercer mundo, así como miles de pacientes que asisten a los modernos centros de salud porque tienen severas enfermedades, neoplasias o traumas, sufren de lo que se denomina "Síndrome de Deficiencia Inmunológica Nutricionalmente Adquirida" (NAIDS por sus iniciales en inglés: Nutritionally Acquired Immunodeficiency Syndromes) (6).

*Respuestas Inmunológicas en Desnutrición.*- Es claro que las numerosas observaciones del funcionamiento del Sistema Inmunitario que se han hecho en animales o individuos con cuadros de desnutrición grave, son el resultado de la suma de todas las contribuciones y respuestas de los diversos componentes del sistema inmune, los cuales a su vez, se encuentran alterados por la deficiencia simultánea de muchos nutrimentos. En la actualidad se tienen evidencias claras de que el sistema inmune no puede funcionar en condiciones óptimas si está presente la desnutrición; no obstante, se puede decir que son muy pocos los estudios dirigidos a emendar los efectos que causa en el sistema inmunitario la deficiencia puntual de un nutrimento particular (8).

## **VITAMINAS**

Son sustancias orgánicas de bajo peso molecular, constituyentes de la dieta, que actúan esencial y exclusivamente como catalizadores y que el organismo requiere en cantidades muy pequeñas para su desarrollo normal. No son componentes estructurales del cuerpo ni son sintetizadas por él, o tal vez no en cantidad suficiente, por lo que deben ser ingeridas en la dieta o adquiridas de otra forma. La deficiencia de vitaminas produce enfermedad, la que se cura por la administración de las mismas (1).

Es posible que en la actualidad se conozcan todas las vitaminas que los humanos requieren para su desarrollo. Muchos años de experiencia han mostrado que los pacientes que son alimentados por vía totalmente parenteral (es decir que reciben dosis intravenosas de factores nutricionales conocidos), no presentan un desarrollo deficiente ni síntomas de enfermedad por deficiencia de vitaminas (4).

*Absorción Intestinal y Transporte.*- Para la mayoría de las vitaminas se requieren mecanismos especializados de transporte. Para muchas de ellas la absorción intestinal muestra una cinética de saturación y es estereoespecífica, lo cual indica la existencia de acarreadores particulares. Algunas vitaminas son metabolizadas durante la asimilación y otras además se unen a proteínas específicas, como parte de los mecanismos de absorción. A través del intestino, las vitaminas entran a la circulación y por medio de ésta son distribuidas a todo el organismo. Ya en el interior de la célula las vitaminas deben transformarse a su forma biológicamente activa (1).

*Determinación del estado funcional de las vitaminas.*- Durante las primeras tres décadas del siglo XX se utilizaron animales de experimentación para el estudio de la enfermedad por deficiencia de vitaminas, así como para probar los efectos curativos de las preparaciones que las contienen. El protocolo más usado ha sido el curativo, que consiste en suministrar a los animales una dieta completa que sólo carece de la vitamina en estudio. Después de cierto tiempo, se observan los síntomas de deficiencia como: crecimiento reducido, lesiones en la piel y la pérdida de la función de ciertos órganos, entre otros. Posteriormente, se añade la vitamina a la dieta y se observa cómo desaparecen los síntomas de deficiencia, en la medida que éstos sean reversibles.

Los métodos enzimáticos para determinar el estado funcional de una vitamina en los humanos son posibles para aquellas vitaminas que, después de haber sido adecuadamente modificadas, sirven como coenzimas. La deficiencia de la vitamina lleva a una caída de la actividad enzimática, la cual puede ser cuantificada. En el humano, la determinación más confiable del estado funcional de una vitamina no consiste en la medición de la actividad

enzimática absoluta, sino en establecer el cociente  $\alpha$  que resulta de las actividades detectadas antes y después de la administración de la vitamina (3).

Desde el punto de vista clínico y preventivo, la determinación del estado funcional de una vitamina es más importante en aquellos casos en donde hay una deficiencia marginal de ésta, es decir, cuando aún no está presente ningún síntoma clínico en particular. En esta etapa los síntomas inespecíficos que se expresan usualmente son, entre otros, la reducción en la defensa a agentes infecciosos, irritabilidad, somnolencia y pérdida del apetito. En estos casos la deficiencia solamente puede determinarse evaluando la actividad de las enzimas que requieren a la vitamina.

*Ingesta recomendada.*- Los requerimientos de vitaminas por un organismo están siempre sujetos a grandes variaciones ya que, al igual que su metabolismo, depende de diversas influencias y desafíos como enfermedad, etapa de la vida y edad. De aquí que la demanda cuantitativa de las vitaminas sólo puede establecerse como una aproximación que se denota con el término "ingesta recomendada". En los humanos, la ingesta diaria de vitaminas puede calcularse por el contenido de éstas en los alimentos, aunque el resultado debe tomarse con ciertas reservas, puesto que además de las variaciones mencionadas, el aprovechamiento de las mismas es diferente en los diversos componentes dietéticos. Adicionalmente, la determinación analítica del contenido de vitaminas en los alimentos está sujeta a un considerable rango de error.

El suplemento de vitaminas con propósitos terapéuticos se recomienda en situaciones especiales como enfermedad, embarazo, edad avanzada o cuando se usan productos farmacéuticos y drogas. El uso de megadosis de vitaminas se recomienda sólo en tres situaciones: 1) enfermedades congénitas que responden a vitaminas; 2) en caso de



alteraciones en el transporte de vitaminas, como por ejemplo, mala absorción intestinal y 3) para contrarrestar los efectos de antivitaminas tóxicas (4). En general, se considera que grandes cantidades de vitaminas solubles en agua no son tóxicas porque su exceso se elimina en la orina, mientras que se han observado efectos tóxicos con altas dosis de vitaminas liposolubles como A y D.

*Deficiencia de vitaminas.-* Actualmente, en los países económicamente desarrollados los casos clínicos de deficiencia de vitaminas son muy raros, pero en los países del tercer mundo son muy comunes, ya que ésta coincide generalmente con la falta de nutrientes. En general se considera válido, para todas las vitaminas, que los síntomas clínicos de deficiencia son la etapa final de un proceso muy largo.

*Antagonistas.-* Hay sustancias que se consideran como antivitaminas o antagonistas de vitaminas porque su administración produce los mismos síntomas de deficiencia que se observan cuando la vitamina está ausente y porque la administración de la misma revierte los síntomas de deficiencia. De estos antagonistas se conocen dos tipos: los que actúan directamente sobre la vitamina, como por ejemplo la avidina y los análogos estructurales que afectan a la proteína transportadora, o a una enzima dependiente de la vitamina. La aplicación precisa de un antagonista adecuado permite bloquear un paso particular de la reacción dependiente de la vitamina, generando los síntomas específicos de su deficiencia. De aquí que las antivitaminas sean herramientas muy importantes para el estudio de los mecanismos de acción de las vitaminas.

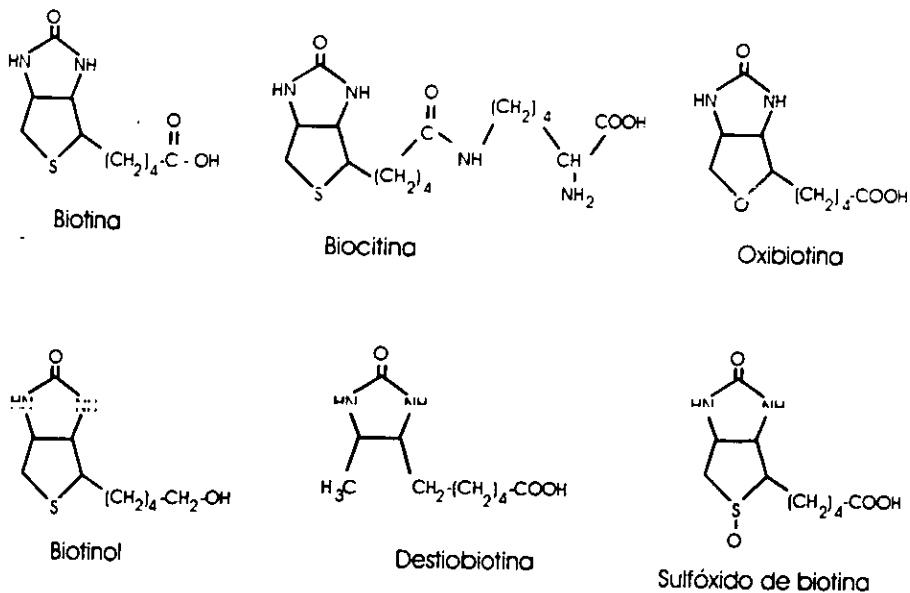
## ANTECEDENTES

### BIOTINA

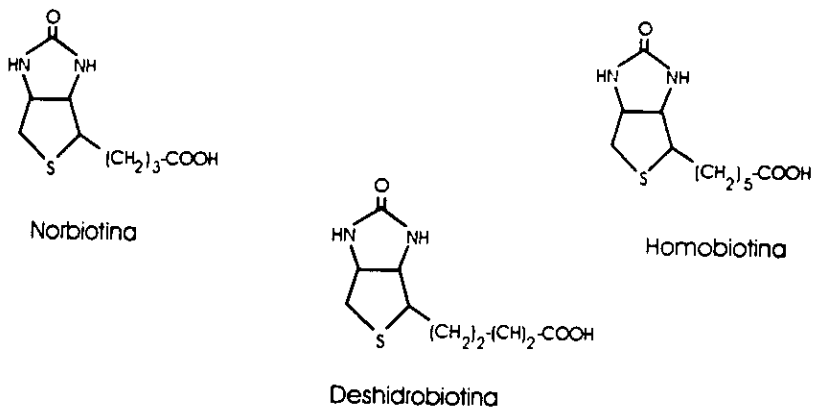
La biotina pertenece al grupo de las vitaminas hidrosolubles del complejo B y está ampliamente distribuida en los alimentos de los mamíferos y aves (9, 23), ya sea en forma libre (en vegetales, leche, frutos, salvado de arroz), o unida a las proteínas a través de un residuo específico de lisina (en tejidos animales, semillas de plantas y levaduras). En 1936, F Kögl y B Tonis identificaron a la biotina como un factor de crecimiento de la levadura (23). La biotina corresponde químicamente al hexahidro-2-oxo-1H-tieno [3,4-*d*]imidazol-4-ácido pentanoico (Fig. 1-a).

El compuesto biotina-lisina es una sustancia natural conocida como biocitina ( $\epsilon$ -N-biotinil-lisina) que también es biológicamente activa en mamíferos (Fig. 1). Algunos análogos de la biotina, como la oxibiotina y el biotinol, pueden sustituirla en la nutrición así como aliviar algunos síntomas de deficiencia en animales, aunque con menor actividad (24). La destiobiotina y el sulfóxido de biotina son análogos activos solamente en ciertas especies microbianas. Los homólogos de la biotina que tienen la cadena lateral más corta o más larga, como la norbiotina y homobiotina, son antagonistas estructurales muy potentes (Fig. 1-b). La  $\alpha$ -deshidrobiotina es uno de los inhibidores más potentes conocidos hasta la fecha. Además de estos antagonistas existen proteínas que se unen a la biotina formando complejos estables que previenen su aprovechamiento por animales y/o microorganismos. Estas proteínas son estreptavidina, estravidina y avidina; las dos primeras son producidas por el

## a) Biotina y sus análogos



## b) Antagonistas de biotina



**FIGURA 1.** Se presentan las fórmulas de: a) Biotina y sus análogos con actividad biológica y b) Antagonistas de la biotina.

microorganismo *Saccharomyces avidinii* y la tercera por las aves (24).

Desde el inicio del presente siglo, se conoce que la clara de huevo contiene un nutrimento tóxico, el cual ha sido identificado como avidina; una glicoproteína con peso molecular de 67 kDa que consiste en una estructura tetramérica de subunidades idénticas, cada una con un sitio de unión a biotina (30). Las modificaciones en el anillo de tiofeno o en la cadena lateral de la biotina no afectan la formación del complejo con la avidina, por lo que tanto la biocitina como la biotina unida a proteínas se unen a la avidina. El complejo es estable en un rango muy amplio de pH y no es degradado en el tracto intestinal, por lo que la ingesta de avidina ha sido utilizada para producir deficiencia de la vitamina en sujetos experimentales, tanto humanos (29) como animales (25, 28).

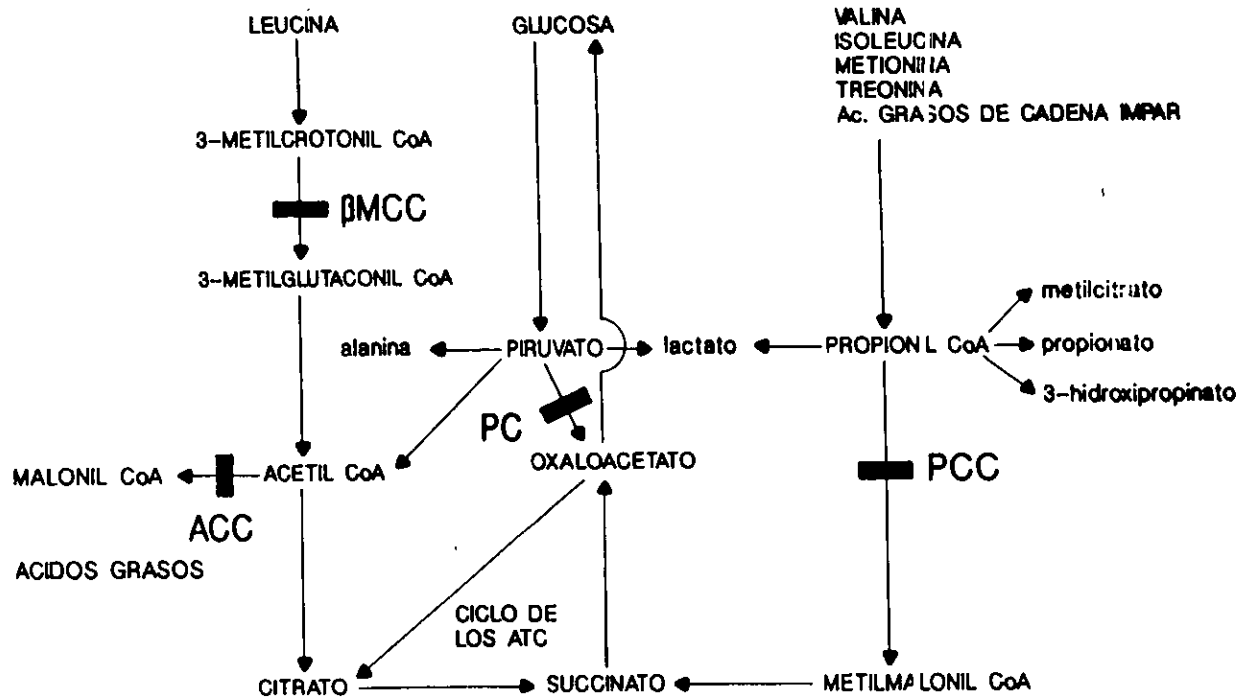
*Función bioquímica.*- A mediados de este siglo el interés por la biotina se enfocó a definir su papel como cofactor para sustentar el crecimiento de microorganismos y a entender su metabolismo y modo de acción en la célula. Los estudios para definir su función se enfrentaron a la dificultad que representa el que la biotina es activa solamente si se encuentra unida covalentemente a su enzima a través de un residuo específico de lisina. Se dedujo la existencia de este tipo de unión porque el grupo de K. Folkers en 1952 logró aislar la biocitina (Fig. 1-a) de los extractos de levadura (43). En la primera mitad de los años 60's se dilucidó que la función específica de la biotina consiste en ser cofactor para los procesos de transferencia de CO<sub>2</sub>, actuando como grupo prostético en las enzimas en las que la región biotilada funciona como acarreador carboxílico móvil (33). Detalles sobre la química de la biotina que incluyen su aislamiento, estructura y propiedades físicas y químicas pueden encontrarse en algunas revisiones publicadas (40-41).

Se conocen nueve enzimas biotiniladas que incluyen seis carboxilasas, una transcarboxilasa y dos descarboxilasas, de las cuales sólo cuatro se han encontrado en células de mamíferos, a saber: Propionil CoA carboxilasa (PCC), Piruvato carboxilasa (PC), Metilmalonil CoA carboxilasa (MCC) y Acetil CoA carboxilasa (ACC); las tres primeras mitocondriales y la cuarta citoplasmática (Fig. 2). Las cinco restantes se han descrito exclusivamente en organismos microbianos (23).

La PC produce oxaloacetato a partir de piruvato, para lo cual requiere acetil-CoA. Ésta es una reacción clave en el proceso de formación de glucosa a partir de precursores que no son carbohidratos. Adicionalmente, tiene una función muy importante en el proceso citoplasmático de lipogénesis, ya que la acetil-CoA, que no es permeable en la membrana mitocondrial y se requiere para la síntesis de ácidos grasos, es condensada en la mitocondria con el oxaloacetato produciendo citrato. El citrato, que sí atraviesa la membrana mitocondrial, pasa al citoplasma en donde se rompe en oxaloacetato y acetil CoA. De esta manera, el oxaloacetato de la mitocondria se está removiendo continuamente por la formación de citrato para la lipogénesis y reponiéndose para la actividad normal del ciclo del ácido cítrico.

La ACC lleva a cabo la primera reacción de la síntesis de ácidos grasos, carboxilando la acetil CoA para formar malonil CoA, la cual es utilizada por el complejo citosólico multienzimático "ácido graso sintetasa" que va a producir palmitato.

La PCC cataliza la formación de metilmalonil CoA a partir de propionil CoA. La metilmalonil CoA después es convertida en succinil CoA, y ésta subsecuentemente sufre una serie de reacciones que terminan con la producción de oxaloacetato y después, glucosa o  $\text{CO}_2$  y agua. De esta manera, el propionato que es producido en los tejidos animales por la



**Figura 2.** Vías metabólicas en las que participan las enzimas biotiniladas. Los bloques rectangulares sólidos indican la localización de las enzimas. PCC = Propionil CoA carboxilasa; β-MCC = β-metilcrotonil CoA carboxilasa; PC = piruvato carboxilasa; ACC = acetil CoA carboxilasa. Se han descrito deficiencias aisladas de las tres primeras enzimas, mientras que la deficiencia de la actividad de la ACC sólo se ha descrito en un caso. Las cuatro enzimas parecen ser insuficientes en la deficiencia de la holocarboxilasa sintetasa y en la deficiencia de biotinidasa. La orina de los niños con deficiencias de carboxilasas aisladas o múltiples tienen concentraciones altas de los metabolitos indicados con minúsculas (34).

oxidación de ácidos grasos de cadena impar, o por la degradación de aminoácidos de cadena ramificada. -isoleucina, valina, metionina y treonina,- se aprovecha tanto para la producción de glucosa como de energía.

La MCC interviene en el catabolismo de la leucina, en donde se forma como intermediario el 3-metilcrotonilo y éste, por la acción de la MCC, se convierte en 3-metilglutaconil CoA, que es hidroxilado y posteriormente fragmentado para producir acetil CoA y acetoacetato.

### **Ciclo de la biotina**

Los mamíferos no pueden sintetizar biotina, de tal forma que la adquieren de los alimentos. Aunque se encuentra ampliamente distribuida en los nutrientes naturales, su concentración absoluta aún en las fuentes más ricas, es muy pequeña en comparación con la de otras vitaminas. El hígado, el riñón, la yema de huevo y algunos vegetales son buenas fuentes de biotina porque contienen entre 20  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  y 120  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ; en cambio los frutos, cereales, pan y carne magra la contienen de 1  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  a 10  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  de alimento (35).

Del total de biotina que se ingiere en la dieta, sólo una porción puede ser utilizada en los procesos metabólicos. Los diversos factores que afectan el aprovechamiento de los alimentos por el órgano blanco son: digestibilidad, absorción y utilidad del nutrimento en la forma apropiada. La ingesta recomendada para la población infantil de Estados Unidos de Norteamérica es de 35  $\mu\text{g}/\text{día}$  y para los adultos de 150 a 300  $\mu\text{g}$  diariamente (36) y se considera que su población ingiere cada día tres a cuatro veces la cantidad recomendada (37). Son escasos los reportes que describen síntomas de deficiencia de biotina en humanos,

causados por el consumo de una dieta pobre en la vitamina y que incluye clara de huevo cruda (10, 26-27).

Durante los últimos 50 años se ha asumido que la microflora intestinal es capaz de sintetizar el total de la biotina que necesita el organismo o bien, suplementar la que se ingiere en la dieta (51). Sin embargo, no se han efectuado estudios confiables que indiquen con precisión cuál es la contribución de la flora intestinal en el suministro de esta vitamina y se tienen algunas evidencias que sugieren que ni la dieta ni la microflora intestinal, por sí solas, pueden satisfacer la demanda de biotina aún para la población normal (2).

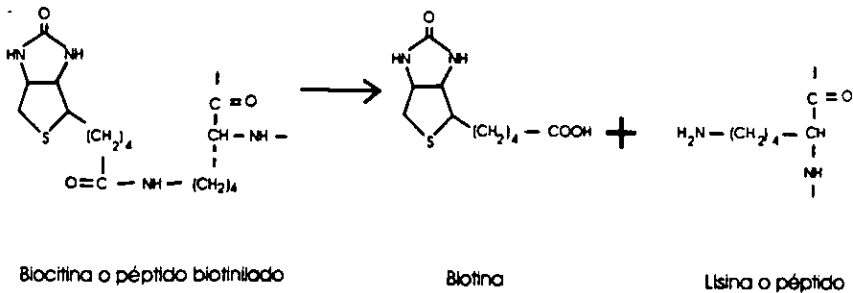
Los ratones de experimentación practican la coprofagia, pero a diferencia de otras especies de roedores que también son coprófagos, parecen necesitar más biotina de la que obtienen por este hábito. Con base en el único estudio que se conoce sobre la necesidad de la biotina por la especie murina, el Instituto Americano de Nutrición recomienda una dieta que contiene 0.2 mg d-biotina/kg (38). Las ratas de laboratorio en condiciones normales no requieren biotina en la dieta porque se considera que la adquieren en cantidades suficientes de los microorganismos en su excremento; sin embargo, el mismo Instituto Americano de Nutrición recomienda que se les proporcione la misma cantidad de biotina que a los ratones (38).

En virtud de que las enzimas proteolíticas no pueden liberar a la biotina, el producto más pequeño de la proteólisis es el compuesto biotina-lisina (biocitina). La biotinidasa es la única enzima que se conoce que puede actuar sobre la biocitina y liberar biotina (Fig.3). Estudios "in vitro" han mostrado que la biotinidasa del plasma humano es más eficiente para la biocitina, su sustrato natural, que para péptidos biotilados. Se considera que esta enzima



puede tener una función muy importante en la digestión y recaptura de la biotina de la dieta de los mamíferos (22).

### Hidrólisis de biocitina y péptidos biotinilados



**Figura 3.** La hidrólisis de biocitina y péptidos biotinilados se lleva a cabo por la biotinidasa.

*Absorción intestinal de la biotina.*- En humanos, este proceso ha sido muy poco estudiado, pero hay muchos reportes sobre la absorción intestinal en numerosas especies de mamíferos empleando diferentes sistemas. Los resultados han sido poco consistentes, ya que se han observado sistemas de transporte mediados y no mediados tanto entre distintas especies como en los diferentes sistemas de órganos usados (39). En el intestino de ratas, conejos, conejillos de indias, carpas y hurones, la biotina no se acumula en contra de gradientes de concentración, mientras que sí lo hace en el intestino de hámsters, ardillas, ratones blancos y ardillas listadas. En estos estudios se usaron concentraciones tanto farmacológicas como fisiológicas de biotina, lo cual puede contribuir a la variación en los resultados obtenidos.

*Transporte y recaptura de biotina.*- La biotina se une inespecíficamente a proteínas del plasma (44) y se ha propuesto también que algunas proteínas, incluyendo a la biotinidasa, unen específicamente a la biotina. Sin embargo, la existencia de estas proteínas no ha sido confirmada y en su caso, se requiere investigar si también tienen alguna función en la regulación de la concentración de biotina en la sangre y otros tejidos (2).

El transporte de biotina se ha estudiado en una gran variedad de sistemas experimentales como células aisladas de hígado de rata, cultivos de células HeLa, ~~fibroblastos~~ fibroblastos humanos, fibroblastos de ratón y hepatocitos de rata, vesículas de membranas de borde estriado y basolaterales preparadas de corteza de riñón de conejo, cerebro de rata perfundido y plexo coroideo de conejo. Los resultados obtenidos con los distintos sistemas han sido variables; por ejemplo, en fibroblastos de ratón la recaptura es sensible a la temperatura y aparentemente controlada por dos procesos, uno saturable y otro mediado por acarreador (2). Además, en hepatocitos aislados de rata los resultados son controvertidos: un reporte concluye que el transporte de biotina depende de ATP, sodio y es mediado por un acarreador (16), mientras que el otro concluye que es dependiente de la temperatura y proporcional a la concentración exógena de biotina, pero independiente del pH y de la concentración de sodio (45). Es probable que estas inconsistencias se deban en parte a diferencias metodológicas, pero independientemente de ellas, parece ser que hay diferencias notables en la absorción intestinal y la recaptura de biotina entre distintas especies y órganos (2).

*Biosíntesis y degradación de enzimas biotiniladas.*- El paso final de la síntesis de las carboxilasas activas consiste en la unión covalente de biotina a residuos específicos en el sitio activo de las apocarboxilasas (Fig. 4). La unión de la biotina a la proteína, es decir, la

formación de la holoenzima a partir de la apoenzima, se lleva a cabo por la holocarboxilasa sintetasa en una reacción que consta de dos etapas. La holoenzima sintetasa es altamente específica para la D-biotina, pero puede actuar sobre distintas apoenzimas, posiblemente porque la secuencia de aminoácidos que rodea a la lisina del sitio de biotilación es conservado en las distintas carboxilasas de las especies estudiadas (42, 70). Estas enzimas poseen la secuencia -Ala-Met-biotina-Met- en el sitio de acarreo del CO<sub>2</sub>, por lo que se piensa que la secuencia -Ala-Met-Lis-Met- puede funcionar como un sitio de reconocimiento para la síntesis. La etapa terminal en la degradación de las carboxilasas es la separación de la biotina del grupo ε-amino de la lisina, la cual se lleva a cabo también por la biotinidasa, pues como arriba se mencionó, es la única enzima conocida que puede efectuar esta reacción.

*Deficiencia Múltiple de Carboxilasas (DMC).*- En el humano se han descrito dos defectos en el ciclo de utilización de la biotina y los dos producen DMC. La deficiencia en la holocarboxilasa sintetasa también conocida como DMC Neonatal o de aparición temprana, consiste en un trastorno en la biotilación y debe su nombre a que los síntomas se presentan poco después del nacimiento. La DMC Juvenil o de aparición tardía, es causada por la deficiencia de biotinidasa, lo que ocasiona un defecto en el reciclamiento de la biotina (2, 13).

Gompertz y cols. identificaron por primera ocasión un error congénito en el metabolismo de biotina, la β-metilcrotonil glicinuria (11). Subsecuentemente, han surgido numerosos reportes describiendo a niños con una o múltiples deficiencias de enzimas dependientes de biotina. En general, los niños con deficiencia en alguna de las carboxilasas no responden al tratamiento oral de biotina, mientras que la mayoría de los individuos con



**Figura 4.-** Se muestra el reciclamiento metabólico de la biotina. Las dos enzimas principales relacionadas con este ciclo son la holocarboxilasa sintetasa (HCS) y la biotinidasa (B'asa). La HCS une covalentemente a la biotina con las diferentes apocarboxilasas para formar las holocarboxilasas. La B'asa es la hidrolasa que libera a la biotina de la biocitina y de pequeños péptidos biotinilados que se formaron en la degradación proteolítica de las holocarboxilasas y de la biotina unida a las proteínas de la dieta.

algún tipo de DMC que se han tratado con biotina han mejorado con la administración de dosis farmacológicas de la vitamina. En los niños afectados, además de los efectos de la falta de esta vitamina sobre el cabello y la piel, y sobre el metabolismo de carbohidratos, aminoácidos y ácidos grasos, se han manifestado también perturbaciones importantes en las funciones del sistema inmune (12).

Hasta ahora se han estudiado a una docena de niños con DMC Neonatal y 80 con DMC Juvenil (2). Sin embargo, actualmente no se puede definir un cuadro clínico característico de estas deficiencias debido a la gran variabilidad observada en la expresión de estos errores del metabolismo, así que el diagnóstico se confirma con la determinación de la actividad específica de la biotinidasa sérica y de las carboxilasas mitocondriales, ya sea en cultivo de fibroblastos y/o en linfocitos de sangre periférica. También se ha visto que en algunos pacientes con DMC Neonatal, el fenotipo no se manifiesta en los fibroblastos de la piel aunque sí se expresa en los linfocitos periféricos (54).

De los pacientes con DMC Juvenil, más de la mitad presentaron infecciones en la piel, una tercera parte conjuntivitis y la cuarta parte infecciones por hongos, patologías que se consideran como resultado de un sistema inmune deprimido. En una familia se diagnosticaron tres niños con deficiencia de biotinidasa. Los tres mostraron dermatitis causada por *Candida* (14). Dos de ellos pudieron ser evaluados inmunológicamente mostrando ausencia de hipersensibilidad retardada en pruebas dérmicas y por pruebas *in vitro* de linfocitos estimulados con *Candida* (14, 46), mientras que el cultivo de linfocitos dio respuesta normal a la fitohemaglutinina. Uno de ellos tuvo hipergamaglobulinemia pero con deficiencia en el isotipo IgA y no produjo anticuerpos al neumococo después de las inmunizaciones correspondientes. El otro presentó una cantidad subnormal de linfocitos T

en sangre periférica. Un tercer niño afectado, que fue estudiado antes del tratamiento con biotina, tuvo proporciones normales de linfocitos periféricos T y B y respondió normalmente a la prueba dérmica con *Candida* (47).

Un paciente con acidemia propiónica (deficiencia de PCC) resistente al tratamiento con biotina, falleció a los 10 meses de edad a pesar de una cuidadosa terapia dietética y después de episodios infecciosos recurrentes acompañados de desórdenes metabólicos. Tuvo repetidas leucopenias, linfopenias, granulopenias y trombopenias. En diversas ocasiones se le identificaron bacterias patógenas en la piel y mucosas y a la edad de 9 meses presentó niveles bajos de IgG y normales para IgM e IgA, títulos normales para la IgM de diversas bacterias, pero no formó anticuerpos para 15 virus comunes (50). Otro paciente tuvo proporciones normales de linfocitos B, concentraciones normales de inmunoglobulinas pero la mitad de la cantidad normal de linfocitos periféricos T. Los leucocitos de este paciente tuvieron una menor actividad microbicida contra *Candida*. Otro niño, mostró un defecto en la actividad *in vitro* de los linfocitos periféricos supresores y baja producción de prostaglandina E<sub>2</sub> (15, 48). Un paciente que ingresó con inmunodeficiencia combinada severa fue tratado con trasplante de médula ósea sin presentar mejoría; posteriormente se diagnosticó con DMC y los síntomas se remitieron cuando se le administró biotina (49). Algunos de estos pacientes presentaron alopecia total y kerato-conjuntivitis, los cuales desaparecieron en aquéllos a los que se les administró biotina (10 mg/día) por vía oral (15).

Los hallazgos de estos reportes son fragmentos anecdóticos incompletos, por lo que se requiere de una evaluación inmunológica sistemática en los niños con algún tipo de DMC para caracterizar mejor la disfunción inmune en este tipo de defectos.

*Deficiencia de biotina en animales de experimentación.*- Desde hace más de 40 años se observó que la deficiencia de biotina produce alteraciones del Sistema Inmune en los animales deficientes de esta vitamina. Ratas macho Sprague-Dawley, inoculadas con toxoide diftérico 4 semanas después de recibir alimento depletante de biotina, tuvieron una respuesta débil de anticuerpos antitoxoide diftérico; el 45% de las ratas deficientes tuvo reacción nula, en cambio el 70% de las ratas controles presentaron reacciones positivas con títulos de 1:6400 hasta 1:12800 (17). La administración intravenosa de  $4 \times 10^8$  eritrocitos de carnero en ratas Holtzman alimentadas por 8-12 semanas con dieta depletante de biotina, produjo un desarrollo de células de bazo sintetizadoras de anticuerpos hemolíticos menor que el observado en las ratas control (18). Este efecto se considera característico de la deficiencia de la vitamina, pues otros estudios han demostrado que las ratas con inanición no tienen alteraciones en las células formadoras de anticuerpos (58). La autoinmunidad inducida experimentalmente es susceptible a la influencia nutricional de la biotina, ya que las ratas Lewis inmunizadas con proteína básica de mielina de cobayo, después de cuatro semanas de recibir dieta deficiente de biotina y con clara huevo, no desarrollaron encefalomiелitis alérgica. (19). Adicionalmente, estas ratas presentaron una respuesta deprimida a la inoculación con eritrocitos de carnero, así como una marcada reducción en la celularidad y tamaño del timo. aunque en el bazo de las ratas suficientes y deficientes, se encontraron cantidades iguales de células T totales y de los subtipos ayudadoras y supresoras (19).

Ratas hembras Sprague-Dawley deficientes de biotina tuvieron disminución en la velocidad de crecimiento corporal, menor peso de timo, bazo y nódulos linfáticos intestinales y mayor concentración de péptidos activos que controlan el patrón de transcripción del DNA, tanto en el timo como en el suero (59-60). Este efecto fue reversible

después de administrarles 200 µg de biotina a las ratas deficientes, en días alternados, durante tres semanas. La cantidad de DNA total en el timo y en el bazo disminuyó por la falta de biotina, mientras que los nódulos linfáticos no tuvieron ningún cambio ante la carencia o suplementación de biotina. (60). Se ha sugerido que la involución del timo no está relacionada con las células que producen los péptidos activos que controlan el patrón de transcripción de DNA, ya que no hay diferencia en la inhibición de la síntesis *in vitro* de RNA, cuando se usa la misma concentración de péptidos extraídos del timo de ratas suficientes o deficientes de biotina. Sin embargo, en el plasma de ratas deficientes, la concentración de estos péptidos activos es ocho veces mayor que en el plasma de las ratas controles y la actividad inhibidora específica de la síntesis *in vitro* de RNA, es mayor en los animales deficientes que en las ratas controles. Estos efectos también fueron reversibles con la administración de biotina (61).

Otro estudio ha mostrado que para la generación *in vitro* de linfocitos T citotóxicos de bazo de ratón, se requiere de biotina en el medio de incubación (20). Este grupo de investigación usó células de peritoneo de ratones DAB/2 como células estimuladoras, células de bazo de ratón C57BL/6 como células de respuesta y como células blanco las células de mastocitoma P-815 marcadas con <sup>56</sup>Cr. La liberación del <sup>56</sup>Cr sirvió para medir la citotoxicidad mediada por células. Este grupo propuso que la biotina pudiera ser un factor esencial en el medio de incubación por su papel como grupo prostético de la ACC, la enzima clave de la lipogénesis. Como la avidina también inhibió la citotoxicidad de células T en el medio suplementado con ácidos grasos y suero fetal bovino y se sabía que las células de mamíferos en cultivo tienen la capacidad de usar los ácidos grasos unidos a la albúmina para la síntesis *de novo* de lípidos estructurales (62), se propuso que la biotina en estas



condiciones funciona como moduladora de la poza de ácidos grasos destinada para la síntesis de lípidos estructurales.

En cobayos hembra, la alimentación durante ocho semanas con dieta depletante de biotina, causó cambios en la cantidad y en las proporciones de los leucocitos circulantes. El número de leucocitos/mm<sup>3</sup> se duplicó en los animales deficientes debido al incremento en la proporción de neutrófilos con la consecuente disminución de los linfocitos B y T. Cuando estos glóbulos blancos se incubaron *in vitro* por 30 min a 37°C con biotina en concentraciones de 82 µM y 409 µM, la capacidad de estas células para formar rosetas aumentó significativamente (21).

En condiciones opuestas a la carencia de biotina, se conocen varios reportes sobre el efecto de la suplementación de biotina a individuos sanos con nutrición adecuada. La administración de biotina a ratas normales (1 mg/rata/día) causó un aumento de peso del bazo y de los nódulos linfáticos intestinales, aunque no modificó el peso del timo ni el peso corporal. En estos animales la administración intraperitoneal de <sup>3</sup>H-timidina, tuvo un aumento en la incorporación de la marca al DNA del bazo y de los nódulos linfáticos, así como mayor velocidad de desaparición de la marca por mg de DNA en el timo y en los nódulos linfáticos (60). La suplementación de biotina a ratas normales aumentó la reactividad inmunológica, favoreciendo mayor producción de hemolisina por la inoculación de eritrocitos de carnero y protegiendo de la infección con *Haemobartonella* a las ratas esplenectomizadas (21). Adicionalmente, aumentó la actividad del Sistema de Fagocitos Mononucleares determinado por medio de la cinética de desaparición del carbón coloidal en el torrente sanguíneo o por la reacción granulomatosa a la inoculación subcutánea de agar en gel. También produjo una mayor fagocitosis de *Staphylococcus epidermidis* por los

neutrófilos de humanos y de ratas, debido al incremento tanto en el índice fagocítico (mayor porcentaje de neutrófilos que englobaron a la bacteria), como en el índice de avidéz (mayor número de bacterias internalizadas por fagocito).

Los linfocitos aislados de sangre periférica de humanos sanos modificaron su capacidad de formar distintos tipo de rosetas con eritrocitos de carnero. después de incubarlos con biotina o con Concanavalina A (ConA) (63). La respuesta es dependiente de las concentraciones y tanto la biotina como la ConA, en las condiciones del ensayo, produjeron un aumento significativo en las rosetas-F de alta afinidad. lo que sugiere un efecto selectivo para algunas subpoblaciones de linfocitos T.

Los hallazgos anteriormente descritos proporcionan evidencias clínicas y experimentales que indican que la deficiencia de biotina tiene efectos significativos en la inmunidad celular y humoral mediada por linfocitos T y B. La patogénesis de la alteración inmunológica en los estados de deficiencia de esta vitamina no se entiende todavía; adicionalmente aún no se sabe cuál vía dependiente de biotina, si es que la hay, es más importante para mantener la inmunidad normal.

## OBJETIVOS

El presente trabajo tiene como propósito general profundizar en el conocimiento de algunas alteraciones en las funciones del Sistema Inmunitario cuando hay carencia de biotina en el organismo y con ello aclarar el posible proceso que las produce.

Los objetivos particulares de este trabajo son:

- a) Establecer un modelo experimental con ratones suficientes y deficientes de biotina.
- b) Determinar en los ratones en estudio algunos indicadores del estado funcional de la biotina. Estos parámetros son: actividad específica de PCC y PC en hígado, bazo y timo y concentración sérica de biotina libre.
- c) Precisar en los ratones suficientes y deficientes de biotina algunos parámetros que sirvan como indicadores directos o indirectos del funcionamiento del Sistema Inmune. a saber: peso de órganos linfoides primarios y secundarios, celularidad en el bazo, índice de proliferación de linfocitos T del el bazo, producción de anticuerpos específicos y proporciones de las subpoblaciones de los linfocitos en bazo y timo.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## Diseño experimental

Los estudios fueron realizados en ratones macho de la cepa BALB/cAnN a los que se les produjo una deficiencia puntual de biotina. En estos ratones se determinó el estado funcional de la biotina midiendo la actividad específica de las carboxilasas PCC y PC en hígado, bazo y timo y se cuantificó la concentración sérica de biotina libre. En cuanto al estudio del Sistema inmune, se midió la proliferación de los linfocitos del bazo inducida por el mitógeno ConA así como la reactivación *in vitro* de las dos carboxilasas monitoreadas. También se evaluaron las proporciones de linfocitos B y T, así como de los subtipos CD4 y CD8 en el bazo y en el timo. Adicionalmente se estudió la amplitud de la respuesta humoral a inmunizaciones con DNP-ovoalbúmina.

## Animales de experimentación

Se utilizaron ratones macho Balb/cAnN proporcionados por el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Se usaron seis lotes de ratones de por lo menos 24 o hasta de 72 individuos, dependiendo de los propósitos establecidos para cada ocasión. Cada lote de animales se dividió en tres grupos experimentales: control, suplementados con biotina y deficientes de biotina. Después del destete (entre tres y cuatro semanas de edad) y hasta por 24 semanas, el grupo control se alimentó con una dieta comercial (Dieta Teklad para ratones en reproducción, Cat. 8626, Harlan Teklad, EUA); los ratones del grupo deficiente recibieron una dieta depletante de biotina, que además de que carece de biotina contiene 30% de clara de huevo desecada como única fuente de proteína (Harlan Teklad,

Cat. TD-81079); finalmente, los animales del grupo suplementado recibieron una dieta igual a la del grupo deficiente a la que se le adicionaron 4 mg de biotina/kg de alimento (Harlan Teklad, Cat. TD-96075). Los ratones se mantuvieron en ciclos de luz y oscuridad de 12 x12 hs. con agua y el alimento respectivo *ad libitum*.

Después de iniciar las dietas correspondientes, a los tiempos indicados se sacrificaron ratones de los tres grupos experimentales y se les extrajeron los tejidos de interés para esta investigación. Cada animal se sangró por el plexo axilar bajo anestesia con éter etílico; la sangre se incubó a temperatura ambiente (TA) por  $30 \pm 10$  min. y el suero se separó por centrifugación durante 10 min. a  $1200 \times g$  a  $20^{\circ}\text{C}$  y se mantuvo congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su análisis. Inmediatamente después del sangrado, el ratón se sacrificó por dislocación cervical y se le extrajeron el bazo, el timo y el hígado. El hígado se congeló inmediatamente a  $-70^{\circ}\text{C}$  y con el bazo y el timo se prepararon suspensiones de células para los estudios subsecuentes.

En el suero se midió la concentración de biotina libre y en los sueros de los ratones sometidos al estudio de producción de anticuerpos específicos, se determinó la concentración de los anti-DNP-OVO.

### **Preparación de soluciones**

Las concentraciones y la forma de preparar las soluciones y reactivos que se usaron para las determinaciones que se describen a continuación, se encuentran especificadas en el

### **Apéndice B.**

## Determinación de biotina libre en el suero

La vitamina se extrajo del suero descongelado mezclándolo vigorosamente con cuatro volúmenes de etanol absoluto; esta mezcla se incubó por 18 h a  $-20^{\circ}\text{C}$  y después se centrifugó durante 10 min a  $1200 \times g$  y  $6^{\circ}\text{C}$ . El extracto etanólico se separó de los sólidos sedimentados y se secó en un evaporador-concentrador con sistema de vacío (Savant Instruments). Los extractos secos se almacenaron a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta el momento del ensayo. Para establecer la eficiencia y recuperación del método de extracción, soluciones con concentración conocida de biotina fría y alícuotas de una mezcla de sueros a las que se les agregaron diferentes cantidades de  $^3\text{H}$ -biotina, se procesaron de la misma manera que los problemas.

*Ensayo de Biotina Libre por Unión Competitiva.*- En el momento de la determinación, los extractos secos se resuspendieron con amortiguador TBE (ver Apéndice 1) en un volumen igual al del suero extraído. En la **Tabla 1** se presenta el protocolo detallado para el ensayo, en el que tanto la curva estándar como los problemas se procesaron por duplicado. El disolvente de las soluciones de biotina fría, biotina radiactiva y avidina fue TBE. Se tomó la alícuota apropiada de los controles de unión inespecífica y unión máxima (tubos 1,2 y 3,4 respectivamente), de las soluciones de biotina fría para la curva estándar y de cada extracto resuspendido y cada una se diluyó hasta el volumen final de  $200 \mu\text{L}$ . A éstos se agregaron  $10 \mu\text{L}$  ( $15000 \text{ dpm}$ ) de solución de  $^3\text{H}$ -biotina (actividad específica  $45 \text{ Ci/mmol}$ ) y  $10 \mu\text{L}$  de solución de avidina (aproximadamente  $16 \text{ pmol/mL}$ , Sigma Chem.). Esta mezcla de reacción se incubó durante  $24 \pm 2 \text{ h}$  a  $4^{\circ}\text{C}$  en un agitador orbital a  $200 \text{ r.p.m.}$  (Orbit Shaker, Lab Line), después se agregaron  $80 \mu\text{L}$  de una suspensión 1:1 de

**TABLA 1.- PROTOCOLO PARA EL ENSAYO DE BIOTINA**

# TUBO	MUESTRA	TBE	Bt <sup>c</sup>	<sup>3</sup> H-Bt	AVIDINA	Ab-AvS
1,2	0 pg (u.i.) <sup>a</sup>	220 µL	-----	10 µL	-----	80 µL
3,4	0 pg (u.máx) <sup>b</sup>	210 µL	-----	10 µL	10 µL	80 µL
5,6	10 pg	200 µL	10 µL D	10 µL	10 µL	80 µL
7,8	20 pg	190 µL	20 µL D	10 µL	10 µL	80 µL
9,10	40 pg	170 µL	40 µL D	10 µL	10 µL	80 µL
11,12	80 pg	130 µL	80 µL D	10 µL	10 µL	80 µL
13,14	160 pg	50 µL	160 µL D	10 µL	10 µL	80 µL
15,16	320 pg	146 µL	64 µL C	10 µL	10 µL	80 µL
17,18	control	10 µL	200 µL	10 µL	10 µL	80 µL
19,20	u.i. control	20 µL	200 µL	10 µL	-----	80 µL
21,22	Problema	10 µL	200 µL	10 µL	10 µL	80 µL
23,24	u.i problema	20 µL	200 µL	10 µL	-----	80 µL

<sup>a</sup> Unión inespecífica; <sup>b</sup> Unión máxima; <sup>c</sup> Solución D = 1 ng biotina/mL, Solución C = 5 ng biotina/mL.

sueros anti-avidina acoplado a Sepharosa-6B (Pharmacia Fine Chemicals) y la incubación continuó por otras  $24 \pm 2$  h a 4°C también con agitación. La mezcla se centrifugó a  $130 \times g$  durante 3 min a 4°C y se tomó la mitad del sobrenadante para medir la cantidad de <sup>3</sup>H-biotina no unida por centelleo líquido en un contador de centelleo β (Beckman, Mod. LS6500).

*Cálculos.*- El porcentaje de <sup>3</sup>H-biotina no unida y unida se calculó considerando que las d.p.m. medidas en los tubos donde no se agregó avidina son el 100% de <sup>3</sup>H-biotina no unida, y por diferencia, 0% de <sup>3</sup>H-biotina unida. Posteriormente se calculó el porcentaje de la unión máxima de <sup>3</sup>H-biotina unida considerando como 100% de unión el porcentaje de

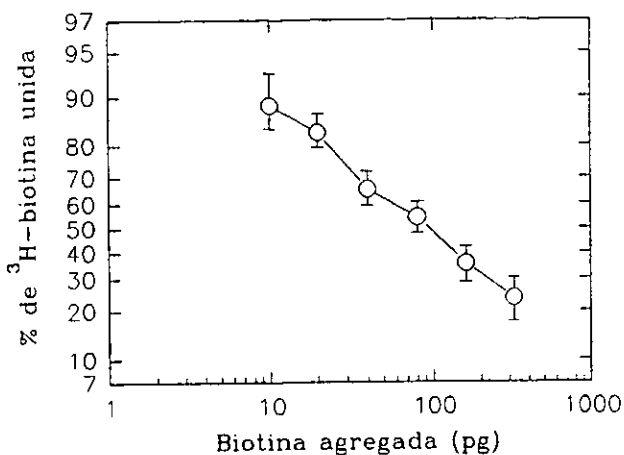
$^3\text{H}$ -biotina unida en los tubos donde no se agregó biotina fría (tubos 3,4; unión máxima). La concentración de biotina en cada suero se calculó interpolando su porcentaje de unión máxima de  $^3\text{H}$ -biotina en una curva estándar trazada en escala logit-log con los porcentajes observados de unión máxima de  $^3\text{H}$ -biotina de soluciones con 10 a 320 pg de biotina. En la **Fig. 5** se presenta una curva estándar típica.

Con cada grupo de sueros en los que se midió la concentración de biotina se efectuó la curva estándar correspondiente. La unión inespecífica de los reactivos fue de 0% a 6% ( $n=25$ ) y la unión máxima se ajustó entre 70% y 85% usando la dilución apropiada de cada lote de avidina (cada lote comercial tiene distinta pureza y por consiguiente distinta actividad específica). En estas condiciones el ensayo puede medir adecuadamente desde 20 hasta 300 pg de biotina por tubo de reacción. El coeficiente de variación (CV) de una combinación de sueros analizada en paralelo en cada ensayo fue de 15%. La eficiencia de la extracción de la vitamina en sueros a los que se les agregaron cantidades conocidas de biotina fue de 96.5%  $\pm$  10% ( $n=20$ ).

### **Determinación de la actividad enzimática de PCC y PC**

La actividad enzimática en los homogenados se determinó por un método radioenzimático (54). Todo el procedimiento para preparar los homogenados se efectuó en baño de hielo. Como el ensayo utiliza bicarbonato radiactivo, todo el procedimiento del ensayo radioenzimático, excepto la incubación en baño María, se efectuó en campana con sistema de extracción de aire. Las mezclas de reacción consistieron en amortiguador Tris-HCl 100 mM pH 8.0, que contiene  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0.5 mM; KCL 50 mM;  $\text{MgCl}_2$  6 mM; Glutación 2.5 mM; ATP 3.3 mM;  $\text{NaHCO}_3$  10 mM y propionil CoA 2.4 mM para la determi-





**FIGURA 5.-** Promedio  $\pm$  DE de la unión máxima de  $^3\text{H}$ -biotina obtenida cuando se agregan 10, 20, 40, 80, 160 y 320 pg de biotina no radiactiva a 15000 dpm. de  $^3\text{H}$ -biotina y 0.16 pmol de avidina.

nación de la PCC; o acetil CoA 0.9 mM, piruvato de sodio 4.5 mM y citrato sintetasa 24 unidades/mL, para la medición de la PC. En los tubos de los blancos de reacción se omitieron las coenzimas correspondientes (propionil CoA y acetil CoA).

Los hígados se descongelaron, se pesaron y se homogenizaron con un pistón de politetrafluoroetileno (Teflón) en siete volúmenes de PBS frío. El homogenado se centrifugó a 1200 x g durante 10 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. Los eritrocitos sedimentados se lisaron con 1 mL de la solución hemolizante por dos minutos y en seguida se añadieron 10 volúmenes de PBS. Después de centrifugar por 10 min a 1200 x g y 4°C. se descartó el sobrenadante. se resuspendieron los hepatocitos y se agregaron ocho volúmenes de PBS frío. Esta suspensión de células se diluyó 1:4 con amortiguador de lisis y las células se rompieron con un homogenizador ultrasónico (Serie 4710; Cole Parmer Instrument Co.) aplicando dos ciclos de 20 pulsos de 1 seg a 24 W. Una alícuota de 10  $\mu\text{L}$  del homogenado sonificado se depositó en tubos para microcentrifuga de 0.5 mL. que contenían 10  $\mu\text{L}$  de la

mezcla de reacción correspondiente. La actividad enzimática se inició incubando los tubos tapados en baño María a 30°C por 30 min y se terminó pasando los tubos a baño de hielo y agregando inmediatamente 10 µL de ácido fórmico al 15%. Después de 15 minutos, los 30 µL de cada tubo se depositaron en tiras de papel Whatmann 3MM de 1.3 cm x 30 cm rayadas con lápiz cada 2.5 cm (se aplicaron 10 muestras por tira); se dejaron secar por 20 min y se terminó de eliminar el bicarbonato radiactivo que no reaccionó, añadiendo en cada punto de aplicación, otros 30 µL de ácido fórmico al 15%. Las tiras se secaron nuevamente por lo menos durante 30 min y ya secas, cada muestra en el papel se recortó en 9 pedazos, se depositaron en un vial de vidrio con 6 mL de solución de centelleo líquido y se contó la radiactividad en un contador de centelleo líquido Beckman LS6500.

La concentración de proteínas en los homogenados se midió por el método de Bradford (55). Alícuotas de 10µL de cada homogenado se depositaron por duplicado en microplacas flexibles no estériles con fondo en U (Costar, Cat. 2797), el volumen se ajustó a 160 µL con amortiguador de lisis y a continuación se agregaron 40 µL de solución de Bradford (BioRad protein assay, Cat. 500-0006). La densidad óptica de esta mezcla se midió a 550 nm en un lector de microplacas (Lector de ELISA BioRad, Mod 3550). La concentración de cada muestra se calculó interpolando su densidad óptica (D.O.) en una curva estándar trazada con las lecturas obtenidas con soluciones conteniendo de 1µg a 16 µg de BSA en amortiguador de lisis.

Para medir la actividad específica de PCC y PC en las células de bazo y timo, los botones almacenados se resuspendieron en 1 mL de amortiguador de lisis/20x10<sup>6</sup> células y se sonicaron igual que como se describe anteriormente para los hepatocitos. Las actividades enzimáticas se determinaron siguiendo el mismo procedimiento (54).

## **Proliferación *in vitro* de células de bazo inducida por Concanavalina-A**

Los ensayos de proliferación de las células de bazo estimuladas con ConA (un mitógeno de células T), se efectuó por el método descrito (53). Todo el procedimiento se llevó a cabo en condiciones de esterilidad y, como diluyente y/o medio de cultivo, se usó el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM por sus iniciales en inglés: Dulbecco's modified Eagle's medium) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) libre de biotina; L-glutamina 2 mM; 100 mg de estreptomicina/L y  $100 \times 10^3$  U penicilina/L. El SFB (GIBCO BRL) depletado de biotina, se preparó incubando 50 ml con 1 ml de avidina acoplada a Sepharosa (Sigma Chem.) por 16 h a 4°C en un agitador orbital a 200 r.p.m. Antes de agregarlo al medio, el suero se centrifugó a  $150 \times g$  por 5 min a 4°C, el sobrenadante se decantó y se esterilizó por filtración a través de un filtro de membrana de  $0.22 \mu\text{m}$  (Millipore Corp.). La concentración de biotina en el SFB antes y después de la incubación con avidina-Sepharosa fue 106 nM y 0.4 nM respectivamente. Debido a que la cromatografía en avidina-Sepharosa ha sido utilizada para purificar carboxilasas de distintas muestras biológicas, las cuales contienen biotina unida covalentemente (56, 57) se consideró que este procedimiento removió la totalidad de la biotina presente en el SFB, tanto libre como unida reversible o covalentemente.

Tres ratones de cada grupo se sacrificaron por dislocación cervical, se les extrajo el bazo el cual se depositó en 5 mL de DMEM suplementado con 10% de SFB libre de biotina como se describió con anterioridad. La suspensión de las células se preparó mediante la presión del tejido con pinzas hasta que se quedó vacía la cápsula fibrosa del órgano (53). De esta suspensión se tomaron las alícuotas necesarias para los estudios de proliferación así como de reactivación *in vitro* de carboxilasas (ver más adelante). Se sembraron 100

$\mu\text{L}$ /pozo de una suspensión que contenía  $2.5 \times 10^5$  células/pozo, se agregaron biotina (en concentraciones de 0, 10 y 800 nM) y ConA (en concentraciones de 0, 1.0 y 5.0 mg/L), ajustando el volumen final a 200  $\mu\text{L}$ /pozo. Cada condición experimental se estudió por triplicado y la proliferación se midió por la incorporación de timidina radiactiva. Después de 48 h de incubación se agregó 0.5  $\mu\text{Ci}$ /pozo de  $^3\text{H}$ -timidina (actividad específica: 6.7 Ci/mmol; cat. NET-027 Dupont NEN Research Products) y se continuó la incubación durante 24 h más. Al final de los dos períodos de incubación, las células se cosecharon sobre papel filtro (Printer Filter-mat A; Pharmacia) con un cosechador automático (Skatron Instruments, Sterling, VA). La radiactividad presente en el papel filtro se cuantificó por centelleo líquido en un Betaplate 1205 (Wallac Oy, Turku, Finland).

### **Reactivación *in vitro* de carboxilasas en células de bazo**

Como se menciona en el apartado anterior, los estudios de reactivación de PCC y PC se efectuaron simultáneamente con los estudios de proliferación celular con ConA. De la misma suspensión de células de bazo en DMEM suplementado se sembraron, en cajas de Petri de plástico de 5 cm de diámetro,  $10 \times 10^6$  células en 5 mL de DMEM suplementado al que se le agregaron biotina en concentraciones 0 y 800 nM y ConA en concentraciones 0 y 5.0 mg/L. Después de 48 h de incubación a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de  $\text{CO}_2$ , las células se cosecharon en tubos cónicos de plástico de 15 mL y se centrifugaron por 5 min a  $400 \times g$  a 4°C; se decantó el sobrenadante, las células se lavaron con 15 mL de PBS y se repitió la centrifugación en las mismas condiciones. Se decantó el PBS y el botón de células seco se almacenó a -70°C hasta el momento de medir la actividad enzimática de las carboxilasas.

## Estudio de la producción de anticuerpos

Cinco ratones de cada uno de los tres grupos experimentales fueron inoculados con 2,4-dinitrofenol-ovoalbúmina (DNP-OVO) según el procedimiento sugerido (64). El esquema de inmunizaciones fue el siguiente:

*Primera inmunización:* 25  $\mu\text{g}$  de DNP-OVO en 100  $\mu\text{L}$  de una emulsión de adyuvante de Freund completo y NaCl 0.15 M (2:1) aplicados subcutáneamente en el lomo de cada ratón.

*Segunda inmunización:* 25  $\mu\text{g}$  de DNP-OVO en 100  $\mu\text{L}$  de una emulsión de adyuvante de Freund incompleto y NaCl 0.15 M (2:1) aplicados subcutáneamente en el lomo de cada ratón.

*Tercera inmunización:* A cada ratón se le aplicaron intraperitonealmente 25  $\mu\text{g}$  de DNP-OVO en 100  $\mu\text{L}$  de NaCl 0.15 M.

El primer estímulo se aplicó cuando los animales tenían cinco semanas con la dieta correspondiente. Las aplicaciones se hicieron a intervalos de tres semanas y 10 días después de la última inyección, de cada ratón se extrajeron por vía ocular y bajo anestesia profunda con éter etílico, aproximadamente 300  $\mu\text{L}$  de sangre periférica. La sangre se incubó a T.A. durante  $30 \pm 15$  min y el suero se separó del paquete globular después de centrifugar la sangre a  $1200 \times g$  y  $20^\circ\text{C}$  por 10 min. El suero se congeló a  $-20^\circ\text{C}$  hasta el momento de determinar la concentración de los anticuerpos específicos para DNP-OVO ( $\alpha\text{DNP-OVO}$ ).

## Determinación de los $\alpha$ DNP séricos

El método utilizado fue un inmunoensayo desarrollado en el laboratorio que se fundamenta en el uso de un inmunoabsorbente ligado a una enzima (ELISA por sus iniciales en inglés, "Enzyme linked immunosorbent assay). La sensibilización de las placas (Costar de alto pegado, Cat. 2797) se hizo por el siguiente procedimiento:

a) Sensibilización de las placas.- En cada pozo se depositaron 200  $\mu$ L de BSA al 0.5% en Tris-HCl 0.125 M, pH 9.5. Después de incubar durante 2 h a 37°C, se lavaron dos veces con 100  $\mu$ L PBS/pozo y una vez con 100  $\mu$ L de amortiguador de boratos/pozo. A continuación se agregaron 100  $\mu$ L/pozo de ácido trinitrobencensulfónico (TNBS) 0.1 M en amortiguador de boratos. En cada placa se destinaron pozos para medir la unión inespecífica en los que se depositaron exclusivamente 100  $\mu$ L del amortiguador de boratos. Después de incubar durante 90 min a 37°C, las placas se lavaron tres veces con 100  $\mu$ L PBS/pozo y por último se incubaron durante  $18 \pm 6$  h a 4°C con BSA al 0.5% en PBS (200  $\mu$ L/pozo).

b) Inmunoensayo.- Después de retirar la solución de albúmina, se depositaron en triplicado 100  $\mu$ L de una dilución 1:20 de los sueros de los ratones en estudio. A partir de esta dilución se hicieron otras subsecuentes en múltiplos de 6 hasta 1:155520. En los pozos destinados a medir la unión inespecífica se depositó el suero en la dilución inicial (1:20). El control positivo utilizado fue un anticuerpo monoclonal específico para el 2,4 DNP-OVO (3B5) y el control negativo fue una mezcla de tres sueros de ratón del mismo lote que nunca se habían inyectado. Después de incubar por tres h a 37°C, las placas se lavaron tres veces con 100  $\mu$ L de PBS/pozo. A continuación se agregaron 100  $\mu$ L de anticuerpo de conejo contra IgG de ratón acoplado a fosfatasa alcalina (Zymed, cat. 61-6522) diluido 1:500 con

BSA al 0.5% en PBS y nuevamente se incubaron a 37°C durante 90 min. Después de lavar las placas tres veces con 100  $\mu$ L de PBS/pozo, se revelaron con 100  $\mu$ L de p-nitrofenil fosfato disódico (1 mg/mL, Sigma Chem.) en amortiguador de dietanolamina, incubando a T.A: hasta observar la aparición de un color amarillo. La reacción se paró agregando 50  $\mu$ L de NaOH 2N por pozo y finalmente se midió la densidad óptica a 405 nm en un lector de ELISA (BIO-RAD, Mod. 3550).

### **Determinación de las subpoblaciones de linfocitos**

*Suspensión de células de órganos linfoides.-* Después de 4, 8, 12, 16 y 20 semanas de experimentación se extrajeron el bazo y el timo de tres animales de cada grupo de experimentación. Los bazos y los timos se pesaron y se prepararon las suspensiones de sus células y después de tomar las alícuotas necesarias para los estudios por citometría de flujo, las células sobrantes de cada órgano se congelaron inmediatamente a -70°C y así se almacenaron para los análisis enzimáticos de PCC y PC.

*Marcado directo para citometría de flujo.-* Los bazos y los timos se colocaron por separado en tubos cónicos de plástico de 15 mL conteniendo 5 mL de PBS\* frío (ver Anexo B). Todo el proceso se efectuó manteniendo el material en baño de hielo. Se preparó la suspensión de células mediante la presión del tejido con pinzas hasta que se quedó vacía la cápsula fibrosa del órgano (53). Esta suspensión se centrifugó a 400 x g durante 5 min a 4°C y se desechó el sobrenadante. El botón de células se resuspendió golpeando suavemente el fondo del tubo y los eritrocitos se lisaron agregando 2 mL de solución hemolizante para los bazos y 1 mL para los timos. durante un minuto. Inmediatamente después se ajustó el

volumen a 15 mL con PBS\*; se centrifugó, se desechó el sobrenadante y el botón de células se resuspendió en 5mL de PBS\* y se contaron en una cámara de Neubauer.

En cada uno de tres tubos de plástico de 12 x 75 mm. (Falcon, Cat. 2054) se depositaron  $10^6$  células de bazo, se ajustó el volumen a 90  $\mu$ L y los linfocitos se tiñeron con 1  $\mu$ g en 10  $\mu$ L de PBS\* de cada uno de los siguientes anticuerpos monoclonales marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) o con ficoeritrina (PE): anticuerpo de cabra contra IgG (H+L) de ratón marcado con FITC (Zymed Laboratories Inc. cat. 62-6511); anticuerpo de rata (IgG<sub>2a</sub>) contra CD4 de ratón conjugado con FITC (Gibco BRL, cat. 19860-022) combinado con anticuerpo de rata (IgG<sub>2a</sub>) contra CD8a-R de ratón marcado con PE (Gibco BRL, cat. 19869-023) y con anticuerpo de hámster (IgG) contra CD3- $\epsilon$  de ratón conjugado con FITC (Boehringer Mannheim; cat. 1242-202). En otros dos tubos de plástico de 12 x 75 mm se depositaron  $10^6$  células de timo, se ajustó el volumen a 90  $\mu$ L y los linfocitos se tiñeron con 1  $\mu$ g en 10  $\mu$ L de PBS\* de cada uno de los siguientes anticuerpos: anti-CD4 de ratón conjugado con FITC combinado con anti-CD8a-R de ratón marcado con PE y con anti-CD3- $\epsilon$  de ratón marcado con FITC. Los tubos con las células sin marcar y las marcadas para medir unión inespecífica se procesaron de la misma manera. En las células sin marcar se sustituyó el anticuerpo por PBS\* y en los controles de isotipo se agregó 1  $\mu$ g de inmunoglobulina de ratón purificada IgG2a, $\kappa$  (UPC-10) conjugada con FITC (Sigma Chem. Cat. F6522) y 1  $\mu$ g de inmunoglobulina de ratón purificada IgG2a, $\kappa$  (UPC-10) conjugada con PE (Sigma Chem. Cat. P4810).

Esta mezcla se incubó durante 60 min a 4°C en obscuridad y después de lavar tres veces con 1 mL de PBS\* las células se resuspendieron en 100  $\mu$ L de paraformaldehído al



2% en PBS pH 7.4. Las células marcadas y fijadas se pueden almacenar en esta solución en oscuridad a 4°C hasta por 7 días.

*Adquisición de datos en el citómetro de flujo FACScan.-* Los datos de las células marcadas y fijadas se obtuvieron generalmente de dos a cuatro días después de la tinción. El manejo y la calibración del equipo fue siempre efectuada por el especialista responsable del uso y manejo del equipo. La región de los linfocitos se estableció experimentalmente con la gráfica de linealidad vs. celularidad de las células "blanco"; los parámetros de análisis y ajuste de la sensibilidad del detector se hicieron con células con inmunofluorescencia positiva y los ajustes de compensación se efectuaron con los controles de referencia para establecer la zona de inmunofluorescencia inespecífica.

*Análisis de los datos adquiridos en el FACScan.-* Para cada muestra en particular se determinó el punto de corte de la fluorescencia, con base en la fluorescencia de los controles de isotipo respectivos. Después de definir el punto de corte para la fluorescencia, se determinaron los porcentajes de células con fluorescencia superior al punto de corte usando el programa de análisis estadístico del FACScan. Las células de bazo IgG<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup> se analizaron por medio del histograma correspondiente. Para la determinación de las células CD3<sup>+</sup> el punto de corte se definió como la fluorescencia superior al punto de intersección de las curvas correspondientes a la tinción con el isotipo control y con el anti-CD3. Las células de timo CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> así como las CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> y las CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> se analizaron en una gráfica de inmunofluorescencia de FITC vs. PE.

### **Análisis estadístico**

Los resultados están reportados como promedio  $\pm$  DE. Los análisis estadísticos de las diferencias entre los tres grupos experimentales, se hicieron por análisis de varianza de

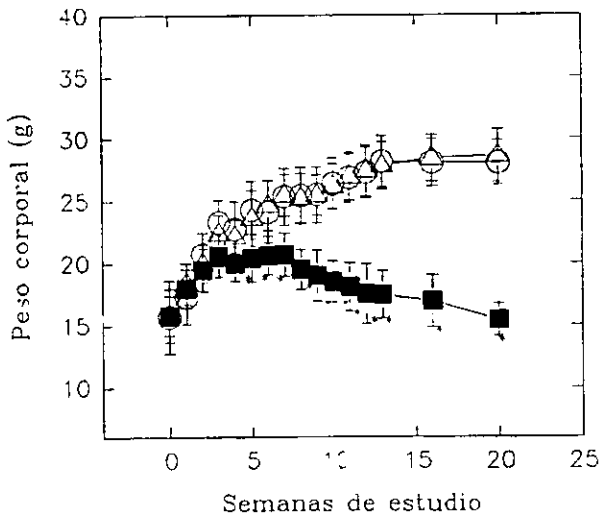
dos vías (ANOVA de dos vías) seguido de la comparación múltiple de todos los pares por el método de Student-Neuman-Keuls. Para estos análisis se usó el programa SIGMASTAT (Jandel Scientific Software).

## RESULTADOS

Los datos presentados en esta sección fueron obtenidos del estudio de ocho lotes diferentes de ratones BALB/cAnN.

### Efecto de la deficiencia de biotina sobre el peso corporal

Los ratones de los grupos control, suplementado y deficiente se pesaron individualmente cada semana; los resultados se muestran en la **Figura 6**. Los ratones en el grupo control tuvieron una ganancia de peso continua durante las primeras 15 semanas en estudio, de  $15.7 \pm 2.9$  g al inicio de la experimentación (semana 0,  $n = 76$ ) adquiriendo el peso máximo de  $28.2 \pm 2$  g en la semana 13 a partir de la cual permanecieron con peso constante hasta la semana 20 cuando tuvieron  $28.04 \pm 1.8$  g ( $n = 36$ ). El desarrollo corporal



**FIGURA 6.** Promedio ( $\pm$  DE) del peso corporal de ratones machos Balb/cAnN alimentados con una dieta comercial no purificada (O, grupo control), con una dieta depletante de biotina suplementada con biotina ( $\Delta$ , grupo suplementado), o con una dieta depletante de biotina ( $\blacksquare$ , grupo deficiente). \*Diferencia significativa con los grupos control y suplementado,  $P < 0.05$ .

de los animales con dieta suplementada fue similar al del grupo control, iniciando con  $15.8 \pm 2.1$  g en la semana 0 ( $n = 76$ ), alcanzando un promedio de  $27.8 \pm 1.9$  g en la semana 13 a partir de la cual el peso se mantuvo constante, siendo de  $28.6 \pm 2.1$  g al final del estudio (semana 20 de experimentación,  $n = 5$ ).

En contraste, la curva de crecimiento de los ratones que recibieron la dieta depletante de biotina tuvo un patrón trifásico: de  $15.8 \pm 1.6$  g en la semana 0 ( $n = 88$ ), ganaron peso igual que los animales de los grupos control y suplementado durante las dos primeras semanas, cuando tuvieron  $19.5 \pm 1.7$  g ( $n = 78$ ). De aquí en adelante la curva de crecimiento de los animales deficientes se separó de la curva de los grupos control y suplementado; alcanzando en la tercera semana un peso máximo de  $20.6 \pm 1.6$  g ( $n = 72$ ). Este peso se mantuvo relativamente constante hasta la semana 7 cuando tuvieron  $20.7 \pm 1.7$  g ( $n = 50$ ), a partir de la cual mostraron pérdida progresiva de peso hasta la semana 20, en que pesaron  $15.4 \pm 1.3$  g ( $n = 24$ ). El ANOVA de dos vías se efectuó con los datos a las 4, 8, 12, 16 y 20 semanas de estudio para los tres ratones de cada grupo que se sacrificaron en la semana 20 (el resto de los animales se fueron sacrificando a lo largo del estudio). Se encontraron diferencias significativas del grupo deficiente con los grupos control y suplementado ( $P < 0.05$ ) mientras que no hubo diferencia entre el grupo control y el suplementado. También hubo una interacción significativa entre dieta y tiempo ( $P < 0.001$ ). En el Apéndice C se puede consultar el reporte del ANOVA de dos vías realizado para el peso de los ratones, que es representativo de todos los que se realizaron en este trabajo.

## **Síntomas clínicos asociados con la deficiencia de biotina**

Los ratones fueron observados cada semana por la misma veterinaria para determinar cualquier signo patológico. Todos los ratones del grupo deficiente, además del peso reducido, adoptaron desde la 3ª semana una posición encorvada como la de los gazapos. El 14% de los ratones deficientes tuvo pérdida o falta de renovación de pelo (alopecia). De éstos, el 28% tuvo alopecia generalizada desde la 6ª semana en experimentación, quedándose prácticamente sin pelo 5 semanas después y moribundos fueron sacrificados a las 18 semanas. El 12% restante tuvo alopecia a partir de la semana 12, siendo más severa en las áreas que rodean la boca y el ano, permaneciendo así hasta el final del estudio. Adicionalmente, el 50% de los animales deficientes presentaron desde la 8ª semana, una ligera secreción ocular en alguno de los dos ojos, misma que les impedía mantenerlo abierto. Esta secreción progresó durante las cuatro semanas subsecuentes, de tal forma que en la 12ª semana, en el 75 % de los ratones, la secreción fue evidente en los dos ojos, permaneciendo así hasta el fin del estudio. A partir de la 9ª semana el 50% de los ratones deficientes también mostraron opacidad en la córnea. Además de estos síntomas, la veterinaria no detectó otro signo patológico.

Cuando uno de los lotes estudiados cursaba la 6ª semana de experimentación, se estableció la temporada anual de calor con una temperatura ambiental de  $31 \pm 2$  °C, entre las 12 hs. y 17 hs. misma que prevaleció aproximadamente durante 10 semanas. En este lote, el 50% de los ratones deficientes presentaron diarrea progresiva y muerte en el curso de las siguientes 6 semanas.

## Concentración de biotina libre en el suero

La biotina en el suero se midió en los extractos etanólicos por el método de unión competitiva descrito en el capítulo de Materiales y Métodos. Para determinar la eficiencia de la extracción, soluciones de biotina de concentraciones conocidas, así como mezclas de sueros a las que se les agregaron diferentes cantidades de  $^3\text{H}$ -biotina fueron sometidos al mismo procedimiento que los sueros. En la **Tabla 2** se muestra la cantidad de biotina observada en siete soluciones procesadas en días diferentes y en dos ensayos independientes, la que correspondió al  $97.7 \pm 11.2\%$  de la cantidad que contenían las soluciones. En la **Tabla 3** se describe la radiactividad medida en los extractos de cinco alícuotas de suero de 1 mL cada una, a las que se les agregaron diferentes cantidades de  $^3\text{H}$ -biotina. En éstos, las dpm observadas correspondieron al  $99 \pm 7.6\%$  de la radioactividad agregada antes de la extracción.

**TABLA 2.- EFICIENCIA DE LA EXTRACCIÓN DE BIOTINA NO RADIATIVA EN SOLUCIONES DE CONCENTRACIÓN CONOCIDA \***

Ensayo 1			Ensayo 2	
pg Presentes	pg Observados	% Recuperación	pg Observados	% Recuperación
24.4	22	90.2	22	90.2
36.6	35	95.6	32	87.4
48.8	58	118.8	52	106.5
61.0	n.d.	n.d.	58	95.1

n.d. no determinado. \* Promedio de recuperación:  $97.7 \pm 11.2\%$  (n = 7)

**TABLA 3.- EFICIENCIA DE LA EXTRACCIÓN DE  
<sup>3</sup>H-BIOTINA AGREGADA AL SUERO \***

dpm Agregadas	dpm Observadas	% de Recuperación
15,840	17,015	107.4
31,680	28,255	89.2
63,360	63,662	100.5
126,720	118,367	93.4
13,920	14,572	104.7

\*Recuperación promedio: 99 + 7.6% (n=5)

La concentración de biotina libre sérica (Bl<sub>s</sub>) se midió en el suero de los animales al inicio del estudio y a las 2, 4, 8 y 12 semanas después de iniciar las dietas correspondientes. Para trabajar con un volumen de 750 µL en cada determinación, se combinaron los sueros de tres ratones del mismo grupo y con igual tiempo de experimentación. Los ratones recién destetados (semana 0 de estudio) tuvieron una concentración de Bl<sub>s</sub> de 16.4 ± 3.3 nM (n = 5). Para los grupos control y suplementado los sueros estudiados en los tiempos indicados mostraron una concentración de biotina oscilante dentro de un amplio intervalo alrededor del promedio (Tabla 4). En los ratones del grupo control la concentración de Bl<sub>s</sub> fue 30.9 ± 20.4 nM (n = 15) y en los del grupo suplementado fue 43.0 ± 28.7 nM (n = 13). Los ratones del grupo deficiente desde las dos semanas en experimentación tuvieron una concentración de biotina en el suero de 2.08 ± 1.04 nM (n=3) y el promedio entre las 2, 4, 8 y 12 semanas fue de 3.50 ± 0.73 nM (n = 10).

El ANOVA de una vía indicó que no hubo diferencia significativa entre la biotina libre en el suero de los ratones controles y suplementados ( $P > 0.05$ ) y que sí la hubo para el

suero de los ratones deficientes con respecto a los de los grupos control y suplementados ( $P < 0.05$ ).

**TABLA 4.- CONCENTRACIÓN DE BIOTINA LIBRE EN EL SUERO\***

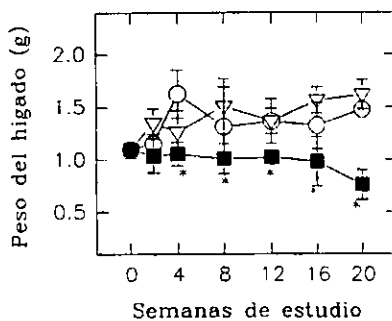
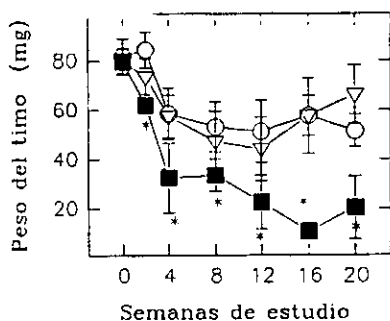
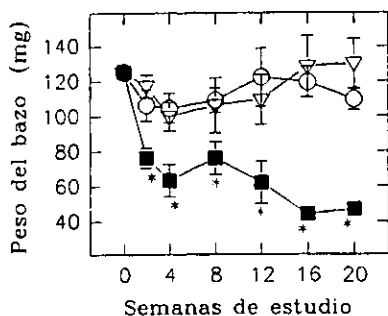
Dieta	Concentración de biotina (nM)
Control	30.9 ±20.4 (15)
Suplementada	43.0 ± 28.7 (13)
Deficiente	3.5 ± 0.73 (10)

\* Los datos representan el promedio ± D.E de la concentración de biotina medida en la combinación del suero de tres ratones en experimentación. Entre paréntesis se indica en número de determinaciones.

### **Desarrollo de hígado, bazo y timo**

El desarrollo del bazo, timo e hígado fue menor en los ratones deficientes de biotina en comparación con el de los órganos de los ratones controles y suplementados. En la **Figura 7** se presentan las gráficas del peso de estos tres órganos a lo largo de 20 semanas de estudio en los ratones de los tres grupos experimentales. El peso promedio del bazo al inicio del estudio fue de  $125.3 \pm 4$  mg (n=5, semana 0) y se mantuvo relativamente constante en los ratones controles y suplementados durante las 20 semanas, con un peso de  $115.1 \pm 12.5$  mg (n = 42). El peso del bazo de los ratones deficientes de biotina tuvo una marcada disminución en las dos primeras semanas cuando fue de  $76.3 \pm 5.5$  mg (n=6); permaneció alrededor de este peso entre las 4 y las 12 semanas cuando tuvo  $68.6 \pm 11.8$  mg (n = 21), después de las cuales se redujo hasta  $45.5 \pm 3.0$  mg (n = 6) en las semanas 16 a 20.





**FIGURA 7.** Peso del bazo, timo e hígado de ratones machos Balb/cAnN (promedio  $\pm$  DE). Los órganos fueron extraídos de individuos alimentados con una dieta comercial no purificada (O, grupo control), con una dieta depletante de biotina suplementada con biotina (V, grupo suplementado), o con una dieta depletante de biotina (■, grupo deficiente). \*Diferencia significativa con los grupos control y suplementado,  $P < 0.05$ .

El peso del timo en los ratones al inicio del estudio fue de  $81.8 \pm 7.1$  mg. ( $n = 6$ , semana 0). En los controles y suplementados, al inicio y durante las primeras dos semanas de estudio, se mantuvo constante con un peso de  $84.3 \pm 7.4$  mg ( $n = 6$ ); a las 4 semanas disminuyó hasta  $58.6 \pm 10.4$  mg ( $n=8$ ) y a partir de este tiempo se estableció en  $53.9 \pm 11.6$  mg ( $n = 29$ ) hasta el fin de la experimentación. El peso del timo en los ratones deficientes durante las primeras cuatro semanas disminuyó pronunciadamente; en las dos primeras bajó hasta  $62 \pm 1.7$  mg y en las dos semanas siguientes disminuyó hasta  $32.5 \pm 14$  mg. Este peso se mantuvo hasta la 8ª semana, después continuó el descenso hasta  $16.8 \pm 11.2$  mg ( $n = 11$ ) en las semanas 16 y 20.

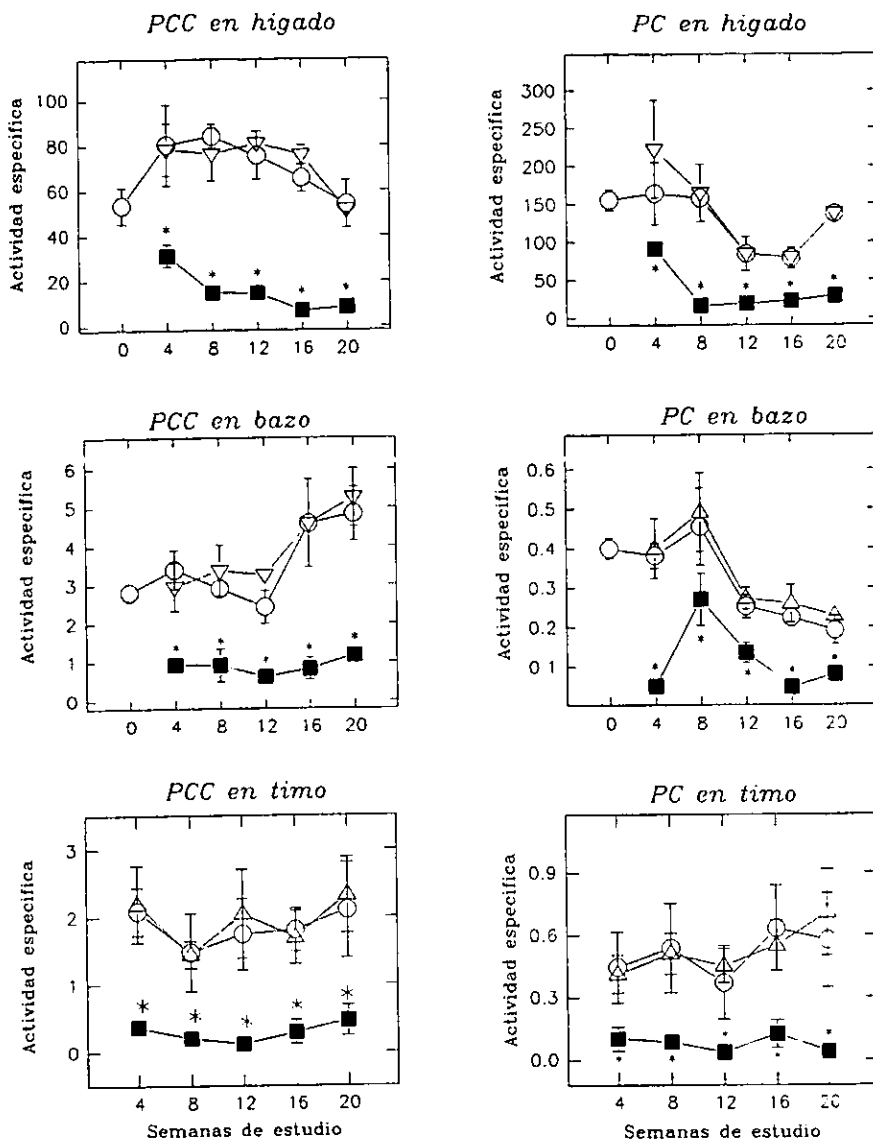
El peso del hígado al inicio del estudio fue de un promedio de  $1.02 \pm 0.05$  g ( $n = 3$ ). En las primeras cuatro semanas aumentó hasta  $1.62 \pm 0.22$  g ( $n = 8$ ) en los ratones de los grupos control y suplementados y después de este tiempo entre las 4 y 20 semanas tuvo un peso promedio de  $1.40 \pm 0.19$  g ( $n = 30$ ). En los ratones deficientes de biotina no se observó el incremento que mostraron los hígados de los ratones controles y suplementados en las primeras 4 semanas, sino que se mantuvo en  $1.02 \pm 0.13$  g ( $n = 34$ ) hasta las 16 semanas, después de este tiempo disminuyó hasta  $0.76 \pm 0.14$  g ( $n = 6$ ) en la 20ª semana.

Para el bazo, timo e hígado, el ANOVA de dos vías indicó que hay diferencias significativas entre los promedios de las distintas dietas con respecto al tiempo ( $P < 0.001$ ), entre los promedios de los tiempos con relación a las dietas ( $P < 0.001$ ) y también es significativa la presencia de interacciones entre dieta y tiempo ( $P < 0.001$ ).

## **Efecto de la deficiencia de biotina sobre las actividades enzimáticas de las carboxilasas**

Las actividades específicas de PCC y PC en los homogenados de hígado y de células de bazo y timo de los ratones de cada grupo experimental, se determinaron al inicio del estudio y a las 4, 8, 12, 16 y 20 semanas (Figura 8). En general, las actividades específicas de las dos enzimas fueron mayores en el hígado que en el bazo y el timo. Adicionalmente, en los órganos de los ratones del grupo suplementado, las actividades enzimáticas tuvieron valores semejantes a los del grupo control. En el hígado de los ratones de los grupos control y suplementado la actividad específica de la PC fue el doble que la de PCC; en contraste, en el bazo la actividad específica de la PCC fue 5-8 veces mayor que la de PC. En el timo la actividad específica de PCC fue 3-5 veces mayor que la de PC. Las actividades específicas de las dos enzimas en los órganos de los ratones del grupo deficiente fueron menores que las correspondientes en los animales de los grupos control y suplementado.

Las unidades de actividad enzimática para PCC y PC para los tres órganos estudiados están expresadas como  $\text{nmol CO}_2 \text{ fijadas} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg proteína}^{-1}$ . Las actividades específicas promedio de PCC y PC en el hígado de los ratones controles y suplementados fue 72 y 130, mientras que en los animales deficientes de biotina fue de 15.1 y 35.4, respectivamente. En el bazo, las actividades específicas promedio de PCC y PC en los animales controles y suplementados fueron de 3.75 y 0.30 y en los deficientes 0.90 y 0.12 respectivamente. En las células del timo de los ratones con dietas control y suplementada, las actividades específicas de PCC y PC fueron 1.92 y de 0.51 mientras que en los ratones con dieta deficiente fueron 0.305 y 0.074 respectivamente. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las actividades de ninguna de las dos enzimas en los



**FIGURA 8.** Actividades enzimáticas de propionil-CoA carboxilasa (PCC) y piruvato carboxilasa (PC) en hígado, bazo y timo. Ratones recién destetados (3-4 semanas de edad) fueron alimentados con una dieta comercial no purificada (O, grupo control), con una dieta depletante de biotina suplementada con biotina (∇, grupo suplementado), o con una dieta depletante de biotina (■, grupo deficiente).

<sup>1</sup> Actividad específica en  $\text{nmol CO}_2$  fijadas  $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg}$  de proteína<sup>-1</sup>. Los resultados están expresados como promedio  $\pm$  DE de tres animales por grupo en cada tiempo estudiado. \*Diferente significativamente con los grupos control y suplementado,  $P < 0.05$ .

órganos de los ratones de los grupos control y suplementado. En contraste, se observaron diferencias significativas en las actividades específicas de cada enzima en el hígado, bazo y timo, entre los ratones del grupo deficiente y los de los grupos control y suplementado ( $P < 0.05$ ). También se observó interacción estadísticamente significativa entre dieta y tiempo para PC en hígado y bazo y para PCC en el bazo y el timo ( $P = 0.018$ ,  $P = 0.014$ ,  $P = 0.006$  y  $P = 0.049$ , respectivamente). No se encontró interacción significativa entre dieta y tiempo para la PCC en el hígado ni para la PC en el timo ( $P = 0.061$  y  $P = 0.0083$ ).

### **Proliferación de linfocitos de bazo inducida por Concanavalina-A**

Como se mostró en las páginas anteriores, los bazos de los ratones en el grupo deficiente fueron consistentemente más pequeños que los bazos de los ratones suplementados y controles, lo que se reflejó en un menor número de células obtenidas de ellos. En promedio, los bazos de los animales controles y suplementados contenían  $120 \times 10^6$  células, mientras que en los ratones deficientes el promedio de células fue  $54 \times 10^6$  (Tabla 5).

A diferentes tiempos después de iniciadas las dietas, las células de bazo de tres ratones de cada grupo experimental se usaron para medir la proliferación inducida por ConA, un mitógeno específico para linfocitos T. Para establecer los posibles efectos de la biotina durante el ensayo de proliferación, las células de cada ratón se analizaron simultáneamente en medio de cultivo adicionado con biotina exógena en concentraciones de 0, 10 y 800 nM. En todos los experimentos efectuados, la incorporación máxima de [ $^3$ H]-Timidina se observó con una concentración de ConA de 5 ng/L. Los resultados de un ensayo de proliferación representativo, efectuado 18 semanas después de iniciar las dietas

**TABLA 5.- CELULARIDAD EN EL BAZO<sup>1</sup>**

<i>Tiempo de Estudio</i>	<i>Control</i>	<i>Suplementado</i>	<i>Deficiente</i>
<b>4 semanas</b>	120 ± 19 (n = 3)	117 ± 31 (n = 3)	59 ± 18 (n = 3)
<b>8 semanas</b>	126 ± 16 (n = 3)	122 ± 7 (n = 3)	61 ± 12 (n = 3)
<b>12 semanas</b>	109 ± 17 (n = 3)	99 ± 20 (n = 3)	48 ± 9 (n = 3)
<b>16 semanas</b>	114 ± 6 (n = 6)	138 ± 25 (n = 6)	56 ± 11 (n = 6)
<b>20 semanas</b>	137 ± 17 (n = 3)	128 ± 13 (n = 3)	46 ± 4 (n = 3)

<sup>1</sup> Ratones de 4 semanas de edad (recién destetados) fueron alimentados con las dietas correspondientes. En los tiempos indicados, se les extrajo el bazo, de éste se prepararon suspensiones de células aisladas en medio de cultivo DMEM y se contaron en un hemocitómetro. Los valores representan millones de células expresadas como el promedio ± DE de los datos. Entre paréntesis se indica el número de animales.

correspondientes, se presentan resumidos en el **Tabla 6**. A pesar de las variaciones en el promedio de dpm incorporadas en diferentes experimentos después de la estimulación con ConA (con intervalo de 40000 a 200000 dpm), los resultados de los experimentos con células de bazo obtenidas a las 4, 8, 12, o 18 semanas en estudio, mostraron esencialmente el mismo patrón: los linfocitos del bazo de los grupos suplementado y control tuvieron una incorporación similar de [<sup>3</sup>H] timidina; mientras que la captación neta por las células de los ratones deficientes fue 20-25% menor. A pesar de que la incorporación de timidina radioactiva por células de los ratones deficientes fue siempre menor, el ANOVA de dos vías no detectó diferencias significativas entre los tres grupos ( $P > 0.05$ ). Cabe hacer notar que en todos los experimentos, la presencia o ausencia de biotina en el medio de cultivo, no afectó la proliferación de las células de bazo de los ratones en cualquiera de los tres grupos experimentales (**Tabla 6**).

**TABLA 6. INCORPORACIÓN DE <sup>3</sup>H-TIMIDINA POR LINFOCITOS DE BAZO<sup>1</sup>**

Biotina	Control		Suplementado		Deficiente	
	Con A		Con A		Con A	
	0 µg/mL	5 µg/mL	0 µg/mL	5 µg/mL	0 µg/mL	5 µg/mL
	Bq					
<b>0 nM</b>	0.50 ± 0.14	183 ± 36	0.73 ± 0.28	163 ± 44	0.54 ± 0.13	132 ± 29
<b>10 nM</b>	0.62 ± 0.29	195 ± 42	0.72 ± 0.31	233 ± 60	0.54 ± 0.22	123 ± 31
<b>800 nM</b>	0.68 ± 0.37	166 ± 39	0.66 ± 0.23	172 ± 45	0.45 ± 0.19	119 ± 20

<sup>1</sup>Los ratones fueron sacrificados después de 18 semanas de recibir el alimento correspondiente para cada grupo. Las células aisladas de bazo ( $2.5 \times 10^5$ /pozo) se incubaron sin ConA (0 µg/mL) o con ConA (5 µg/mL) en DMEM, conteniendo las concentraciones de biotina indicadas. Los resultados expresan el promedio ± DE; n=3 por grupo. Las células de cada animal se analizaron en triplicado.

### **Reactivación *in vitro* de la actividad enzimática de PCC y PC en esplenocitos**

La observación de que la biotina en el medio de incubación no modifica la proliferación causada por ConA en los linfocitos de bazo, especialmente en las células de los animales deficientes, nos motivó a analizar si este comportamiento se debía a la falta de capacidad de estas células para internalizar a la biotina del medio y/o unirla a las apocarboxilasas. Por lo tanto, estudiamos si la incubación en presencia de biotina tenía algún efecto sobre las actividades específicas de PCC y PC en las células de bazo de los ratones de los grupos control y deficiente. En las células de los ratones alimentados durante 8 semanas con dieta depletante de la vitamina, la incubación por 48 h en presencia de biotina 800 nM (sin el estímulo del mitógeno), produjo un incremento de  $2.36 \pm 0.16$  y  $2.59 \pm 0.26$  veces en las actividades específicas de PCC y PC respectivamente, en comparación con las células incubadas en el medio sin biotina (Tabla 7). Los linfocitos de los ratones control incubados con biotina 800 nM tuvieron un incremento más moderado de  $1.13 \pm 0.26$  y  $1.27 \pm 0.11$

veces para PCC y PC respectivamente. Durante la incubación en el medio con 5 µg/ mL de ConA (sin biotina presente), estos linfocitos de bazo de los ratones deficientes mostraron una disminución de 36% y 32% en las actividades específicas de PCC y PC y los de los ratones control disminuyeron 21% y 25% correspondientemente. Cuando las células de los ratones depletados de biotina se incubaron con el mitógeno y la biotina presentes en el

**TABLA 7. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PCC Y PC EN LAS CÉLULAS DE BAZO ESTIMULADAS CON Con A EN PRESENCIA DE BIOTINA<sup>1</sup>**

Semana	Biotina nM	Con A mg/L	Actividad de PCC		Actividad de PC	
			Control	Deficiente	Control	Deficiente
8	0	0	1.00 ± 0.19	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.60
8	800	0	1.13 ± 0.26	2.36 ± 0.16	1.27 ± 0.11	2.59 ± 0.26
8	0	5	0.79 ± 0.24	0.64 ± 0.28	0.75 ± 0.07	0.68 ± 0.40
8	800	5	2.19 ± 0.31	3.36 ± 0.27	3.07 ± 0.86	8.26 ± 1.24
12	0	0	1.00 ± 0.07	1.00 ± .29	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.41
12	800	0	0.82 ± 0.14	1.44 ± 0.33	0.89 ± 0.18	1.68 ± 0.13
12	0	5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
12	800	5	1.61 ± 0.51	5.63 ± 0.79	1.79 ± 0.65	6.97 ± 0.83

<sup>1</sup> Cuatro ratones de cada grupo experimental fueron sacrificados a las 8 o 12 semanas recibiendo el alimento correspondiente. Las células de bazo ( $10 \times 10^6$ ) se incubaron en 5 mL DMEM con las concentraciones indicadas de biotina (0 o 800 nM) y Con A (0 o 5 µg/mL) durante 48 hs. Al final de ésta las células se cosecharon, lavaron y se midieron las actividades específicas de PCC y PC. Los resultados están expresados asignando valor de 1.00 a las actividades específicas de las células sin biotina y ConA. n.d.= No determinado.

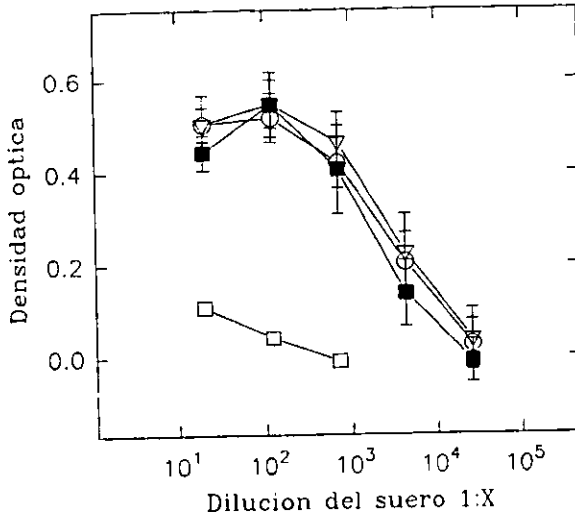


medio, se produjo un incremento en la actividad de PCC en controles y deficientes y en PC de controles, equivalente a la suma de las actividades individuales observadas. Solamente para la actividad enzimática de la PC en los linfocitos de los ratones deficientes se observó un efecto sinérgico, ya que aumentó  $8.26 \pm 1.24$  veces.

En los linfocitos de bazo de los ratones con 12 semanas en experimentación, la incubación en las mismas condiciones con biotina (sin mitógeno) aumentó la actividad de PCC en  $1.44 \pm 0.33$  veces en las células de los deficientes y disminuyó hasta  $0.82 \pm 0.14$  en las células de los controles, mientras que la actividad de PC aumentó en  $1.68 \pm 0.13$  veces en los linfocitos de los animales deficientes y disminuyó hasta  $0.89 \pm 0.18$  en los controles. La incubación en presencia simultánea de biotina 800 nM y ConA 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  causó que los linfocitos de los ratones control aumentaran  $1.61 \pm 0.51$  veces la actividad de PCC y  $1.79 \pm 0.65$  veces la de la PC. En cambio en los linfocitos de los ratones deficientes el aumento fue más notable; de  $5.63 \pm 0.79$  para la PCC y de  $6.97 \pm 0.83$  para la PC (Tabla 7).

### **Determinación de la producción de anticuerpos específicos para DNP**

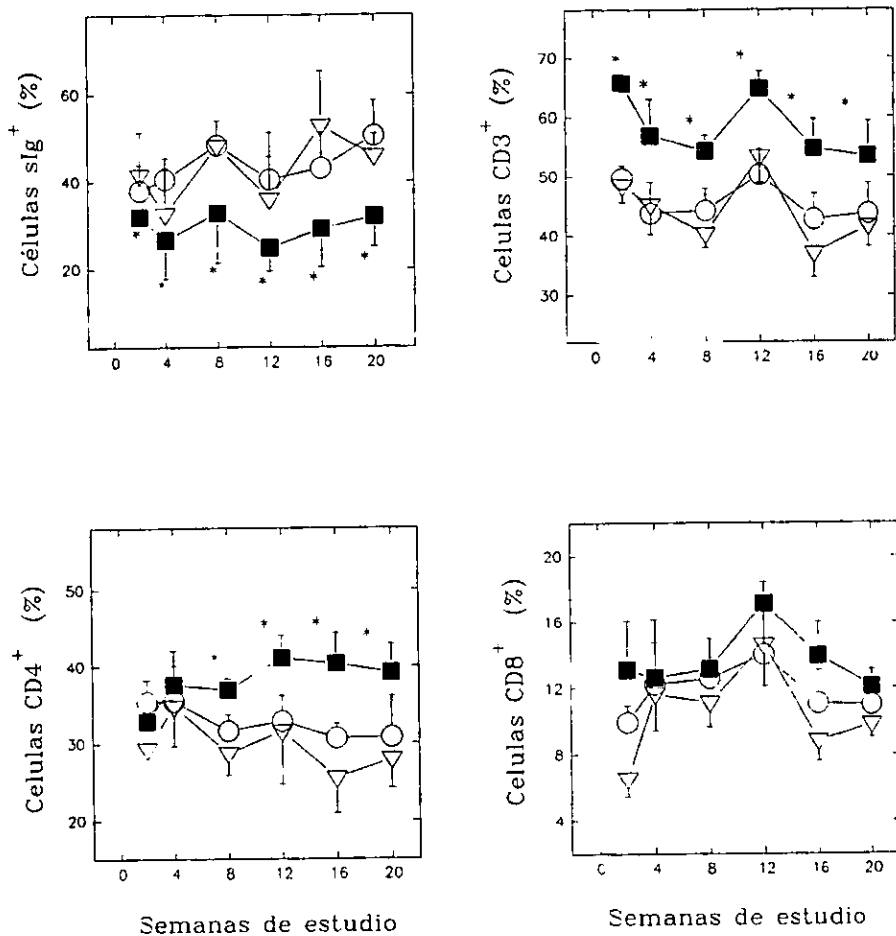
Cinco ratones de cada grupo recibieron el esquema de inmunizaciones con DNP-ovoalbúmina como se describió en Materiales y Métodos. Los anticuerpos anti-DNP producidos, fueron titulados por un ensayo de ELISA indirecto. En la **Figura 9** se presentan las curvas de titulación de los sueros de ratones de los tres grupos experimentales. En comparación con la curva de titulación del suero negativo, los tres grupos de experimentación respondieron específicamente y de manera similar a las inmunizaciones con DNP-OVO. No se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos estudiados ( $P = 0.213$ ).



**FIGURA 9.** Determinación de la producción de anticuerpos IgG específicos para DNP en el suero de ratones machos Balb/cAnN alimentados con una dieta comercial no purificada (O, grupo control), con una dieta depletante de biotina suplementada con biotina (V, grupo suplementado), o con una dieta depletante de biotina (■, grupo deficiente). El suero combinado de tres ratones del mismo lote que nunca recibieron ningún estímulo se usó como control negativo (□). Los resultados son el promedio  $\pm$  DE de la D.O de la reacción a la dilución indicada.

### **Efecto de la deficiencia de biotina sobre las subpoblaciones de linfocitos de bazo y timo**

Los porcentajes de las células que expresan inmunoglobulina de superficie (sIgG, H+L), y los marcadores CD3- $\epsilon$ , CD4 y CD8 en las células de los bazos de los ratones de los tres grupos experimentales se muestran en la **Figura 10**. Ya que el anticuerpo IgG (H+L) que se usó reconoce determinantes de la inmunoglobulina, tanto de las cadenas pesadas como de las ligeras ( $\kappa$ ,  $\lambda$ ), este reactivo puede reconocer todas las subclases de inmunoglobulinas. Los porcentajes de las células CD3- $\epsilon^+$ , CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> fueron mayores en los ratones deficientes que en los de los grupos control y suplementado; mientras que el



**FIGURA 10.** Porcentaje de células que expresan inmunoglobulinas de superficie (sIg<sup>+</sup>) y los marcadores CD3-ε, CD4 y CD8 en el bazo de ratón. Ratones recién destetados (3-4 semanas de edad) fueron alimentados con una dieta comercial no purificada (O, grupo control), con una dieta depletante de biotina suplementada con biotina (∇, grupo suplementado), o con una dieta depletante de biotina (■, grupo deficiente). Individuos de cada grupo fueron sacrificados en los tiempos indicados y se determinaron los porcentajes de las células que expresan cada marcador por citometría de flujo. Los datos están presentados como promedio ± DE de cinco a nueve ratones por grupo para cada tiempo de análisis. \*Diferencia significativa con los grupos control y suplementado. *P* < 0.05.

porcentaje de linfocitos  $\text{slg}^+$  fue menor en los animales deficientes que en los ratones de los otros dos grupos experimentales. El ANOVA de dos vías para cada parámetro, mostró que las diferencias de promedios entre las tres dietas y entre los distintos tiempos son estadísticamente significativas ( $P < 0.001$ ). En las células del bazo sólo para el indicador CD4 hubo interacción significativa entre los diferentes niveles de dieta y tiempo ( $P = 0.001$ ), mientras que no fue significativa para los indicadores  $\text{slg}$  ( $P = 0.093$ ); CD3- $\epsilon$  ( $P = 0.166$ ) y CD8 ( $P = 0.117$ ). El promedio global de células de bazo  $\text{slg}^+$  fue de  $28.3 \pm 1.1\%$  para el grupo deficiente de biotina, mientras que para el grupo control y suplementado fue  $42.2 \pm 1.1\%$  y  $41.5 \pm 1.1\%$  respectivamente. Las células de bazo CD3- $\epsilon^+$  a lo largo de la experimentación correspondieron al  $45.7 \pm 0.69\%$  en el grupo control, al  $44.3 \pm 0.69\%$  en el grupo suplementado y al  $58.3 \pm 0.69\%$  en el grupo deficiente. Los porcentajes de los indicadores  $\text{slgG}$  y CD3- $\epsilon$  en el grupo deficiente son diferentes significativamente a los porcentajes de los grupos control y suplementado ( $P < 0.05$ ) mientras que no hay diferencia significativa de estos dos indicadores, entre los grupos suplementado y control ( $P > 0.05$ ).

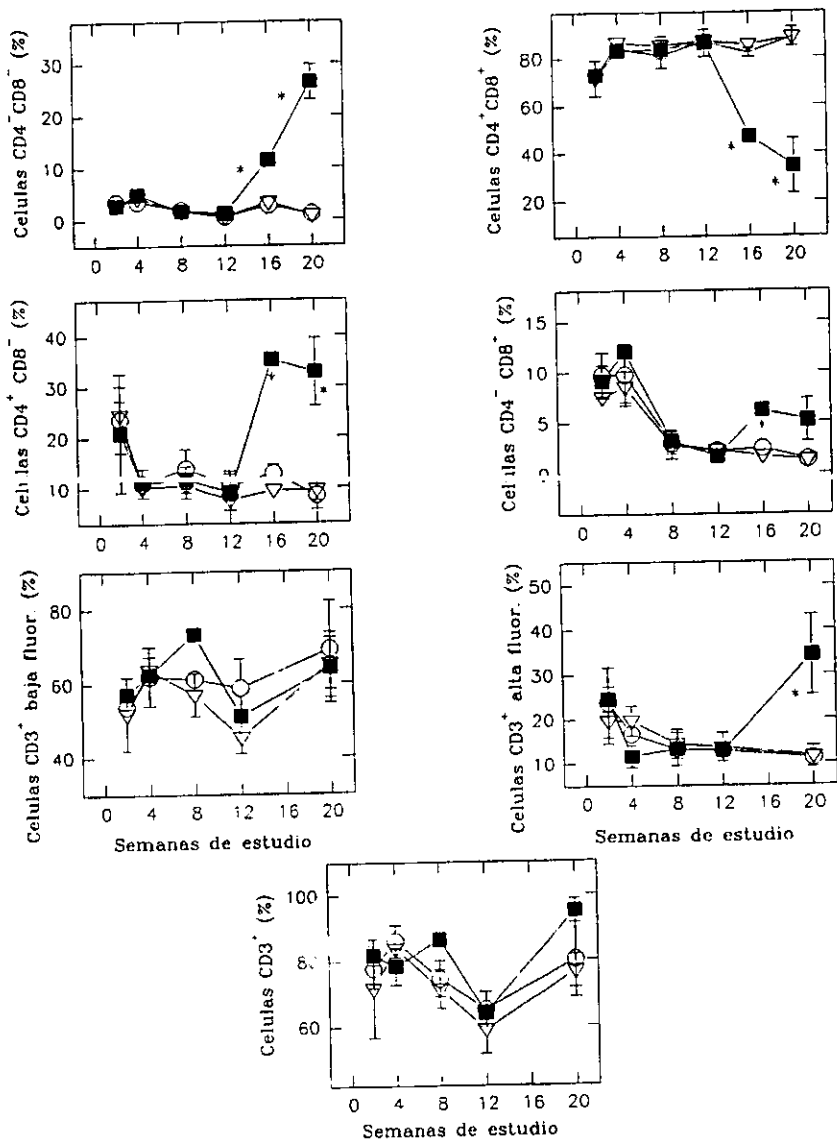
En el bazo de los ratones controles y suplementados, las células CD4 $^+$  a las 2 semanas de estudio correspondieron al 35.4% y 29.3% y a las 4 semanas fueron el 35.4% y el 34.8% respectivamente. En el bazo de los ratones del grupo deficiente de biotina, a las 2 semanas de estudio se observó un  $32.9 \pm 1.54\%$  de células CD4 $^+$  y a las 4 semanas  $37.6 \pm 1.54$ ; se mantuvo dentro de este nivel a las 8 semanas con 36.9% y aumentó en la 12 $^{\text{a}}$  semana hasta 41.1% manteniéndose dentro de este porcentaje hasta el fin del estudio. A su vez, las células CD4 $^+$  en los bazos de los ratones de los grupos suplementado y control fueron de un  $29.6 \pm 0.63\%$  y  $32.8 \pm 0.63\%$  respectivamente a lo largo de las 20 semanas de

experimentación. El ANOVA de dos vías para las células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en el bazo indicó que hay diferencias significativas entre los tres grupos experimentales ( $P < 0.05$ ).

En la **Figura 11** se muestra que en el timo de los ratones experimentales, desde las 2 hasta la 12 semanas en estudio, no hay diferencias entre las proporciones de células que no expresan los marcadores CD4 ni CD8 (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>, dobles negativas), las que expresan los dos indicadores (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, dobles positivas), y las que expresan sólo uno de ellos (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>, sencillas positivas). Sin embargo, desde la semana 16 hasta la 20<sup>a</sup>, los porcentajes de estas cuatro subpoblaciones de linfocitos del timo en los ratones deficientes de biotina son diferentes significativamente a los porcentajes de estos subtipos de células en el timo de los ratones de los grupos control y suplementado ( $P < 0.05$ ).

En el timo de los ratones deficientes las células dobles negativas aumentaron significativamente de 1.22% en la semana 12 a 11.4% y 25.6 % en las semanas de estudio 16 y 20 respectivamente, mientras que en los timos de los ratones con dieta suplementada y control tuvieron 3.01% y 1.13% de células dobles negativas en los mismos tiempos de análisis (**Figura 11**). Opuestamente, el porcentaje de células dobles positivas en el timo de los animales deficientes de biotina, disminuyó de 86.3% en la semana 12 de estudio hasta 47.0% y 35.5% en los tiempos correspondientes a 16 y 20 semanas en experimentación. Los porcentajes de esta subpoblación celular en los timos de los ratones con dieta control y suplementada fueron de 87.0%, 83.8% y 87.7% respectivamente, para las semanas de estudio 12, 16 y 20.

Las células de timo CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> también aumentaron significativamente en los ratones del grupo deficiente, teniendo 9.2% en la semana 12; 35.2% en la semana 16 y 35.7% en la semana 20 de estudio, mientras que en los timos de los ratones con dieta control fueron de



**FIGURA 11.** Porcentaje de células que expresan los marcadores CD3-e, CD4 y CD8 en el timo de ratón. R ratones recién destetados (3-4 semanas de edad) fueron alimentados con una dieta comercial no purificada (O, grupo control), con una dieta depletante de biotina suplementada con biotina (∇, grupo suplementado), o con una dieta depletante de biotina (■, grupo deficiente). Individuos de cada grupo fueron sacrificados en los tiempos indicados y se determinaron los porcentajes de las células que expresan cada marcador por citometría de flujo. Los datos están presentados como promedio  $\pm$  DE de tres a seis ratones por grupo para cada tiempo de análisis. \*Diferencia significativa con los grupos control y suplementado,  $P < 0.05$ .

10.4%, 12.8% y 9.6% en las semanas 12, 16 y 20, respectivamente. Y en los mismos tiempos de análisis, los porcentajes de este subtipo de células en el timo de los ratones suplementados fueron de 7.6%, 9.5% y 9.5% respectivamente

Para el fenotipo CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> el aumento en el porcentaje aunque también fue significativo, no fue tan pronunciado como en las células dobles negativas y CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>. En los timocitos de los ratones deficientes de biotina, los porcentajes de células sencillas positivas que expresan el marcador CD8 fueron de 1.6% en la semana 12 de estudio; 6.2% en la semana 16 y 6.0% en la semana 20. En cambio, las células de timo CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> en los ratones con dieta control y suplementada de biotina fueron del 2.2%, 2.5% y 1.5% en los tiempos de análisis de 12, 16 y 20 semanas.

Por último, las proporciones de timocitos que expresan el indicador CD3-ε con baja intensidad no tuvieron cambios significativos a lo largo de las 20 semanas en experimentación y mostraron un promedio global de  $61.0 \pm 1.5\%$  para los ratones del grupo control,  $57.3 \pm 1.5\%$  para los del grupo suplementado y de  $61.6 \pm 1.5\%$  para los del grupo deficiente de biotina. En cambio los timocitos de los animales deficientes de biotina expresaron en la semana 20, un aumento significativo en el porcentaje de células CD3-ε<sup>-</sup> de alta fluorescencia pasando de 12.8% en la semana 12 de estudio a 34.3% al final de la experimentación ( semana 20,  $P < 0.05$ ). A diferencia de los ratones deficientes, en las semanas 12 y 20 de estudio el timo de los ratones control tuvo  $12.9 \pm 2.3\%$  y  $11.1 \pm 2.3\%$  de células CD3-ε<sup>-</sup> de alta fluorescencia respectivamente, mientras que los suplementados tuvieron  $13.6 \pm 2.3\%$  y  $12.3 \pm 2.3\%$  en los mismos tiempos de análisis. El total de células de timo que expresan CD3-ε (la suma de las que tienen baja y alta fluorescencia) indicó que no hay interacciones significativas entre dieta y tiempo ( $P = 0.072$ ). Las células de timo CD3-ε<sup>-</sup>

de los ratones alimentados con dieta control tuvieron un promedio general a lo largo de las 20 semanas de experimentación de  $76.7 \pm 1.6\%$ , las de los ratones con dieta suplementada de biotina de  $73.0 \pm 1.6\%$  y los animales con dieta depletante de biotina  $81.1 \pm 1.6\%$ .



## DISCUSIÓN

Hay evidencias aisladas que sugieren que la deficiencia de biotina produce, tanto en humanos como en animales de experimentación, un efecto dañino sobre el funcionamiento del sistema inmunitario. En humanos y animales de experimentación éstos incluyen: mayor susceptibilidad a infecciones (particularmente por hongos), carencia o menor producción de anticuerpos en respuesta a diversos antígenos y disminución en los linfocitos circulantes (2, 68). En animales de experimentación se pueden agregar además: disminución del peso corporal así como del bazo, del timo y de nódulos linfáticos intestinales (59-60); cambios en la cantidad y proporciones de leucocitos circulantes (21); menor concentración de DNA total en bazo y timo (60) y menor generación *in vitro* de linfocitos T citotóxicos (20). Sin embargo, los procesos que provocan estos síntomas se desconocen.

Este estudio se llevó a cabo para obtener mayor conocimiento acerca del proceso por el cual la deficiencia de biotina afecta al estado funcional del Sistema Inmunitario de los ratones. Se escogió esta especie porque es en los mamíferos, después de los humanos, en los que mejor se ha estudiado el Sistema Inmune. En contraste, el estudio experimental de las alteraciones metabólicas inducidas por la deficiencia de biotina se ha llevado a cabo principalmente con ratas. Esta es la razón por la que paralelamente se determinaron algunos indicadores del estado funcional de biotina en los ratones BALBc/AnN alimentados con dietas control, suplementada y deficiente de biotina. Estos indicadores fueron: la concentración sérica de biotina libre y la actividad específica de PCC y PC en hígado, bazo y timo.

La deficiencia de biotina fue inducida en los ratones (grupo deficiente) proporcionándoles una dieta comercial sin biotina que contiene clara de huevo seca como única fuente de proteína. Un grupo equivalente de ratones se alimentó con una dieta igual pero suplementada con 0.004 g biotina/kg de alimento (grupo suplementado). Esta cantidad de la vitamina representa un exceso de la que puede secuestrar la avidina en la clara de huevo, lo que asegura que los ratones puedan recibir la cantidad de biotina recomendada por el Subcomité sobre Nutrición de Animales de Laboratorio del Consejo Nacional de Investigación de Estados Unidos de Norteamérica (39). Un grupo equivalente de ratones que recibió una dieta comercial no purificada se usó como control. No hubieron diferencias estadísticamente significativas entre los ratones de los grupos control y suplementado, para ninguno de los indicadores estudiados, como son: crecimiento, concentración sérica de biotina libre, actividad específica de PCC y PC en hígado, bazo y timo, captura de [<sup>3</sup>H]-timidina por linfocitos de bazo inducida por ConA, proporciones relativas de células de bazo slg<sup>+</sup> (linfocitos B) y CD3-ε<sup>+</sup> (linfocitos T) y proporciones relativas de células de timo que expresan los marcadores CD4 y CD8. Esto indica que la dieta comercial suplementada con biotina que se les proporcionó a estos ratones, contiene todos los nutrimentos necesarios para un desarrollo y crecimiento adecuado. Debido a que la misma dieta (pero sin el suplemento de biotina) se les suministró a los ratones del grupo deficiente, se puede decir que las diferencias observadas entre estos ratones y los de los grupos control y suplementado pueden atribuirse directamente a la ausencia de biotina en la dieta.

La deficiencia de biotina afecta el crecimiento de los ratones, ya que los ratones de los grupos control y suplementado casi duplican su peso durante las primeras 13 semanas en experimentación, manteniendo el mismo peso de ahí en adelante. Mientras tanto, los ratones

del grupo deficiente incrementaron su peso a la par que los ratones con dietas control y suplementada en 23.4% durante las primeras 2 semanas. de aquí a la tercera alcanzaron el máximo incremento de un 30.1% y de este tiempo hasta la semana 20 perdieron peso alcanzando el que tuvieron al inicio del estudio. La biotina es un factor de crecimiento esencial (25), por lo que este efecto era esperado en los ratones deficientes. Se considera que el periodo inicial de ganancia de peso (primeras dos semanas con dieta depletante de biotina) puede reflejar el tiempo que tarda el organismo en depletarse de biotina sin mostrar afectación. A partir de este momento, el crecimiento es limitado entre la 2ª y 3ª semana para suspenderlo totalmente desde este momento hasta la 7ª semana. De ahí en adelante, ya no es posible enfrentar la carencia de biotina y el cuerpo pierde peso gradualmente mientras prevalezca la falta de suministro de la vitamina.

El diseño de este estudio no permite determinar un índice de mortalidad por deficiencia de biotina. Sin embargo, los ratones macho Balb/cAnN con dieta depletante de biotina cuando se encuentran en condiciones de temperatura ambiental entre 15° y 27° C, aproximadamente el 4% de ellos muere después de cuatro meses de experimentación y los que no fueron sacrificados a lo largo del mismo mueren después de 25 a 27 semanas (datos no presentados).

El intervalo de la concentración de biotina libre sérica en los ratones del grupo control fue de 9.9 - 54.1 nM y en los del grupo suplementado fue 10.2 - 74.6 nM, la cual no fue diferente significativamente. Hasta donde se conoce, no hay otro estudio en el que se haya determinado este parámetro en ratones, aunque Fields y cols. (65) reportaron una concentración similar en el suero de ratas normales de la cepa Sprague-Dawley. En contraste, los ratones deficientes tuvieron un intervalo de concentración de biotina libre

sérica de 2.1 - 4.5 nM. Como se mencionó en Materiales y Métodos, el procedimiento que se utilizó en este estudio para determinar la concentración de biotina libre está fundamentado en el uso de avidina como ligando. Recientemente se reportó que solamente la mitad de las sustancias del suero humano que se unen a avidina, corresponden a biotina, siendo la otra mitad sulfóxido de biotina y bisnorbiotina (66). Se considera que estos hallazgos no invalidan la conclusión de que en el suero de los ratones controles y suplementados se encontraron concentraciones similares de biotina libre sérica y que éstas fueron significativamente mayores que las de los ratones del grupo deficiente. La baja concentración de  $B_{I_5}$  en los ratones del grupo deficiente puede sugerir que en general, las células de estos ratones tienen un suministro limitado de biotina para llevar a cabo el paso final de la síntesis de las enzimas dependientes de biotina. Sin embargo, según Bonjour (67), todavía no hay una interpretación adecuada de las bajas concentraciones séricas de biotina.

Los pesos del bazo, timo e hígado, fueron afectados diferencialmente por la deficiencia de biotina. Con referencia al peso del órgano correspondiente en los ratones controles y suplementados, el menos afectado fue el hígado y el más afectado el timo. A las dos semanas con la dieta deficiente de biotina, el bazo, el timo y el hígado de estos ratones fue menor en un 33.7%, 26.5% y 13.6%, respectivamente. A las cuatro semanas de estudio, sólo el timo y el hígado disminuyeron más, hasta un 44.5% y 25% respectivamente, mientras que el bazo permaneció alrededor del mismo decremento. Entre las 16 y 20 semanas, el bazo había disminuido hasta en 60.4%; el timo hasta en 69% y el hígado a las 16 semanas seguía mostrando un 25% de disminución y finalmente llegó al 45.7% en la semana 20.

No hay una correlación directa entre el efecto de la deficiencia de biotina sobre el peso corporal y el efecto sobre el peso los órganos estudiados en los ratones depletados de

la vitamina. El tamaño del hígado disminuyó solamente entre las 2 y 4 semanas de estudio (menor en 13.6% y 25% respectivamente), mientras que el peso corporal a las 2 semanas fue igual para los tres grupos y disminuyó en 12.2% a las 4 semanas. A las 8, 12 y 16 semanas el peso del hígado fue menor en 25%, mientras que el peso corporal tuvo un decremento de 21.5%, 39.0% y 39.3%. A la 20ª semana la disminución del peso del hígado y del peso corporal fueron 45.7% y 44.6% respectivamente.

Tampoco hay correlación entre la celularidad del bazo, su peso y el peso corporal. Desde las cuatro semanas y hasta las 16 semanas en experimentación, los bazos de los ratones del grupo deficiente contenían tan solo el 50% de las células que se obtenían de los bazos de los ratones controles y a las 20 semanas el porcentaje fue del 34%. Desde este punto de vista, estos resultados sugieren que la biotina puede tener una función importante en órganos linfoides primarios y secundarios.

Las actividades específicas promedio de PCC y PC en el hígado de los ratones controles y suplementados fueron 72 y 130 nmol CO<sub>2</sub> fijadas x min<sup>-1</sup> x mg proteína<sup>-1</sup>, respectivamente. Estas actividades específicas de PCC y PC son 8 y 25 veces más altas, respectivamente, que las encontradas en los hígados de las ratas (69). Estas diferencias en el contenido enzimático pudieran reflejar diferencias entre especies o entre distintas cepas de la misma especie. Un factor adicional que pudo haber contribuido a las altas actividades enzimáticas de este estudio puede ser de tipo metodológico, ya que se usó una solución hemolizante para eliminar los eritrocitos. En cambio, hasta donde se sabe, no se ha reportado otro estudio que haya medido las actividades enzimáticas de PCC y PC en células de bazo y timo.

A diferencia de los cambios en los pesos de estos órganos, en términos generales la deficiencia de biotina provoca una disminución en las actividades específicas de las dos enzimas utilizadas como indicadores del estado funcional de biotina, desde las cuatro semanas en experimentación. En promedio, la actividad específica de PCC en hígado, bazo y timo de ratones deficientes fue 80%, 76.1% y 86.1% menor y la de la PC 82.9%, 62.9% y 86.6% menor a las actividades en los órganos de los animales control.

La dieta depletante de biotina ocasionó un cambio significativo en el estado funcional de la vitamina, como lo prueban los cambios observados en la concentración sérica de biotina libre así como en las actividades específicas de dos de las enzimas que utilizan a la biotina como cofactor (PCC y PC) en el hígado, bazo y timo de los ratones. En el hígado, aunque a las cuatro semanas ya se observó una marcada reducción en la actividad de las dos enzimas, la máxima disminución se alcanzó después de 8 semanas, permaneciendo en este nivel por el resto del tiempo de estudio.

No obstante las pronunciadas diferencias en la actividad específica de PCC y PC en los linfocitos del bazo, la incorporación de [<sup>3</sup>H] timidina por los esplenocitos de los ratones deficientes de biotina fue tan sólo 25 a 30% menor que la captada por las células de bazo de los ratones controles. Sin embargo, se mostró que la deficiencia de biotina indujo un enriquecimiento relativo de las células T del bazo, ya que en los bazos de los animales control, en promedio, el 45% de las células son del tipo T, mientras que en los bazos de los ratones deficientes aproximadamente el 54% de los linfocitos son del subtipo T (Figura 10). En virtud de que la ConA es un mitógeno específico de células T, se puede estimar aproximadamente que en los ratones controles, 42% de  $2.5 \times 10^5$  células incorporaron 181 Bq (1.73 mBq/célula), mientras que para los ratones deficientes, el 54% de  $2.5 \times 10^5$  células

incorporaron 124.5 Bq (0.92 mBq/célula). Entonces, con base en una relación de célula a célula, la incorporación de [<sup>3</sup>H]timidina por los esplenocitos de ratones deficientes de biotina fue aproximadamente 46% menor que en las células de bazo de los animales controles. Se considera que esta respuesta disminuida no se debió a la baja actividad específica de las carboxilasa dependientes de biotina durante los ensayos de proliferación, porque la adición de biotina al medio de incubación (800 nM final) aumentó la actividad de las dos enzimas (Tabla 7), aunque no tuvo ningún efecto en la incorporación de [<sup>3</sup>H]timidina. Más bien, esto pudiera ser el resultado de un desarreglo funcional de las células inmunes en los animales alimentados con la dieta depletante de biotina, el cual no puede revertirse con la incubación en un medio que la contiene.

El porcentaje de células slg<sup>+</sup> (células B) en el bazo, fue significativamente menor en los ratones del grupo deficiente (27% a las 12 semanas) que en los ratones de los grupos control y suplementado (47% en promedio para ambos grupos) con un incremento concomitante en el porcentaje de células T (54% vs.42%). Este aumento en células T se debió principalmente al aumento en la proporción de células del fenotipo CD4 (ayudadoras) (71). Estos resultados sugieren que la depleción de biotina afecta diferencialmente, la producción, maduración, o ambas, de las células B y T.

Debido a que no hay una correlación directa entre los trastornos sobre el Sistema Inmune y las actividades enzimáticas de PCC y PC, es probable que la deficiencia de biotina actúe por un mecanismo indirecto y/o independiente de las enzimas biotiniladas.

La cantidad relativamente menor de células B pudiera correlacionarse con la respuesta disminuida de anticuerpos y de células formadoras de placa que se ha reportado en ratas deficientes de biotina (17-19). Sin embargo, no se detectaron diferencias en la

respuesta de anticuerpos a la inmunización con DNP-OVO. Esto puede deberse a que se utilizó un esquema de inmunización diseñado para inducir una respuesta vigorosa (adyuvante, inmunizaciones repetidas) o bien a que el inmunógeno utilizado no fue el adecuado. Es probable que en condiciones subóptimas de inmunización, o en respuestas a otros retos antigénicos, la disminución absoluta del número de linfocitos T y B resulte en una respuesta disminuida.

El timo es el órgano en donde maduran los linfocitos T, mediante un proceso de selección que ha empezado a dilucidarse (ver Apéndice D). En el proceso de maduración de linfocitos T inmaduros a linfocitos T maduros, estas células atraviesan por cuatro etapas definidas por la expresión de los antígenos CD4 y CD8 (72). Un esquema de la secuencia propuesta está en la **Figura 12** y es la siguiente:

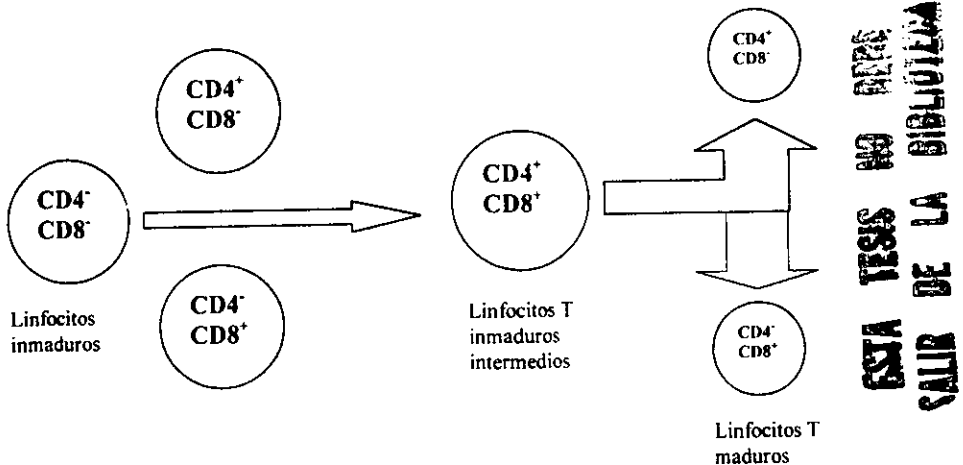
- i) Linfocitos T inmaduros, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (dobles negativos).
- ii) Etapa intermedia de corta duración, linfocitos T inmaduros CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> ó CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>.
- iii) Etapa media, linfocitos T inmaduros CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>.
- iv) Etapa final, linfocitos T maduros CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> ó CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>.

Los datos presentados en esta investigación muestran que la deficiencia de biotina induce, después de las 12 semanas, un aumento significativo de las células CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>; CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> y CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>. También se observó una disminución de las células CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. Estos resultados pueden indicar un arresto de la maduración de los linfocitos antes de su conversión a células dobles positivas. La incapacidad de las células de completar su maduración, provoca la acumulación en el timo de células inmaduras tanto dobles negativas como positivas sencillas (Figuras 10 y 11).



Resumiendo, se han caracterizado los efectos de una dieta depletante de biotina sobre ratones. El crecimiento se afectó severamente y más profundamente las actividades de PCC y PC en hígado, bazo y timo. Los datos presentados en este trabajo identificaron cuatro efectos que se cree afectan la capacidad del Sistema Inmunitario para el montaje de una respuesta adecuada contra un reto antigénico. Éstos son: proliferación deprimida de células T en respuesta a un estímulo mitogénico, disminución en el peso del bazo y del timo, menor cantidad de células B en el bazo y un arresto en la maduración de células T en el timo. Lo cual indica que la deficiencia de biotina tiene importantes efectos sobre el Sistema Inmune de los ratones.

Aunque se requiere de investigaciones detalladas de otros posibles indicadores de la disfunción inmune, este modelo animal puede ser de utilidad para explorar tanto, los mecanismos que subyacen en este fenómeno en particular, como para profundizar en el estudio de los efectos de la deficiencia de biotina en el Sistema Inmunitario en general.



**Figura 12.** Esquema de la maduración de los linfocitos T en el timo.

ESTA TESIS NO DEBE  
 SALIR DE LA BIBLIOTECA

## APÉNDICE A

## APÉNDICE A

# Biotin deficiency induces changes in subpopulations of spleen lymphocytes in mice<sup>1-3</sup>

Armida Báez-Saldaña, Georgina Díaz, Bertha Espinoza, and Enrique Ortega

**ABSTRACT** Biotin deficiency is known to affect immune function in both humans and experimental animals. In this study, we determined the effect of biotin deficiency on 4-wk-old Balb/cAnN mice during 20 wk of experimentation. The growth rate of mice slowed significantly during the first 6 wk of consumption of a diet designed to induce biotin deficiency; thereafter, from weeks 7 to 20 there was progressive weight loss in the mice receiving the biotin-deficient diet. In the livers of biotin-deficient mice, the specific activities of two biotin-dependent enzymes—pyruvate carboxylase and propionyl-CoA carboxylase—decreased by as much as 75% and 80%, respectively, and in spleen lymphocytes the specific activities of these two enzymes decreased by 63% and 75%, respectively. With respect to the effects of biotin deficiency on the immune system, we observed statistically significant changes in both the absolute number of spleen cells and in the proportions of spleen cells carrying different phenotypic markers: after 16 wk the percentage of cells expressing surface immunoglobulin (sIg) decreased from 47% (control and supplemented) to 27% (deficient) and CD3<sup>+</sup> cells increased from 42% (control and supplemented) to 54% (deficient). The mitogen-induced proliferation of spleen cells from deficient mice was lower than that of spleen cells from the control mice. These findings suggest that biotin could have an important role in lymphocyte maturation and responsiveness to stimulation, and consequently in the capacity of the immune system to respond to an antigenic challenge. *Am J Clin Nutr* 1998;67:431-7.

**KEY WORDS** Biotin deficiency, pyruvate carboxylase, propionyl-CoA carboxylase, immune system, mice, spleen, lymphocyte subsets

### INTRODUCTION

Biotin is a water-soluble vitamin of the B complex that serves as a cofactor of four enzymes: propionyl-CoA carboxylase (PCC), pyruvate carboxylase (PC), methylcrotonoyl-CoA carboxylase, and acetyl-CoA carboxylase. The first three of these enzymes are found in mitochondria and the fourth in the cytoplasm. These four enzymes participate in various pathways in the metabolism of proteins, lipids, and carbohydrates (1).

Studies of patients with impaired biotin metabolism and of biotin-deficient animals have established that normal biotin intake and metabolism are important for the defense mechanisms of the organism. Two defects in the biotin utilization cycle are known in humans; abnormalities in the activity of either holo-

carboxylase synthetase (the enzyme responsible for covalently attaching biotin to specific lysine residues on the carboxylases) or in biotinidase (the enzyme responsible for detaching biotin from biocytin) result in multiple carboxylase deficiency, which has been reported to be associated with clinical manifestations of immune dysfunction, including mucocutaneous candidiasis, hypogammaglobulinemia with immunoglobulin A (IgA) deficiency, overwhelming infections, and a diminished antibody response to *Candida* or pneumococcal antigens (2, 3). Some clinical symptoms of multiple carboxylase deficiency have been reported to disappear after the oral administration of biotin (4).

Likewise, biotin-deficient rats showed a weak antibody response against diphtheria toxoid (5) as well as a lower number of antibody-forming cells in the spleens of the rats immunized previously with sheep erythrocytes (6). In another study, an important reduction in the size and cellularity of the thymus was found in biotin-deficient rats, which also had a depressed immune response against sheep erythrocytes and did not develop experimental allergic encephalomyelitis after immunization with myelin basic protein (7). Biotin has also been shown to be essential for the *in vitro* generation of cytotoxic T lymphocytes from mouse spleen (8). In guinea pigs, biotin deficiency induced an increase in the number of circulating neutrophils and a decrease in lymphocytes carrying B and T cell markers (9).

The clinical and experimental evidence summarized above indicates that biotin deficiency has significant effects on the ability of the organism to mount an adequate immune response. However, the precise functions that are affected, the possible differences in biotin metabolism among species, as well as the pathogenesis of the immune deficiency remain to be established.

We studied the effect of biotin deficiency on indicators of the immune function in mice. We assessed the functional state of biotin in the same experimental animals, as reflected in the serum concentration of free biotin and in the specific activity in liver and spleen of two biotin-dependent enzymes: PC and PCC.

<sup>1</sup> From the Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

<sup>2</sup> Supported by research grants UNAM (IN204696) and CONACYT (3154P-N9607) from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico, México.

<sup>3</sup> Address reprint requests to E. Ortega, Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Ap Postal 70228, CP 04510, México DF.

Received April 23, 1997.

Accepted for publication August 12, 1997.

## MATERIALS AND METHODS

### Mice

Male Balb/cAnN mice were obtained from the breeding colony of the Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Two different lots of animals were used for this study, one consisting of 54 animals and another of 24 animals. Each lot of animals was divided into three experimental groups: control, biotin supplemented, and biotin deficient. After weaning (at 3–4 wk of age) and for up to 20 wk the control group was fed a commercial, nonpurified diet (8626 Teklad Mouse Breeder Diet; Harlan Teklad, Madison, WI); animals in the deficient group received a biotin-depleting diet lacking biotin and with 30% dried egg white as a protein source (catalog no. TD-81079; Harlan Teklad), whereas animals in the supplemented group received a modified biotin-depleting diet, which contains 0.004 g biotin/kg diet (catalog no. TD-96075; Harlan Teklad). Egg white contains avidin, a glycoprotein that binds biotin, forming a noncovalent complex that is not absorbed into the blood (1). Animals were maintained on 12-h light and dark cycles and allowed water and the respective food ad libitum.

At the indicated times after beginning the respective diet, mice from the three experimental groups were bled from the axillary plexus under ethilic ether anesthesia. After bleeding, the animals were killed by cervical dislocation and the spleen and liver of each animal was removed for subsequent use.

The guidelines followed were those of an institutional committee for animal care and use, composed of scientists and the veterinarian in charge of the animals, in accordance with international standards of experimentation in animals.

### Determination of free biotin in serum

Sera were separated by centrifugation at  $1200 \times g$  at room temperature for 10 min and were kept frozen at  $-20^\circ\text{C}$  until used. For determination of free biotin, the vitamin was extracted with four volumes of absolute ethanol, and the ethanolic extract was dried in a Speed-Vac concentrator-evaporator (Savant Instruments, Farmingdale, NY). Dried extracts were kept at  $4^\circ\text{C}$  until used. The concentration of biotin was determined by a competitive radioassay as follows: immediately before measurement the dried extracts were resuspended in a volume of a solution of 44.5 mmol tris-HCl/L, 44.5 mmol sodium borate/L, 1 mmol EDTA/L, and 200 mg sodium azide/L in water, pH 7.4 (TBE), equal to the original volume of serum. From this, an appropriate aliquot was taken and diluted with TBE to obtain a final volume of 200  $\mu\text{L}$ , to which 0.22 kBq *d*-[8,9]-( $^3\text{H}$ )-biotin (specific activity: 1665 GBq/mmol; DuPont NEN Research Products, Boston) and 0.16 pmol avidin (Sigma Chemical Co, St Louis) were added. The reaction mixture was then incubated for  $24 \pm 2$  h at  $4^\circ\text{C}$  in an orbital shaker at 200 rpm. Anti-avidin polyclonal antibodies coupled to Sepharose (Pharmacia, Uppsala, Sweden) were added and incubation continued for another  $24 \pm 2$  h. After centrifugation at  $130 \times g$  for 3 min at  $4^\circ\text{C}$ , half of the supernate was taken to determine the concentration of unbound [ $^3\text{H}$ ]biotin by scintillation counting in an LS6500 liquid scintillation counter (Beckman, Fullerton, CA). The percentage of [ $^3\text{H}$ ]biotin bound was calculated by the difference between total and unbound [ $^3\text{H}$ ]biotin. The biotin concentration in each sample was assessed by interpolation in a logit-log standard curve drawn by using the percentage of maximal [ $^3\text{H}$ ]biotin bound observed for solutions containing from 0 to 320  $\mu\text{g}$  biotin in 200  $\mu\text{L}$  TBE.

Nonspecific binding (in the absence of avidin) was in the range of from 0% to 6% ( $n = 25$ ) and the maximum binding was adjusted to between 70% and 85%. Under these conditions the assay can properly determine from 20 to 300  $\mu\text{g}$  biotin per reaction tube. The interassay CV of a pooled sample assayed in parallel was 15%. The recovery efficiency in sera to which known amounts of biotin were added was  $96.5 \pm 10\%$  ( $n = 20$ ).

### Determination of enzymatic activity of PCC and PC

After 4, 8, 12, 16, and 20 wk of experimentation, the liver and spleen of three animals from each experimental group were removed as described above. The organs were taken immediately and kept at  $-70^\circ\text{C}$  until used. The spleens were placed in ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and a cell suspension was prepared. After the cells were washed with PBS, erythrocytes were hemolyzed by hypotonic shock as described elsewhere (10). The cell suspension was centrifuged at  $400 \times g$  for 5 min at  $4^\circ\text{C}$  and the pellet was kept frozen at  $-70^\circ\text{C}$  until used.

To determine the enzymatic activities of PCC and PC, the livers were thawed and homogenized with a polytetrafluoroethylene piston in seven volumes of ice-cooled PBS. The homogenate was centrifuged at  $1200 \times g$  for 10 min at  $4^\circ\text{C}$  and the supernate was discarded. The erythrocytes were destroyed by pouring 1 mL ammonium chloride lysing buffer onto the cell pellet for 2 min (10), followed by the addition of 10 volumes of cold PBS. After centrifugation, the supernate was discarded and eight volumes of cold PBS were added. This cell suspension was diluted 1:4 with tris lysis buffer (50 mmol tris/L, 0.025 mmol EDTA/L, pH 8.0) and cells were disrupted with an Ultrasonic Homogenizer (4710 Series; Cole Parmer Instrument Co, Chicago) at 24 W (two cycles of  $20 \times 1$  s). Enzymatic activity was determined in 10  $\mu\text{L}$  of the sonicated samples by a radioenzymatic method (11). The assay was linear up to 4  $\mu\text{g}$  protein for 120 min. Aliquots of the homogenates containing 2  $\mu\text{g}$  protein in 10  $\mu\text{L}$  were used and the reactions were incubated for 60 min. Protein concentrations in the sonicates were determined by the Bradford method (12).

To determine enzymatic activities of PCC and PC in spleen cells, the frozen pellets were thawed, resuspended in 1 mL lysis buffer/ $20 \times 10^6$  cells, and sonicated as described above for the liver. PC and PCC activities were determined by the same radioenzymatic method (11).

### Concanavalin A-induced proliferation of spleen cells in vitro

Proliferative assays of spleen cells stimulated with the T cell mitogen concanavalin A (ConA) was performed essentially as described (10). The tissue culture medium was Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% biotin-free fetal calf serum (FCS), 2 mmol L-glutamine/L, 100 mg streptomycin/L, and  $100 \times 10^3$  U penicillin/L. Biotin-free FCS was prepared by incubating FCS (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) with avidin-Sepharose (Sigma Chemical Co) for 16 h at  $4^\circ\text{C}$  in an orbital shaker at 200 rpm. Before being added to the medium, the serum was separated by centrifugation at  $150 \times g$  for 5 min at  $4^\circ\text{C}$  and sterilized by filtration through a 0.22- $\mu\text{m}$  filter membrane (Millipore Corp, Bedford, MA). Biotin concentrations in the FCS before and after incubation with avidin-Sepharose were 106 and 0.4 nmol/L, respectively. Because avidin-Sepharose chromatography has been shown to retain quantitatively carboxylases with covalently bound biotin from various sources (13, 14), it is assumed that the procedure removes all biotin

(free, reversibly bound, and covalently bound) present in the FCS.

Three mice per group were killed and their spleens were removed. Spleen cell suspensions were prepared in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% biotin-free FCS and seeded in microwells ( $2.5 \times 10^5$  cells/well). The cells were incubated with 0, 10, and 800 nmol biotin/L and 0, 1.0, and 5.0 mg ConA/L (Sigma Chemical Co) in a total volume of 200  $\mu$ L. Each experimental condition was assayed in triplicate wells. At the end of a 48-h period, [ $^3$ H]thymidine (18.5 kBq/well, catalog no. NET-027, specific activity: 247.9 GBq/mmol; DuPont NEN Research Products) was added and incubation continued for 24 h. [ $^3$ H]thymidine incorporation was determined after the cells were harvested automatically onto filter papers with a cell harvester (Skatron Instruments, Sterling, VA). Radioactivity in the filters (Printer Filter-mat A; Pharmacia) was quantitated by scintillation counting in a 1205 Betaplate (Wallac Oy, Turku, Finland).

#### Determination of lymphocyte subpopulations

At the indicated times, three mice from each group were killed and their spleens removed as described above. Single-cell suspensions of spleen cells from each mouse were stained (15) with fluorescein anti-mouse Ig (Zymed Laboratories, South San Francisco), fluorescein anti-mouse CD3- $\epsilon$  (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany), fluorescein anti-mouse CD4, or phycoerythrin anti-mouse CD8 (GIBCO BRL) for 60 min on ice. The cells were washed, fixed with 1% paraformaldehyde, and analyzed in a FACScan cytofluorometer (Becton Dickinson, San Jose, CA). The results are expressed as the percentage of positive cells for each marker (eg, %Ig\*).

#### Statistical analysis

Results are reported as means  $\pm$  SDs. The statistical analysis of the differences among the three experimental groups was performed by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by an all pairwise multiple comparison by the Student-Neuman-Keuls method. SIGMASTAT software (Jandel Scientific Software, Rafael, CA) was used for this analysis.

## RESULTS

The data presented in this section are the combined data obtained from two different lots of male Balb/cAnN mice studied.

#### Effect of biotin deficiency on body weight

Mice in the control, supplemented, and deficient groups were weighed individually every week; the results are shown in Figure 1. Mice of the control group showed a steady weight gain during the 20 wk of the study, from  $17.3 \pm 2.36$  g at week 0 ( $n = 26$ ) to  $31.4 \pm 1.4$  g at week 20 ( $n = 3$ ). The growth curve of the supplemented mice was similar to that of the control group, increasing from  $17.2 \pm 2.0$  g at week 0 ( $n = 26$ ) to  $30.1 \pm 0.7$  g at week 20 ( $n = 3$ ). The growth curve of mice that received the biotin-depleting diet showed a biphasic pattern: from  $17.1 \pm 2.3$  g at week 0 ( $n = 26$ ) it reached a maximum of  $23.6 \pm 1.4$  g at week 6 ( $n = 20$ ) and decreased thereafter to  $17.0 \pm 2.3$  g at week 20 ( $n = 3$ ). A two-way ANOVA was performed with weight data at 0, 2, 4, 8, 12, 16, and 20 wk for the three mice of each group that were killed at week 20 (the rest of the mice in each group were killed at different times). Significant differences were

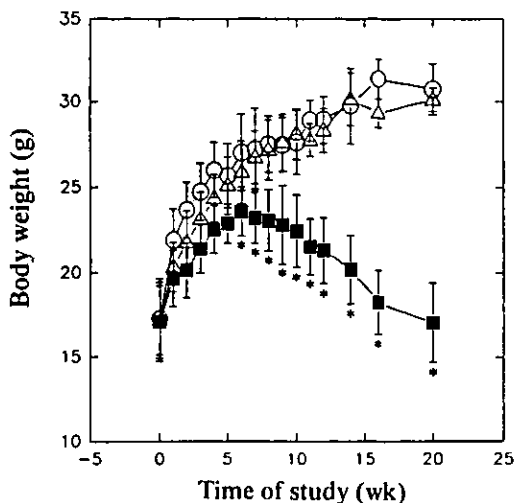


FIGURE 1. Mean ( $\pm$  SD) corporal weight of male Balb/cAnN mice fed a commercial nonpurified diet (O, control group), a biotin-depleting diet supplemented with biotin ( $\Delta$ , supplemented group), or a biotin-depleting diet ( $\blacksquare$ , deficient group). For the three groups,  $n = 26$  (weeks 0-4),  $n = 20$  (weeks 5-8),  $n = 14$  (weeks 9-12),  $n = 9$  (weeks 13-16),  $n = 6$  (weeks 17-18), and  $n = 3$  (weeks 19-20). \*Significantly different from the control and supplemented groups,  $P < 0.05$ .

found between the deficient and the control groups and between the deficient and the supplemented groups ( $P < 0.05$ ), whereas no significant difference was found between the control and supplemented groups. Also, there was a significant interaction between diet and time ( $P < 0.001$ ).

#### Clinical symptoms associated with biotin deficiency

Mice were observed every week by the same veterinarian to determine any pathologic signs. In addition to the smaller size of mice in the deficient group, some of these mice showed alopecia, which was more severe in the areas surrounding the mouth and anus. The biotin-deficient group also adopted a squatted position. No other pathologic signs were detected by the veterinarian.

#### Concentration of free biotin in sera

Concentrations of free biotin in sera of the experimental animals were measured 4, 8, and 16 wk after the study started. The concentration of free biotin in the sera of control mice was  $40.5 \pm 11.8$  nmol/L ( $n = 12$ ). The concentration of free biotin in the sera of mice from the supplemented group was  $54.5 \pm 17.0$  nmol/L ( $n = 12$ ). The concentration of free biotin in sera of mice in the deficient group was 3.66, 3.87, and 2.97 nmol/L at 4, 8, and 16 wk, respectively, yielding a global average of  $3.46 \pm 0.77$  nmol/L ( $n = 12$ ). Thus, the concentration of free biotin in the sera of mice from each experimental group remained fairly constant during the study.

#### Effect of biotin deficiency on enzymatic activities of carboxylases

The enzymatic activities of PCC and PC in liver homogenates and in spleen cells of mice from the three experimental groups

were determined at the beginning of the study and at 4, 8, 12, 16, and 20 wk of experimentation (Figure 2). On the whole, specific activities of both enzymes were higher in the liver than in the spleen. In the liver of the control mice, the specific activity of PC was twofold higher than that of PCC; in contrast, in spleen cells the specific activity of PCC was 5–8-fold higher than that of PC. In general, the specific activities of both enzymes in the organs of mice in the supplemented group were similar to the corresponding values of the control group whereas the activities of both enzymes in mice from the deficient group were smaller.

A two-way ANOVA was performed to analyze differences in the specific activity of each carboxylase in both liver and spleen. No significant differences were found between the activities of both enzymes in mice from the control and supplemented groups. In contrast, there were significant differences in the specific activities of each enzyme in both liver and spleen between the deficient and control groups and between the deficient and supplemented groups ( $P < 0.05$ ). A significant interaction between time and diet was observed for PC in the liver and for PCC and PC in the spleen ( $P = 0.018$ ,  $P = 0.006$ , and  $P = 0.014$ , respectively). No significant interaction between time and diet was found for PCC in the liver ( $P = 0.061$ ).

#### Concanavalin A-induced proliferation of spleen lymphocytes

The spleens of mice in the deficient group were consistently smaller than the spleens of the supplemented and control mice,

which was reflected in the lower number of cells obtained from them. The average number of cells obtained from the spleen of control and supplemented mice was  $120 \times 10^6$  cells; from the spleen of deficient mice the average number was  $54 \times 10^6$  cells (Table 1).

At different times after the specific diets began, the spleen cells from three mice from each group were used to measure proliferation induced by the T cell mitogen ConA. To assess the possible effect of biotin during the proliferative assay, the cells from each mouse were simultaneously assayed in culture media containing exogenously added biotin at concentrations of 0, 10, or 800 nmol/L. In all experiments conducted, maximum [ $^3$ H]thymidine incorporation was observed at 5 mg ConA/L. The results from a representative proliferative assay performed 18 wk after the biotin-depleting diet started are summarized in Table 2. Despite variations in the net mean becquerels incorporated after ConA stimulation in different experiments (ranging from 64 to 327 Bq), the results from experiments with spleen cells obtained at 4, 8, 12, or 18 wk after the specific diets began showed essentially the same pattern: the spleen cells from the supplemented and control groups showed a similar [ $^3$ H]thymidine uptake whereas the net uptake by cells from deficient mice was smaller by 20–25%. However, two-way ANOVA revealed no significant differences among the three groups. Note that in all experiments the presence or absence of biotin in the culture medium had no effect on the proliferation of spleen cells from animals belonging to any of the experimental groups (Table 2).

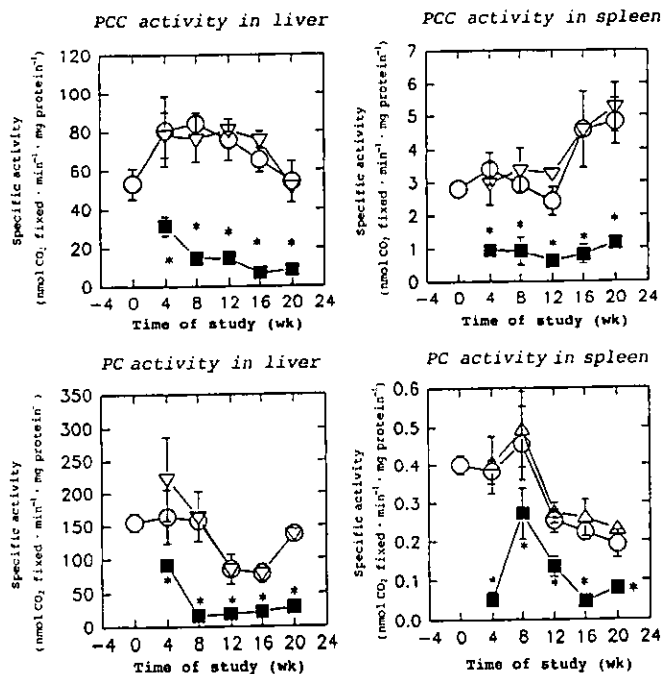


FIGURE 2. Specific activity of propionyl-CoA carboxylase (PCC) and pyruvate carboxylase (PC) in liver and spleen. Mice aged 3–4 wk were fed a commercial nonpurified diet (O, control group), a biotin-depleting diet supplemented with biotin (Δ, supplemented group), or a biotin-depleting diet (■, deficient group). Results are reported as the mean  $\pm$  SD of three animals per group for each time point. \*Significantly different from the control and supplemented groups,  $P < 0.05$ .

TABLE 1  
Number of cells in the spleen of mice in the three groups<sup>1</sup>

Time of study	Control	Supplemented	Deficient
4 wk	120 ± 19 [3]	117 ± 31 [3]	59 ± 18 [3]
8 wk	126.5 ± 16 [3]	121.6 ± 7 [3]	61.5 ± 12 [3]
12 wk	108.9 ± 17 [3]	98.8 ± 20 [3]	48 ± 9 [3]
16 wk	114 ± 6 [6]	137.6 ± 25 [6]	55.6 ± 11 [6]
20 wk	137 ± 17 [3]	128 ± 13 [3]	45.6 ± 9 [3]

<sup>1</sup>  $\bar{x} \pm$  SD (millions of cells); *n* in brackets. Mice started receiving the corresponding diet after weaning. At the indicated times, the spleens were removed and disaggregated in Dulbecco's modified Eagle's medium. The number of cells obtained were counted in a hemocytometer.

#### Effect of biotin deficiency on subpopulations of lymphocytes in spleen

Percentages of cells expressing CD3- $\epsilon$ , CD4, CD8, and surface immunoglobulin (sIg) in the spleens of mice from the three experimental groups are shown in Figure 3. The percentage of CD3, CD4, and CD8 cells was higher and the percentage of sIg<sup>+</sup> cells lower in the deficient mice than in the control and supplemented mice. Two-way ANOVA showed that for each of the four markers there were significant differences between the deficient and control groups as well as between the deficient and supplemented groups ( $P < 0.05$ ). There were no significant differences in any of the four markers between the supplemented and control groups. There was a significant interaction between time and diet for sIg<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, and CD8<sup>+</sup> markers ( $P < 0.001$ ).

#### DISCUSSION

Fragmented pieces of evidence have suggested that biotin deficiency has a deleterious effect on several immune phenomena, including a higher susceptibility to infections (particularly fungal infections), a diminished antibody response against various antigens, and a decrease in circulating lymphocytes (2, 16). However, the mechanisms underlying these observations are unknown. This study was undertaken to gain insight into the mechanism by which biotin deficiency affects the immune status of mice. This species was chosen because mice are, after humans, the mammals whose immune system has been most studied. In contrast, the metabolic alterations induced by biotin deficiency have been studied mainly in rats. Thus, we started by determining some indicators of the functional state of biotin in control, supplemented, and biotin-deficient BALB/cAnN mice. These indicators were the concentration of free biotin in serum and the specific activity of PC and PCC in liver and spleen.

Biotin deficiency was induced by giving mice (deficient group) a commercial diet with dried egg white as the protein source and without biotin. An equivalent group of mice was fed a similar diet but supplemented with 0.004 g biotin/kg diet (supplemented group). This amount of biotin was in excess of the biotin that the avidin in the diet could potentially bind, to make sure that the biotin intake was in excess of the biotin requirements recommended by a Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition of the National Research Council (17). An equivalent group of mice that received a commercial nonpurified diet served as the control. No significant differences were found between the control and supplemented mice for any of the indicators studied, including growth, free biotin in serum, specific activity of PC and PCC in liver and spleen, ConA-induced [<sup>3</sup>H]thymidine uptake by spleen lymphocytes, and the relative proportions of sIg<sup>+</sup> (B cells) and CD3- $\epsilon$ <sup>+</sup> (T cells) spleen cells. This indicates that when supplemented with biotin, the commercial diet given to these mice contained all the necessary nutrients for proper growth and development. Because the same diet (but without biotin supplementation) was given to the mice in the deficient group, it can be suggested that the differences observed between these mice and those in the control and supplemented groups were caused by the absence of biotin in the diet.

So significantly did biotin deficiency affect the growth of the mice that whereas the mice in the control and supplemented groups almost doubled their weight during the 20 wk study, those in the deficient group had a weight increase of 36.4% during the first 6 wk but lost weight subsequently, returning to their original weight by the end of the study. Biotin is an essential growth factor and thus the effect of biotin deficiency on growth was expected. The initial period of weight gain (although smaller than that of control mice) could have reflected the time it takes to deplete the biotin stored in tissues.

The average concentrations of free biotin in sera of control and supplemented mice were 40 and 54 nmol/L, respectively, which were not significantly different. We do not know of any study in which free biotin was determined in mice. This concentration is similar to that found by Fields et al (18) in the sera of normal Sprague-Dawley rats. In contrast, the average concentration of free biotin in sera of deficient mice was only 6% of that in sera of control and supplemented mice. As mentioned above, the method used to determine free biotin in this study is based on avidin binding. It was reported recently that only about half of the total avidin-binding substances in human sera correspond to biotin, the rest being biotin sulfoxide and bisnorbiotin (19). We do not think that this could invalidate our conclusion that mice

TABLE 2  
<sup>3</sup>H]Thymidine incorporation by spleen cells<sup>1</sup>

Biotin	Control		Supplemented		Deficient	
	Unstimulated	Stimulated	Unstimulated	Stimulated	Unstimulated	Stimulated
0 nmol/L	0.50 ± 0.14	183 ± 36	0.73 ± 0.28	163 ± 44	0.54 ± 0.13	132 ± 29
10 nmol/L	0.62 ± 0.29	195 ± 42	0.72 ± 0.31	233 ± 60	0.54 ± 0.22	123 ± 31
800 nmol/L	0.68 ± 0.37	166 ± 39	0.66 ± 0.23	172 ± 45	0.45 ± 0.19	119 ± 20

<sup>1</sup>  $\bar{x} \pm$  SD; *n* = 3 per group. Cells from each animal were assayed in triplicate. Mice were sacrificed after 18 wk of receiving the specific diet for each group. Spleen cells ( $2.5 \times 10^5$ /well) were incubated without (unstimulated) or with (stimulated) 5 mg concanavalin A/L in Dulbecco's modified Eagle's medium containing the indicated biotin concentration. After 48 h, [<sup>3</sup>H]thymidine was added and after 24 h the radioactivity incorporated per well was measured.

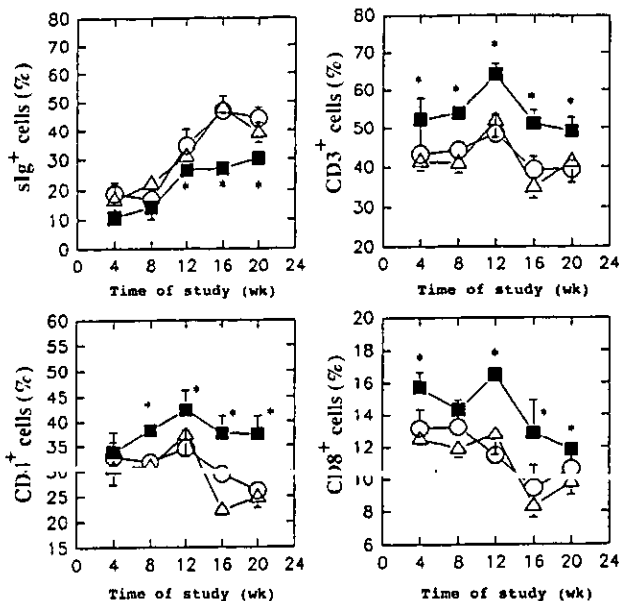


FIGURE 3. Percentage of cells expressing surface immunoglobulin (slg<sup>+</sup>), CD3-ε, CD4, and CD8 markers in the spleens of mice. Mice aged 3–4 wk were fed a commercial nonpurified diet (O, control group), a biotin-depleting diet supplemented with biotin (Δ, supplemented group), or a biotin-depleting diet (■, deficient group). Mice from each group were killed at the indicated times and the percentage of cells expressing each marker was determined by flow cytometry. Results are reported as the mean ± SD of three to six animals per group for each time point. \*Significantly different from the control and supplemented groups,  $P < 0.05$ .

in the control and supplemented groups had similar concentrations of free biotin in serum and that this concentration was significantly higher than that found in sera of mice in the deficient group. The lower concentrations of free biotin in sera of mice in the deficient group could suggest that, in general, the cells of these mice had a limited supply of biotin for the synthesis of biotin-dependent enzymes. However, it was pointed out by Bonjour (20) that the proper interpretation of serum concentrations of biotin remains to be determined.

The mean specific activities of PC and PCC in liver of control and supplemented mice were 130 and 72 nmol CO<sub>2</sub> fixed min<sup>-1</sup> mg protein<sup>-1</sup>, respectively. These specific activities of PC and PCC found in the livers of mice in the control group were 25 and 8 times higher, respectively, than those found in the livers of rats (21). This could reflect differences in enzyme content among different species or among different strains within the same species. Another factor that may have contributed to the higher specific activities found in this study was the method used to eliminate erythrocytes (hypotonic shock).

As reflected by both the concentration of free biotin in sera and the specific activities in liver and spleen of two of the enzymes that utilize biotin as a cofactor, PC and PCC, the biotin-depleting diet caused a significant change in the functional state of biotin in mice. Overall, the specific activity of PCC in the liver dropped by 80% and by 75% in the spleen whereas the specific activity of PC in the liver dropped by 73% and by 63% in the spleen. In the liver, although at 4 wk there was already a significant decrease in the activities of both enzymes, the maximum

decrease was observed after 8 wk and remained at about the same level for the rest of the study. In contrast, the specific activity of both PCC and PC in the spleen was already diminished after 4 wk of experimentation.


After 4 wk and for up to 16 wk of experimentation, the spleens of mice in the deficient group yielded only 50% of the number of cells obtained from spleens of the control mice; at 20 wk the percentage dropped to only 34%. The weight of the spleens showed the same relative differences (data not shown). This effect of biotin deficiency on spleen size was not proportional to the effect on corporal weight, which at 4, 8, 12, and 16 wk was 92%, 82%, 60%, and 55% of the respective weight of mice in the control and supplemented groups.

Despite the pronounced differences in the specific activity of PCC and PC in spleen lymphocytes, ConA-stimulated [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation by splenocytes from the mice of the deficient group was only 25–30% lower than that of control mice. However, biotin deficiency was shown to induce a relative enrichment of the T cell subpopulation: in the spleens of control animals, an average of 42% of the cells were T cells whereas in the spleens of deficient mice T cells accounted for ≈54% of the cells (Figure 3). Because ConA is a T cell-specific mitogen, one can calculate that for control mice, 42% of  $2.5 \times 10^5$  cells incorporated an average of 181 Bq (1.73 mBq/cell) whereas for deficient mice, 54% of  $2.5 \times 10^5$  spleen cells incorporated 124.5 Bq (0.92 mBq/cell). Thus, on a cell per cell basis, [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation by T cells from biotin-deficient mice was diminished by ≈46% compared with that in control animals. We



believe that this diminished response was not due to the low specific activity of the biotin-dependent carboxylases during the proliferative assay because the addition of 800 nmol biotin/L to the incubation medium increased the activity of both enzymes (data not shown) yet had no effect on the incorporation of [<sup>3</sup>H]thymidine. Rather, this may have resulted from an improper development of lymphoid cells in the animals subjected to the biotin-depleting diet, which cannot be reversed by incubation in a medium that contains biotin.

The percentage of slg<sup>+</sup> cells (B cells) in the spleen was significantly lower in the deficient group (27%) than in the control and supplemented mice (average for both groups: 47%) after 16 (30%) and 20 (43%) wk of the study, with a concomitant increase in the percentage of T cells (54% compared with 42%), mainly of the helper (CD4<sup>+</sup>) phenotype (22). These results suggest that biotin depletion affects the production, maturation, or both of B and T cells differently. A relatively lower number of B cells could correlate with the diminished antibody response and low number of plaque-forming cells found in biotin-deficient rats (5-7).

In summary, we characterized the effects of a biotin-depleting diet in mice. Growth was severely affected and the activities of PC and PCC in the spleen and liver diminished significantly. In addition, we showed that biotin deficiency had important effects on the immune system of mice. Although a detailed investigation of other possible indicators of immune dysfunction is needed, the data presented in this study have already identified two effects that are thought to affect the ability of the immune system to mount an adequate immune response against an antigenic challenge. These are the depressed T cell proliferative response to a mitogenic stimulus and the low number of B cells in the spleen. This animal model should be useful for exploring the mechanisms underlying these phenomena in particular and the effects of biotin deficiency on the immune system in general. 

The expert technical assistance of Claudia Garay is gratefully acknowledged. We thank C Castellanos and R Saavedra for their assistance with the FACScan measurements and C Lunelli for his expert advice on care of the animals. We are also indebted to Rafael Saavedra for his critical reading of the manuscript.

## REFERENCES

- Friedrich W. Biotin. In: Vitamins. Berlin: Walter de Gruyter, 1988:753-805.
- Wolf B. Disorders of biotin metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. The metabolic and molecular basis of inherited disease. New York: McGraw-Hill Inc, 1995:3151-77.
- Cowan MJ, Wara DW, Packman S, et al. Multiple biotin dependent carboxylase deficiencies associated with defects in T-cell and B-cell immunity. *Lancet* 1979;2:115-8.
- Munnich A, Fischer A, Saudubray JM, et al. Biotin-responsive immunoregulatory dysfunction in multiple carboxylase deficiency. *J Inher Metab Dis* 1981;4:113-4.
- Pruzansky J, Axelrod AE. Antibody production to diphtheria toxoid in vitamin deficiency states. *Proc Soc Exp Biol Med* 1955; 89:323-5.
- Kumar M, Axelrod AE. Cellular antibody synthesis in thiamin, riboflavin, biotin and folic acid deficient rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1978;157:421-3.
- Rabin BS. Inhibition of experimentally induced autoimmunity in rats by biotin deficiency. *J Nutr* 1983;113:2316-22.
- Kung JT, Mackenzie CC, Timpone JW. The requirement for biotin and fatty acids in the cytotoxic T-cell response. *Cell Immunol* 1979;48:100-10.
- Petrelli F, Moretti P, Campanati G. Studies on the relationships between biotin and the behaviour of B and T lymphocytes in the guinea pig. *Experientia* 1981;37:1204-6.
- Coligan JE, Kruisbeck AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W, eds. *In vitro* assays for lymphocyte function. In: *Current protocols in immunology*. Vol 1. New York: John Wiley and Sons, 1991: 3.0.5-3.17.10.
- Burri BJ, Sweetman L, Nyhan WL. Heterogeneity of noncarboxylase synthetase in patients with biotin-responsive multiple carboxylase deficiency. *Am J Hum Genet* 1985;37:326-37.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
- Henrikson KP, Allen SHG, Maloy WL. An avidin monomer affinity column for the purification of biotin-containing enzymes. *Anal Biochem* 1979;94:366-70.
- Oei J, Robinson BH. Simultaneous preparation of the three biotin-containing mitochondrial carboxylases from rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1985;840:1-5.
- Coligan JE, Kruisbeck AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W, eds. *Flow cytometry*. In: *Current protocols in immunology*. Vol 1. New York: John Wiley and Sons, 1991:5.0.3-5.8.5.
- Dakshinamurti K, Chauhan J. Biotin. *Vitam Horm* 1989;45:337-84.
- National Research Council. *Nutrient requirements of laboratory animals*, 4th revised ed. Washington, DC: National Academy Press, 1995:47:94.
- Fields M, Lewis CG, Lure MD, Mock NI, Mock DM. Requirements for biotin are not affected by the combination of copper deficiency and fructose feeding. *J Am Coll Nutr* 1994;13:174-8.
- Mock DM, Lankford GL, Mock NI. Biotin accounts for only half of the total avidin-binding substances in human serum. *J Nutr* 1995;125:941-6.
- Bonjour JP. Biotin in human nutrition. In: Dakshinamurti K, Bhagavan H, eds. *Biotin*. Ann N Y Acad Sci 1995:97-104.
- Suchy SF, Wolf B. Effect of biotin deficiency and supplementation on lipid metabolism in rats: cholesterol and lipoproteins. *Am J Clin Nutr* 1986;43:831-8.
- Sprent J, Schaefer M, Lo D, Korngold R. Functions of purified L3T4<sup>+</sup> and Lyt-2<sup>+</sup> cells in vitro and in vivo. *Immunol Rev* 1986; 91:195-218.

## APÉNDICE B

### PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

#### *TBE pH 7.4*

Tris-HCl 44.5 mM; ácido bórico 44.5 mM; EDTA 1.0 mM; azida de sodio al 0.02%; pH 7.4 en agua.

#### *Solución concentrada de biotina*

Pesar 5.0 mg de biotina y disolverlos en 100 mL de TBE. Se almacena a -20°C en alícuotas de 10 mL.

#### *Solución concentrada de avidina*

Se pesaron 5.0 mg de avidina de (Sigma Chem.) y se disolvieron en 2.0 mL de TBE. Se almacenó en alícuotas de 10 µL a -40°C.

#### *PBS pH 7.4*

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O 2.6 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anh. 7.74 mM; NaCl 0.16 M en agua a pH 7.4.

#### *PBS\* pH 7.4*

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O 2.6 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anh. 7.74 mM; NaCl 0.16 M: suero fetal bovino al 5%; azida de sodio al 0.02%; en agua a pH 7.4.

#### *Solución hemolizante*

KHCO<sub>3</sub> 1.0 g/L; NH<sub>4</sub>Cl 8.3 g/L; EDTA 3.7 mg/L en agua a pH 7.4.

#### *Amortiguador de lisis pH 8.0*

Tris 50 mM; EDTA 0.025 mM en agua a pH 8.0.

#### *TRIS 8X pH 8.0*

Tris 800 mM; MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O 48 mM; KCl 400 mM y EDTA 4mM; en agua a pH 8.0.

### *DMEM suplementado*

Al medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM por sus siglas en inglés: Dulbecco's modified Eagle's medium) se le adicionó 10% de suero fetal bovino (SFB) libre de biotina ; L-glutamina 2 mM; 100 mg de estreptomicina/L y  $100 \times 10^3$  U penicilina/L.

### *Amortiguador de boratos para ensayo de ELISA*

Ácido bórico 0.2 M, NaCl 0.15 M en agua a pH 8.5.

### *Amortiguador de dietanolamina para ensayo de ELISA*

Dietanolamina al 10%;  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  0.5 mM; azida de sodio al 0.04% en agua , pH 9.8.

### *Paraformaldehído al 2%*

0.5 g de paraformaldehído se agregan a 25 mL de agua caliente; se añaden 2-4 gotas de NaOH 1N hasta que se vea una solución transparente, se ponen 22 mL de agua y 2.5 mL de PBS 20X; se ajusta el pH a 7.4 y se afora a 50 mL (se puede almacenar a 4°C durante tres semanas).

**TWO WAY ANOVA:  
Balanced Design**

Dependent Variable: P8SO

Normality Test: Passed (P > 0.200)

Equal Variance Test: Failed (P = 0.002)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
DIETA	2	4730.1281	2365.0640	5.853e+002	< 0.001
TIEMPO	4	227.8495	56.9624	14.097	< 0.001
DIETA x TIEMPO	8	960.4879	120.0610	29.712	< 0.001
Residual	285	1151.6240	4.0408		
Total	299	7070.0895	23.6458		

The differences in the mean values among the different levels of DIETA are greater than would be expected by chance after allowing for the effects of differences in TIEMPO. There is a statistically significant difference (P < 0.001). To isolate which group(s) differ from the others use a multiple comparison procedure.

The differences in the mean values among the different levels of TIEMPO are greater than would be expected by chance after allowing for the effects of differences in DIETA. There is a statistically significant difference (P < 0.001). To isolate which group(s) differ from the others use a multiple comparison procedure.

The effect of different levels of DIETA depends on what level of TIEMPO is present. There is a statistically significant interaction between DIETA and TIEMPO (P < 0.001).

Least square means for DIETA:

Level	Mean	Std Err
CONTROL	26.445	0.201
SUPLEMENTADO	26.069	0.201
DEFICIENTE	17.840	0.201

Least square means for TIEMPO:

Level	Mean	Std Err
4.000	21.835	0.260
8.000	23.570	0.260
12.000	23.678	0.260
16.000	24.482	0.260
20.000	23.692	0.260

Least square means for DIETA x TIEMPO:

Level Pairs	Mean	Std Err
CONTROL x 4.000	23.065	0.449
CONTROL x 8.000	25.545	0.449
CONTROL x 12.000	27.710	0.449
CONTROL x 16.000	28.160	0.449
CONTROL x 20.000	27.745	0.449
SUPLEMENTADO x 4.000	22.285	0.449
SUPLEMENTADO x 8.000	25.240	0.449
SUPLEMENTADO x 12.000	26.725	0.449
SUPLEMENTADO x 16.000	28.185	0.449
SUPLEMENTADO x 20.000	27.910	0.449
DEFICIENTE x 4.000	20.155	0.449

DEFICIENTE x 8.000	19.925	0.449
DEFICIENTE x 12.000	16.600	0.449
DEFICIENTE x 16.000	17.100	0.449
DEFICIENTE x 20.000	15.420	0.449

Multiple Comparisons: Student-Newman-Keuls test

All Pairwise Comparisons on DIETA (marginal):

Factor Pairs	Mean Diff	Std Err	DF	p	q	P<.05
CONTROL vs DEFICIENTE:						
	8.605	0.201	285	3	42.807	Yes
CONTROL vs SUPLEMENTADO:						
	0.376	0.201	285	2	1.870	No
SUPLEMENTADO vs DEFICIENTE:						
	8.229	0.201	285	2	40.937	Yes

All Pairwise Comparisons on TIEMPO (marginal):

Factor Pairs	Mean Diff	Std Err	DF	p	q	P<.05
16.000 vs 4.000:						
	2.647	0.260	285	5	10.199	Yes
16.000 vs 8.000:						
	0.912	0.260	285	4	3.513	No
16.000 vs 12.000:						
	0.803	0.260	285	3	3.096	DNT
16.000 vs 20.000:						
	0.790	0.260	285	2	3.044	DNT
20.000 vs 4.000:						
	1.857	0.260	285	4	7.154	Yes
20.000 vs 8.000:						
	0.122	0.260	285	3	0.469	No
20.000 vs 12.000:						
	0.013	0.260	285	2	0.051	DNT
12.000 vs 4.000:						
	1.843	0.260	285	3	7.103	Yes
12.000 vs 8.000:						
	0.108	0.260	285	2	0.417	No
8.000 vs 4.000:						
	1.735	0.260	285	2	6.686	Yes

All Pairwise Comparisons on DIETA v TIEMPO (all cells):

Factor Pairs	Mean Diff	Std Err	DF	p	q	P<.05
(SUPLEMENTADO:16.000)v(DEFICIENTE:20.000):						
	12.765	0.449	285	15	28.399	Yes
(SUPLEMENTADO:16.000)v(DEFICIENTE:12.000):						
	11.585	0.449	285	14	25.774	Yes
(SUPLEMENTADO:16.000)v(DEFICIENTE:16.000):						
	11.085	0.449	285	13	24.661	Yes
(SUPLEMENTADO:16.000)v(DEFICIENTE:8.000):						
	8.260	0.449	285	12	18.376	Yes
(SUPLEMENTADO:16.000)v(DEFICIENTE:4.000):						
	8.030	0.449	285	11	17.865	Yes
(SUPLEMENTADO:16.000)v(SUPLEMENTADO:4.000):						
	5.900	0.449	285	10	13.126	Yes
(SUPLEMENTADO:16.000)v(CONTROL:4.000):						
	5.120	0.449	285	9	11.391	Yes
(SUPLEMENTADO:16.000)v(SUPLEMENTADO:8.000):						
	2.945	0.449	285	8	6.552	Yes

(SUPLEMENTADO:16.000)v(CONTROL:8.000):	285	7	5.873	Yes
2.640 0.449				
(SUPLEMENTADO:16.000)v(SUPLEMENTADO:12.000):	285	6	3.248	No
1.460 0.449				
(SUPLEMENTADO:16.000)v(CONTROL:12.000):	285	5	1.057	DNT
0.475 0.449				
(SUPLEMENTADO:16.000)v(CONTROL:20.000):	285	4	0.979	DNT
0.440 0.449				
(SUPLEMENTADO:16.000)v(SUPLEMENTADO:20.000):	285	3	0.612	DNT
0.275 0.449				
(SUPLEMENTADO:16.000)v(CONTROL:16.000):	285	2	0.056	DNT
0.025 0.449				
(CONTROL:16.000)v(DEFICIENTE:20.000):	285	14	28.343	Yes
12.740 0.449				
(CONTROL:16.000)v(DEFICIENTE:12.000):	285	13	25.718	Yes
11.560 0.449				
(CONTROL:16.000)v(DEFICIENTE:16.000):	285	12	24.606	Yes
11.060 0.449				
(CONTROL:16.000)v(DEFICIENTE:8.000):	285	11	18.321	Yes
8.235 0.449				
(CONTROL:16.000)v(DEFICIENTE:4.000):	285	10	17.809	Yes
8.005 0.449				
(CONTROL:16.000)v(SUPLEMENTADO:4.000):	285	9	13.070	Yes
5.875 0.449				
(CONTROL:16.000)v(CONTROL:4.000):	285	8	11.335	Yes
5.095 0.449				
(CONTROL:16.000)v(SUPLEMENTADO:8.000):	285	7	6.496	Yes
2.920 0.449				
(CONTROL:16.000)v(CONTROL:8.000):	285	6	5.818	Yes
2.615 0.449				
(CONTROL:16.000)v(SUPLEMENTADO:12.000):	285	5	3.193	No
1.435 0.449				
(CONTROL:16.000)v(CONTROL:12.000):	285	4	1.001	DNT
0.450 0.449				
(CONTROL:16.000)v(CONTROL:20.000):	285	3	0.923	DNT
0.415 0.449				
(CONTROL:16.000)v(SUPLEMENTADO:20.000):	285	2	0.556	DNT
0.250 0.449				
(SUPLEMENTADO:20.000)v(DEFICIENTE:20.000):	285	13	27.787	Yes
12.490 0.449				
(SUPLEMENTADO:20.000)v(DEFICIENTE:12.000):	285	12	25.162	Yes
11.310 0.449				
(SUPLEMENTADO:20.000)v(DEFICIENTE:16.000):	285	11	24.050	Yes
10.810 0.449				
(SUPLEMENTADO:20.000)v(DEFICIENTE:8.000):	285	10	17.765	Yes
7.985 0.449				
(SUPLEMENTADO:20.000)v(DEFICIENTE:4.000):	285	9	17.253	Yes
7.755 0.449				
(SUPLEMENTADO:20.000)v(SUPLEMENTADO:4.000):	285	8	12.514	Yes
5.625 0.449				
(SUPLEMENTADO:20.000)v(CONTROL:4.000):	285	7	10.779	Yes
4.845 0.449				
(SUPLEMENTADO:20.000)v(SUPLEMENTADO:8.000):	285	6	5.940	Yes
2.670 0.449				
(SUPLEMENTADO:20.000)v(CONTROL:8.000):	285	5	5.262	Yes
2.365 0.449				
(SUPLEMENTADO:20.000)v(SUPLEMENTADO:12.000):	285	4	2.636	No
1.185 0.449				
(SUPLEMENTADO:20.000)v(CONTROL:12.000):	285	3	0.445	DNT
0.200 0.449				

(SUPLEMENTADO:20.000) v (CONTROL:20.000) :				
0.165	0.449	285	2	0.367 DNT
(CONTROL:20.000) v (DEFICIENTE:20.000) :				
12.325	0.449	285	12	27.420 Yes
(CONTROL:20.000) v (DEFICIENTE:12.000) :				
11.145	0.449	285	11	24.795 Yes
(CONTROL:20.000) v (DEFICIENTE:16.000) :				
10.645	0.449	285	10	23.683 Yes
(CONTROL:20.000) v (DEFICIENTE:8.000) :				
7.820	0.449	285	9	17.398 Yes
(CONTROL:20.000) v (DEFICIENTE:4.000) :				
7.590	0.449	285	8	16.886 Yes
(CONTROL:20.000) v (SUPLEMENTADO:4.000) :				
5.460	0.449	285	7	12.147 Yes
(CONTROL:20.000) v (CONTROL:4.000) :				
4.680	0.449	285	6	10.412 Yes
(CONTROL:20.000) v (SUPLEMENTADO:8.000) :				
2.505	0.449	285	5	5.573 Yes
(CONTROL:20.000) v (CONTROL:8.000) :				
2.200	0.449	285	4	4.894 Yes
(CONTROL:20.000) v (SUPLEMENTADO:12.000) :				
1.020	0.449	285	3	2.269 No
(CONTROL:20.000) v (CONTROL:12.000) :				
0.035	0.449	285	2	0.078 DNT
(CONTROL:12.000) v (DEFICIENTE:20.000) :				
12.290	0.449	285	11	27.342 Yes
(CONTROL:12.000) v (DEFICIENTE:12.000) :				
11.110	0.449	285	10	24.717 Yes
(CONTROL:12.000) v (DEFICIENTE:16.000) :				
10.610	0.449	285	9	23.605 Yes
(CONTROL:12.000) v (DEFICIENTE:8.000) :				
7.785	0.449	285	8	17.320 Yes
(CONTROL:12.000) v (DEFICIENTE:4.000) :				
7.555	0.449	285	7	16.808 Yes
(CONTROL:12.000) v (SUPLEMENTADO:4.000) :				
5.425	0.449	285	6	12.069 Yes
(CONTROL:12.000) v (CONTROL:4.000) :				
4.645	0.449	285	5	10.334 Yes
(CONTROL:12.000) v (SUPLEMENTADO:8.000) :				
2.470	0.449	285	4	5.495 Yes
(CONTROL:12.000) v (CONTROL:8.000) :				
2.165	0.449	285	3	4.817 Yes
(CONTROL:12.000) v (SUPLEMENTADO:12.000) :				
0.985	0.449	285	2	2.191 No
(SUPLEMENTADO:12.000) v (DEFICIENTE:20.000) :				
11.305	0.449	285	10	25.151 Yes
(SUPLEMENTADO:12.000) v (DEFICIENTE:12.000) :				
10.125	0.449	285	9	22.526 Yes
(SUPLEMENTADO:12.000) v (DEFICIENTE:16.000) :				
9.625	0.449	285	8	21.413 Yes
(SUPLEMENTADO:12.000) v (DEFICIENTE:8.000) :				
6.800	0.449	285	7	15.128 Yes
(SUPLEMENTADO:12.000) v (DEFICIENTE:4.000) :				
6.570	0.449	285	6	14.617 Yes
(SUPLEMENTADO:12.000) v (SUPLEMENTADO:4.000) :				
4.440	0.449	285	5	9.878 Yes
(SUPLEMENTADO:12.000) v (CONTROL:4.000) :				
3.660	0.449	285	4	8.143 Yes
(SUPLEMENTADO:12.000) v (SUPLEMENTADO:8.000) :				
1.485	0.449	285	3	3.304 No

(SUPLEMENTADO:12.000)v(CONTROL:8.000):	1.180	0.449	285	2	2.625	DNT
(CONTROL:8.000)v(DEFICIENTE:20.000):	10.125	0.449	285	9	22.526	Yes
(CONTROL:8.000)v(DEFICIENTE:12.000):	8.945	0.449	285	8	19.900	Yes
(CONTROL:8.000)v(DEFICIENTE:16.000):	8.445	0.449	285	7	18.788	Yes
(CONTROL:8.000)v(DEFICIENTE:8.000):	5.620	0.449	285	6	12.503	Yes
(CONTROL:8.000)v(DEFICIENTE:4.000):	5.390	0.449	285	5	11.991	Yes
(CONTROL:8.000)v(SUPLEMENTADO:4.000):	3.260	0.449	285	4	7.253	Yes
(CONTROL:8.000)v(CONTROL:4.000):	2.480	0.449	285	3	5.517	Yes
(CONTROL:8.000)v(SUPLEMENTADO:8.000):	0.305	0.449	285	2	0.679	No
(SUPLEMENTADO:8.000)v(DEFICIENTE:20.000):	9.820	0.449	285	8	21.847	Yes
(SUPLEMENTADO:8.000)v(DEFICIENTE:12.000):	8.640	0.449	285	7	19.222	Yes
(SUPLEMENTADO:8.000)v(DEFICIENTE:16.000):	8.140	0.449	285	6	18.110	Yes
(SUPLEMENTADO:8.000)v(DEFICIENTE:8.000):	5.315	0.449	285	5	11.825	Yes
(SUPLEMENTADO:8.000)v(DEFICIENTE:4.000):	5.085	0.449	285	4	11.313	Yes
(SUPLEMENTADO:8.000)v(SUPLEMENTADO:4.000):	2.955	0.449	285	3	6.574	Yes
(SUPLEMENTADO:8.000)v(CONTROL:4.000):	2.175	0.449	285	2	4.839	Yes
(CONTROL:4.000)v(DEFICIENTE:20.000):	7.645	0.449	285	7	17.008	Yes
(CONTROL:4.000)v(DEFICIENTE:12.000):	6.465	0.449	285	6	14.383	Yes
(CONTROL:4.000)v(DEFICIENTE:16.000):	5.965	0.449	285	5	13.271	Yes
(CONTROL:4.000)v(DEFICIENTE:8.000):	3.140	0.449	285	4	6.986	Yes
(CONTROL:4.000)v(DEFICIENTE:4.000):	2.910	0.449	285	3	6.474	Yes
(CONTROL:4.000)v(SUPLEMENTADO:4.000):	0.780	0.449	285	2	1.735	No
(SUPLEMENTADO:4.000)v(DEFICIENTE:20.000):	6.865	0.449	285	6	15.273	Yes
(SUPLEMENTADO:4.000)v(DEFICIENTE:12.000):	5.685	0.449	285	5	12.648	Yes
(SUPLEMENTADO:4.000)v(DEFICIENTE:16.000):	5.185	0.449	285	4	11.535	Yes
(SUPLEMENTADO:4.000)v(DEFICIENTE:8.000):	2.360	0.449	285	3	5.250	Yes
(SUPLEMENTADO:4.000)v(DEFICIENTE:4.000):	2.130	0.449	285	2	4.739	Yes
(DEFICIENTE:4.000)v(DEFICIENTE:20.000):	4.735	0.449	285	5	10.534	Yes
(DEFICIENTE:4.000)v(DEFICIENTE:12.000):	3.555	0.449	285	4	7.909	Yes
(DEFICIENTE:4.000)v(DEFICIENTE:16.000):	3.055	0.449	285	3	6.797	Yes



(DEFICIENTE:4.000)v(DEFICIENTE:8.000):				
0.230	0.449	285	2	0.512 No
(DEFICIENTE:8.000)v(DEFICIENTE:20.000):				
4.505	0.449	285	4	10.023 Yes
(DEFICIENTE:8.000)v(DEFICIENTE:12.000):				
3.325	0.449	285	3	7.397 Yes
(DEFICIENTE:8.000)v(DEFICIENTE:16.000):				
2.825	0.449	285	2	6.285 Yes
(DEFICIENTE:16.000)v(DEFICIENTE:20.000):				
1.680	0.449	285	3	3.738 Yes
(DEFICIENTE:16.000)v(DEFICIENTE:12.000):				
0.500	0.449	285	2	1.112 No
(DEFICIENTE:12.000)v(DEFICIENTE:20.000):				
1.180	0.449	285	2	2.625 No

## APÉNDICE D

### DESARROLLO Y SELECCIÓN DE LINFOCITOS T EN EL TIMO

Los linfocitos T son células esenciales dentro de la respuesta inmune. Los precursores de los linfocitos T se originan en la médula ósea. Estos progenitores entran al torrente sanguíneo y llegan al timo en donde ocurren importantes procesos de maduración y selección, que dan como resultado a la población de linfocitos T maduros que abandonan el timo y pasan el resto de su vida recirculando por todo el organismo.

El desarrollo y la diferenciación de las células T para reconocer antígenos no propios y para desarrollar diferentes funciones ocurre en el timo. Al mismo tiempo, en el timo se lleva a cabo el importante proceso de selección que asegura que entre los linfocitos maduros que salen del timo no haya clonas que sean activadas por antígenos del propio organismo. En este apéndice se resume el estado actual del conocimiento sobre estos importantes procesos de maduración y selección.

Para responder a diversos tipos de agentes patógenos y/o retos a la homeostasis del organismo que presentan distintas propiedades biológicas, existen varios subtipos de células T programadas para iniciar respuestas distintas ante diferentes tipos de antígenos.

Con base a las cadenas que componen el receptor para antígeno del linfocito T (TCR), los linfocitos T pueden ser de uno de dos subgrupos: las células que expresan TCR  $\alpha:\beta$  (la mayoría de las células T maduras) y las células que expresan TCR  $\gamma:\delta$ .

#### **Células T $\gamma:\delta$**

Las gran mayoría de células T  $\gamma:\delta$  no expresan las moléculas CD4 ni CD8, y la naturaleza de sus ligandos naturales no está bien establecida, aunque se ha sugerido la

posibilidad de que estas células reconozcan antígenos en su forma nativa sin la necesidad del procesamiento y presentación del antígeno por células presentadoras de antígeno profesionales (74, 75).

Funcionalmente, las células T  $\gamma:\delta$  han demostrado ser importantes en la resistencia a ciertas enfermedades infecciosas (76-77) y también se ha demostrado que pueden secretar varias linfocinas así como lisar células blanco (revisado por Haas et al. 1993; 78). Se sabe muy poco acerca de las etapas del desarrollo y maduración tímica de las células  $\gamma:\delta$ .

### **Células T $\alpha:\beta$**

Se ha logrado un conocimiento más completo de los procesos de maduración y las funciones de las células T  $\alpha:\beta$ . Una de las características principales de estas células, es que no pueden reconocer al antígeno en su forma nativa, sino que reconocen fragmentos antigénicos presentados sobre una célula presentadora de antígeno en combinación con moléculas codificadas en el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC).

Con base en la expresión de los co-receptores CD4 y CD8, las células T que expresan el receptor  $\alpha:\beta$  pueden dividirse entre aquéllas que reconocen péptidos presentados por moléculas de MHC tipo I (CD8<sup>+</sup>) o péptidos presentados por moléculas de MHC tipo II (CD4<sup>+</sup>). Las células CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> constituyen cerca del 60% de la población de linfocitos T y las células CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> el 40% restante.

Con base en su función, los linfocitos T  $\alpha:\beta$  pueden dividirse en por lo menos dos subgrupos, células T ayudadoras (T<sub>H</sub>) y células T citotóxicas (T<sub>C</sub>). Las células T<sub>H</sub> al activarse secretan citocinas que controlan y coordinan a otras células que participan en la respuesta inmune. Dentro de las células T<sub>H</sub> se conocen dos subtipos (T<sub>H</sub>1 y T<sub>H</sub>2) de acuerdo a las citocinas que secretan en respuesta a un estímulo antigénico. Por su parte, las células

$T_C$  adquieren la capacidad de lisar células blanco que presenten antígenos reconocidos por su TCR.

Aunque se han documentado cada vez más excepciones, los subtipos de células T definidos por los criterios previamente mencionados están relacionados de la siguiente manera: las células  $T \alpha:\beta CD4^+CD8^-$  son células T ayudadoras ( $T_H$ ) y las células  $CD4^+CD8^-$  son células T citotóxicas ( $T_C$ ).

### **Desarrollo y selección de células T en el timo**

Las subpoblaciones de linfocitos T que participan en distintas funciones, son los productos finales de un proceso de desarrollo ontogénico de las células T durante el cual se activa o inhibe, en un orden preciso, la expresión de varios genes y de sus productos. Esta expresión secuencial de ciertas moléculas permite distinguir varias etapas en el desarrollo intratímico de los linfocitos. Con base en la expresión del TCR en la superficie celular, el proceso de desarrollo intratímico se puede dividir en tres fases:

Una fase temprana en la que no hay expresión de las cadenas variables del TCR; una fase intermedia que es dependiente de la expresión de la cadena  $\beta$  del TCR; y una fase tardía que depende de la expresión del complejo  $\alpha:\beta$ .

Los timocitos más inmaduros son  $CD2^+CD8^+CD25^-$  y expresan CD16, CD44 y niveles bajos de CD4 (79). En este estadio todavía no se detectan rearrreglos en los genes de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR. Los primeros eventos en la diferenciación intratímica de estos progenitores de células T son la regulación negativa de la expresión de CD4, y se inicia la expresión de CD2 y CD25 (IL-2R $\alpha$ ) (80). Eventualmente, las células  $CD44^+ CD25^-$  cambian a  $CD44^+CD25^+$ , las cuales muestran rearrreglos en la cadena  $\beta$  del TCR (pero no en

la  $\alpha$ ) y producen transcritos de TCR  $\beta$  (81, 82). También expresan CD3 $\epsilon$ , aunque no es claro si esta cadena se asocia con otras cadenas de receptor en la superficie de la célula.

La expresión de la cadena  $\beta$  del TCR es necesaria para que la célula continúe su proceso de diferenciación mas allá de la etapa de CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (83) En este momento la cadena  $\beta$  se expresa en la membrana asociada covalentemente a una proteína altamente glicosilada designada como gp33 o cadena pre- $\alpha$  del TCR (84, 85) Se ha sugerido que el complejo gp33- $\beta$  se asocia con moléculas del CD3 y este complejo es capaz de inducir señales intracelulares necesarias para que continúe el proceso de diferenciación. Es probable que en este proceso de señalización intervenga la cinasa de tirosina p56 *lck* (86) Las señales intracelulares así generadas inducen la progresión en el desarrollo, incluyendo un incremento en la división celular, rearreglo del gen de la cadena  $\alpha$  y la expresión de las moléculas CD4 y CD8, entre otros. En este momento ocurre el cambio de CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (dobles negativas) a CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (dobles positivas).

Una vez que el complejo gp33- $\beta$  ha inducido sus señales intracelulares, se generan grandes números de células CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> en las cuales procede activamente el rearreglo del gen de la cadena  $\alpha$ . Cuando el rearreglo ha sido efectivo se induce la regulación negativa de la proteína gp33, de modo que la cadena  $\beta$  ahora puede formar complejos con la cadena  $\alpha$ . La transición de células dobles negativas a timocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> ocurre de una manera tal que el CD8 se expresa antes del CD4 (lo más común) (87) o en algunos ratones CD4 se expresa antes de CD8 (88). Los timocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> se dividen y empiezan a expresar TCR  $\alpha$ : $\beta$  en la superficie. En este momento las señales inducidas a través del TCR en timocitos inmaduros CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> producen cambios celulares muy diferentes a los que ocurren en los linfocitos T maduros. Los timocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> tienen una vida relativamente corta; estas

células están programadas para morir después de 3.5 días, a menos que interactúen de manera específica con una molécula sobre la superficie de otra célula. Este proceso de selección positiva, que de hecho es un rescate de una muerte celular programada, es esencial para la generación de células T maduras ( $CD4^+CD8^-$  o  $CD4^+CD8^+$ ). Se ha demostrado que la generación de células positivas simples específicas para un péptido presentado por una cierta molécula de MHC, requiere la presencia de la molécula de MHC en el timo (89).

La interacción entre el TCR  $\alpha\beta$  y la molécula de MHC responsable de la selección positiva ocurre en células que aún son dobles positivas. En las células seleccionadas positivamente empieza una regulación negativa del correceptor CD4 o CD8. El mecanismo que determina cual de estos correceptores es regulado negativamente no está claro, probablemente es un proceso estocástico (90). Los linfocitos cuyo TCR- $\alpha\beta$  y correceptor (ya sea CD4 o CD8) puedan unirse con la misma molécula de MHC, continuarán hasta alcanzar la etapa de linfocitos maduros. Alternativamente, si la combinación TCR-correceptor no es capaz de unirse a la misma molécula de MHC, la célula muere por apoptosis.

Otro punto importante que está todavía en debate, es la naturaleza del ligando unido al MHC que es capaz de inducir la selección positiva. Parece bastante claro que las partes polimórficas de la molécula de MHC determinan la selección positiva, pero aún no es claro el papel que juegan los péptidos en este proceso. Por un lado, se sabe que la expresión estable de las moléculas de MHC en la superficie celular requiere la presencia de un péptido unido en el espacio de unión. Sin embargo, no está claro si los péptidos presentados en las moléculas de MHC durante el proceso de selección positiva son los mismos que activarán a

la célula T una vez madura (91). Es posible que aún cuando la presencia de un péptido es necesaria y puede influenciar la selección positiva, sea más bien la molécula de MHC que la secuencia del péptido, lo que determine la selección positiva. Con respecto a la identidad de la célula presentadora de antígeno durante este proceso de selección positiva, parece ser claro que son células epiteliales del timo (92).

Además de rescatar de muerte celular programada a las células potencialmente útiles al organismo (selección positiva), en el timo se lleva a cabo la eliminación de clonas potencialmente autorreactivas (selección negativa). Los primeros eventos de selección negativa ocurren en linfocitos en la etapa de células  $CD4^+CD8^+$ , los cuales son inducidos a apoptosis como resultado de la interacción específica de sus TCR- $\alpha\beta$  con células presentadoras de antígeno. Se ha demostrado que condiciones idénticas de estimulación inducen apoptosis en timocitos  $CD4^+CD8^-$ , mientras que en células T maduras inducen proliferación (93) Esto indica que los TCR- $\alpha\beta$  de timocitos dobles positivos pueden transducir señales capaces de inducir proliferación o apoptosis. El cambio de proliferación a apoptosis en respuesta a la estimulación a través del TCR ocurre en la etapa de desarrollo intratímico en que las células se convierten en  $CD4^+CD8^-$  o  $CD4^-CD8^+$ .

Aparte de la etapa de maduración del timocito, parece ser importante para la selección negativa, la avidez de la interacción del TCR con los complejos péptido-molécula MHC. La inducción de muerte celular por apoptosis a consecuencia de una interacción con alta avidez, puede ocurrir no solamente en células inmaduras, sino también en linfocitos T maduros (94). La diferente sensibilidad de los linfocitos dependiendo de su estado de maduración puede estar relacionada con la expresión de moléculas involucradas con el mecanismo de apoptosis, como los productos de los genes *bcl-2*, *c-myc* o *Nur-77* (95-97).

El propósito de los eventos de selección positiva y negativa en el timo es la separación de los linfocitos T potencialmente útiles para el organismo, tanto de células potencialmente dañinas por ser autorreactivas así como de aquellas que, en virtud de no ser capaces de interactuar con las moléculas del MHC del organismo, serían inútiles. Las células T maduras abandonan el timo y se integrarán a un proceso de recirculación a través del sistema circulatorio, linfático y órganos linfoides secundarios.



## BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Friedrich W. Vitamins 1 Biochemistry and Physiology of the Vitamins: Introduction. Págs 3-61. Walter de Gruyter. Berlín New York 1988.
- 2.- Wolf B 1995. Cap. 103. Disorders of biotin metabolism. En: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. 7<sup>th</sup> ed. Editores: Scriver Ch R, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. Págs. 3151-77.
- 3.- Rose RC. 1980 Water-soluble vitamin absorption in intestine. *Ann Rev Physiol* 42:157-71.
- 4.- Herbert V. 1980 The vitamin craze. *Arch Intern Med* 140:173-6.
- 5.- Beisel W R 1992 History of Nutritional Immunology: Introduction and Overview. *J. Nutr.* 122:591-6.
- 6.- Jackson C M 1925 The Effects of Inanition and Malnutrition Upon Growth and Structure. Blakinston's Sons and Co, Philadelphia, PA. citado en Beisel W R. 1992 (5).
- 7.- Chandra R K 1992 Protein-Energy Malnutrition and immunological responses *J. Nutr.* 122:597-600.
- 8.- Beisel W R 1982 Single nutrients and immunity. *Am J Clin Nutr* 35(Suppl):417-68.
- 9.- Wood HG, Barden RE. 1977 Biotin enzymes. *Ann Rev Biochem* 46:385-413.
- 10.- Gardner J. Parsons HT, Peterson WH. 1945 Human biotin metabolism on various levels of biotin intake. *Arch Biochem* 8:339-48.
- 11.- Gompertz D, Bartlett K, Blair D, Stern C. 1973 Child with a defect in laucine metabolism associated with  $\beta$ -hydroxyisovaleric aciduria and  $\beta$ -methylcrotonylglycinuria. *Arch Dis Chil* 48:975-8.
- 12.- Cowan M J 1982 in: Recent Vitamine Research. Capitulo 1 Biotin Responsive metabolic disorders in early childhood págs. 2-26.

- 13.- Wolf B y Heard GS 1989 Disorders of biotin metabolism. En: The metabolic and molecular bases of inherited disease. Volume II. Sixth Ed. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS and Valle D, Eds. McGraw-Hill Inc. México City. Part 14. Chapter 83, 2083-2103.
- 14.- Cowan MJ, Wara DW, Packman S, Ammann AJ, Yoshino M, Sweetman L, Nyhan W. 1979 Multiple biotin dependent carboxylase deficiencies associated with defects in T-cell and B-cell immunity Lancet 2:115-8.
- 15.- Munnich A, Fischer A, Saudubray JM, GrisCELLI C, Coude FX, Ogier H, Charpentier C and Frezal J. 1981. Biotin-responsive immunoregulatory dysfunction in Multiple Carboxylase Deficiency. J. Inher. Metab. Dis. 4: 113-4.
- 16.- Rose RC, McCormick DB, Li TK, Lumeng L, Haddad JG, Spector R. 1986 Transport and metabolism of vitamins. Feder Proc 45:30-9.
- 17.- Pruzansky J, Axelrod AE. 1955 Antibody production to diphtheria toxoid in vitamin deficiency states. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 89: 323-5.
- 18.- Kumar M, Axelrod AE. 1978 Cellular antibody synthesis in thiamin, riboflavin, biotin and folic acid deficient rats. Proc Soc Exp Biol Med 157:421-3.
- 19.- Rabin BS. 1983 Inhibition of experimentally induced autoimmunity in rats by biotin deficiency. J. Nutr 113:2316-22.
- 20.- Kung JT, Mackenzie CG, Talmage DW. 1979 The requirement for biotin and fatty acids in the cytotoxic T cell response. Cell Immunol. 48: 100-10.
- 21.- Petrelli F, Moretti P, Campanati G. 1981 Studies on the relationships between biotin and the behaviour of B and T lymphocytes in the guinea-pig. Experientia: 37:1204-6.

- 22.- Baumgartner ER, Suormala T, Wick H, Baush J, Bonjour JP. 1985 Biotinidase deficiency: factors responsible for the increased biotin requirement. *J Inher Metab Dis.* 8 Suppl 1:59-64.
- 23.- Friedrich W. *Vitamins 11 Biotin.* Págs.753-805. Walter de Gruyter. Berlin New York 1988.
- 24.- Bonjour JP en: *Handbook of Vitamins. Nutritional, Biochemicals and Clinical Aspects.* Cap. 10 Biotin págs. 403-35. Editor Lawrence J Machlin. Nueva York 1984.
- 25.-Klevay I.M 1976 The biotin requirement of rats fed 20% egg white. *J Nutr* 106:1643-6.
- 26.- Scott D 1951 Clinical biotin deficiency ("egg white injury") Report of a case with some remarks on serum cholesterol. *Acta Med Scand.* 162:69-70.
- 27.- Baugh CM, Malone JH, Butterworth CE Jr. 1968 Human biotin deficiency: A case history of biotin deficiency induced by raw egg consumption in a cirrhotic patient. *Am J Clin Nutr* 21:173-82.
- 28.- Achuta Murthy PN, Mistry SP.1972 Synthesis of biotin-dependent carboxylases from their apoproteins and biotin. *J Scient Ind Res* 31:554-63.
- 29.- Sydenstricker VP, Singal SA, Briggs AP, DeVaughn NM, Isbell H. 1942 Observations on the "egg white injury" in man and its cure with a biotin concentrate. *J Am Med Ass* 118:1199-1200.
- 30.- Green NM. 1975 Avidin. *Adv Prot Chem* 29:85-133.
- 31.-Gardner J; Parson HT, Peterson WH 1946 Human utilization of biotin from various diets. *Am J Med Sci* 211:198-204.
- 32.- Denko C, Grundy W, Porter I, Berryman G, Friedmann T, Youmans J. 1946 Excretion of B complex vitamins in urine and feces of 7 normal adults. *Arch Biochem* 10:33-40.

- 33.- Achuta Murthy PN y Mistry P. 1977 Biotin (Review). *Prog Food Nutr Sci* 2:405-55.
- 34.- Wolf B, Hsia YE, Sweetman L, Feldman G, Boychuk RB, Bart RD, Crowell DH, Di Mauro RM, Nyhan WL. 1981 Multiple carboxylase deficiency: Clinical and biochemical improvement following neonatal biotin treatment. *Pediatrics* 68:113-5.
- 35.- Hardinge MG, Crooks H. 1961 Lesser known vitamins in foods. *J Am Diet Assoc.* 38:204-12.
- 36.- National Res Council. *Recommended Dietary Allowances*, 8<sup>th</sup> ed. Washington, DC, National Academy of Sciences, 1980.
- 37.- Baker H, Frank O, Matovitch V B, Pasher I, Aaronson S, Hunter SH, Sobotka H 1962. A new method for biotin in blood , serum, urine and tissues. *Anal Biochem* 3:31-9.
- 38.- National Res Council. Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition. *Nutrient Requirements of Laboratory Animals*, 4<sup>th</sup> ed. Washington, DC, National Academy Press, 1995.
- 39.- Weiner D, Wolf B. 1990 Biotin uptake in cultured hepatocytes from normal and biotin-deficient rats. *Biochem Med Metab Biol.*44:271-81.
- 40.- Moss J, Lane D. 1971 The biotin dependent enzymes. En: *Advances in Enzymology. Relat Areas Mol Biol.* 35:321-442. Ed. Meister A. Interscience, New York.
- 41.- Sebrell WH, Harris R S, eds. 1961 *The Vitamins*, págs. 261-92. Academic Press, New York.
- 42.- Hommes F A 1986 Biotin *Wld Rev Nutr Diet* 48:34-84.
- 43.- Wright LD, Cresson EL, Skeggs HR, Wood TR, Peck RL, Wolf DE, Folkers K. 1952 Isolation of crystalline biocytine from yeast extract. *J Am Chem Soc* 74:1996-9.

- 44.- Frank O, Luisada-Opper A V, Feingold S, Baker H. 1970 Vitamin binding by human and some animal plasma proteins. *Nut Rep Int* 1(3):161-8.
- 45.- Weiner D, Wolf B 1990 Biotin uptake in cultured hepatocytes from normal and biotin - deficient rats. *Biochem Med Metab Biol* 44:271-81.
- 46.- Sanders JE, Malamud N, Cowan MJ, Packman S, Amman AJ, Wara DW.1980 Intermittent ataxia and immunodeficiency with multiple carboxylase deficiencies: a biotin responsive disorder. *Ann Neurol* 8:544-7.
- 47.- Thoene J, Baker H, Yoshino M, Sweetman L. 1981 Biotin responsive carboxylase deficiency associated with subnormal plasma and urinary biotin. *N Eng J Med* 304:817-20.
- 48.- Fisher A, Munnich A, Saudubray JM. 1982 Biotin responsive immunoregulatory dysfunction in multiple carboxylase deficiency. *J Clin Immunol* 2:35-8.
- 49.- Hurvitz H, Ginat-Israeli T, Elpeleg ON, Klar A, Amir N. 1989 Biotinidase deficiency associated with severe combined immunodeficiency . *Lancet* 2:228-9.
- 50.- Müller S, Falkenberg N, Mönch E, Jakobs C. 1980 Propionic acidemia and immunodeficiency. *Lancet* marzo 8;1(8167):551-2.
51. Bonjour JP. 1977 Biotin in man's nutrition and therapy- a review. *Int J Vit Nutr Res* 47:107-18.
- 52.- Packman S, Sweetman L, Yoshino M, Baker H, Cowan M. 1981. Biotin-responsive multiple carboxylase deficiency of infantile onset. *J Pediatr* 99(3); 412-3.
- 53.- Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W, eds. In vitro assay for lymphocyte function. En: *Current protocols in immunology*. Vol 1. New York: John Wiley and Sons, 1991:3.0.5-3.17.10.

- 54.- Burri BJ, Sweetman L, Nyhan WL. 1985 Heterogeneity of holocarboxylase synthetase in patients with biotin-responsive multiple carboxylase deficiency. *Am J Hum Genet* 37:326-37.
- 55.- Bradford MM. 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54.
- 56.-Henrikson KP, Allen SHG, Maloy WL. 1979 An avidin monomer affinity column for the purification of biotin-containing enzymes. *Anal Biochem* 94:366-70.
- 57.- Oei J, Robinson BH. Simultaneous preparation of the three biotin-containing mitochondrial carboxylases from rat liver. *Biochim Biophys Acta* 840:1-5.
- 58.- Lederer WH, Kumar M, Axelrod AE. 1975 *J Nutr* 105,17-20.
- 59.- Petrelli F, Moretti P, Paparelli M, Guglielmi L, Barra D. 1980 Behaviour in biotin-deficient rats of thymic peptides controlling DNA transcription. *Arch Inter Physiol Biochemie* 88:163-8.
- 60.- Petrelli F, Moretti P, Sciarresi P, Dahir AM. 1985 Relationships between biotin and DNA contents and DNA turnover in lymphoid organs: thymus, lymph nodes and spleen. *Acta Vitaminol Enzymol* 7(3-4):199-206.
- 61.- Moretti P, Petrelli C, Petrelli F, Gabrielli MG, Palatroni P. 1990 Relationships between biotin and thymus morphology, and thymic and plasma peptides controlling DNA transcription. *Thymus* 15:79-92.
- 62.- Mackenzie CG, Moritz E, Wisneski JA, Reiss OK, Mackenzie JB. 1978 Fatty acid ester turnover : A control factor in triacylglycerol and lipid-rich particle accumulation in cultured mammalian cells. *Mol. Cell. Biochem.* 19:7-15.
- 63.- Petrelli F, Moretti P, Sciarresi P, Dahir AM. 1985 The effect of biotin on the formation of different types of E-rosettes by human lymphocytes. *J Leukocyte Biol* 37:503-509.

- 64.- Antibody Applications. Essencial Thechniques. Essencial Thechniques Series. P J Delves. Series Editor. D Rickwood. John Wiley and Sons. 1995. U.K.
- 65.- Fields M, Lewis CG, Lure MD, Mock NI, Mock DM. 1994 Requirements for biotin are not affected by the combination of copper deficiency and fructose feeding. *J Am Coll Nutr* 13:174-8.
- 66.- Mock DM, Lankford GL, Mock NI. 1995 Biotin accounts for only half of the total avidin - binding substances in human serum. *J Nutr* 125:941-6.
- 67.- Bonjour JP 1985. In: Dakshinamurty K, Bhagavan H, eds. Biotin. *Ann N Y Acad Sci* 447:97-104.
- 68.- Dakshinamurthi K, Chauhan J 1989 Biotin. *Vitamins and Hormones* 45:337-84.
- 69.- Suchy SF, Wolf B 1986 Effect of biotin deficiency and supplementation on lipid metabolism in rats: cholesterol and lipoproteins. *Am J Clin Nutr* 43:831-8.
- 70.- Rylatt DB, Keech DB, Wallace JC. 1977 Pyruvate carboxylase: isolation of the biotin-containing tryptic peptide and the determination of its primary sequence. *Arch Biochem Biophysics*. 183:113-22.
- 71.- Jan Klein, Václav Horejsí. *Immunology*. Capítulo 5. Lymphocytes págs 58-86. 2ª Ed. 1997. Blackwell Science.
- 72.- Kisielow P, Von Bohemer H. 1995 Development and selection of T cells: facts and puzzles. *Adv Immunol* 58:87-209.
- 73.- Hunt SV. Preparation of lymphocytes and accessory cells. En: *Lymphocytes. A practical approach*. Cap. 1, pág. 3. GGB Klaus, Editor. IRL Press. Washigton DC.
- 74.- Rock EP, Sibbald PR, Davis MM, Chien Y. 1994 CDR3 length in antigen-specific immune receptors. *J. Exp. Med.* 179:985-9.
- 75.-Schild H, Mavaddat N, Litzenberg C, Ehrich E, et al. 1994 The nature of MHC recognition by  $\gamma:\delta$  T cells. *Cell* 76:17-27.

- 76.- Mombaerts P, Arnoldi J, Russ F, Tonegawa S, Kaufmann S. 1993 Different roles of  $\alpha:\beta$  and  $\gamma:\delta$  T cells in immunity against an intracellular bacterial pathogen. *Nature (London)* 365:53-6.
- 77.-Tsuji M, Mombaerts P, Lefrancois L, Nussenzweig RS, Zavala F, Tonegawa S. 1994  $\gamma:\delta$  T cells contribute to immunity against the liver stages of malaria in  $\alpha:\beta$  T-cell deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* 91:345-9.
- 78.- Haas W, Pereira P, Tonegawa S. Gamma/delta cells. *Annu Rev Immunol* 1993;11:637-95.
- 79.- Wu L, Scollay R, Egerton M, Pearse M, Spangrude GJ, Shortman K. 1991 CD4 is expressed on earliest T lineage precursor cells in the adult murine thymus. *Nature (London)* 349:71-4.
- 80.- Rodewald HR, Awad K, Moingeon P, D'Adamio L et al. 1993 Fc $\gamma$ RII/II and CD2 expression mark distinct subpopulations of immature CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> murine thymocytes: In vivo developmental Kinetics and T cell receptor  $\beta$  chain rearrangement status. *J Exp Med* 177:1079-92.
- 81.-Pearse M, Wu L, Egerton M, Wilson A, Shortman K, Scollay R. 1989 A murine early thymocyte developmental sequence is marked by transient expression of the interleukin-2 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:1614-8
- 82.-Rodewald HR, Awad K. Moingeon P, D'Adamio L et al. 1993 Fc $\gamma$ RII/II and CD2 expression mark distinct subpopulations of immature CD4-CD8- murine thymocytes: In vivo developmental Kinetics and T cell receptor  $\beta$  chain rearrangement status. *J Exp Med* 177:1079-92.



- 83.- von Bohemer H. 1990 Developmental biology of T cells in T cell receptor transgenic mice. *Annu Rev Immunol* 8:531-56.
- 84.-Groettrup M, Ungewiss K, Azogui O, Palacios R, et al. 1993 A novel disulfide-linked heterodimer on pre-T cells consists of the T cell receptor  $\beta$  chain and a 33kd glycoprotein. *Cell* 75:283-94.
- 85.-Groettrup M y von Bohemer H. 1993 A role for a pre-T cell receptor in T-cell development. *Immunol Today* 14:610-4
- 86.-Levin SD, Abraham KM, Anderson SJ, Forbush KA, Perimutter RM. 1993 The protein tyrosine kinase p56<sup>lck</sup> regulates thymocyte development independently of its interactions with CD4 y CD8 coreceptors. *J Exp Med* 178,245-55.
- 87.-Kisielow P, Leiserson W, von Bohemer H. 1984 Differentiation of thymocytes in fetal organ culture: analysis of phenotypic changes accompanying the appearance of cytolytic and interleukin-2 producing cells. *J Immunol* 133:1117-23.
- 88.-Hugo P, Petrie HT. 1992 Multiple routes for late intrathymic precursors to generate CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> thymocytes. *Adv Mol Cell Biol* 5:37-53.
- 89.-von Bohemer H y Kisielow P 1990 Self-nonsel self discrimination by T cells. *Science* 248:1369-73.
- 90.- Russell JH, White CL, Loh DY, Meleedy-Rey P. 1991 Receptor-stimulated death pathway is opened by antigen in mature T cells *Proc Natl Acad Sci USA* 88:2151-5.
- 91.-Lundberg K, Shortman K. 1994 Small cortical thymocytes are subject to positive selection.

- 92.- Anderson G, Jekinson E, Moore NC, Owen JJT. 1993 MHC class II-positive epithelium and mesenchyme cells are both required for T cell development in the thymus. *Nature (London)* 262:330-4.
- 93.-Kisielow P, Swat W, Rocha B, von Bohemer H. 1991 Induction of immunological unresponsiveness in vivo and in vitro by conventional and super-antigen in developing and mature T cells. *Immunol Rev* 122:69-85.
- 94.-Lenardo MJ. 1991 Interleukin-2 programs mouse  $\alpha:\beta$  T lymphocytes for apoptosis. *Nature (London)* 353:858-61.
- 95.-Liu Z-G, Smith SW, McLaughlin KA, Schwartz LM, Osborne BA. 1994 Apoptotic signals delivered through the T cell receptor of a T-cell hybrid require the immediate-early gene *mur77*. *Nature* 367:281-84.
- 96.- Tao W, Teh S-J, Melhado I, Jirik F, Korsmeyer SJ, The H-S. 1994 The T cell receptor repertoire of CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> thymocytes is altered by overexpression of the BCL-2 protooncogene in the thymus. *J Exp Med* 179:145-53.
- 97.- Riegel JS, Richie ER, Allison JP. 1990 Nuclear events after activation of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> thymocytes. *J Immunol* 144:3611-8.