



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DETERMINACIÓN DE SOMATOTROPINA (GH)
Y DEL FACTOR DE CRECIMIENTO I
SIMILAR A LA INSULINA (IGF-I)
EN RATONES DEFICIENTES DE BIOTINA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

GEORGINA DEL VECCHYO TENORIO



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. ARMIDA BÁEZ SALDAÑA

2006



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.

Este trabajo se realizó en los laboratorios de los Doctores: Armida Báez Saldaña, Rafael Saavedra Durán y Enrique Ortega Soto. Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

La dirección de este trabajo estuvo a cargo de la Dra. Armida Báez Saldaña.

Esta tesis se realizó con el apoyo de los proyectos IN230905 e IN220705 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), así como del Proyecto 45092 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Agradecimientos

Dra. Armida Báez Saldaña

Por su orientación y asesoría durante la realización este trabajo.

M.V.Z. Georgina Díaz Herrera

Por el cuidado de los ratones en el bioterio así como por su enseñanza para el manejo adecuado de los ratones.

M. en IBB Claudia A. Garay Canales

Por su asesoría en el contador de células Beckman Coulter y del lector de ELISA durante mi estancia en el laboratorio del Dr. Ortega.

Dedicatoria

A mis padres porque siempre han estado de mi lado.

<u>Contenido</u>	Página
Resumen.....	4
1 Antecedentes.....	6
1.1 Biotina.....	6
1.2 Deficiencia de Biotina.....	8
1.3 Deficiencia de biotina en humanos.....	9
1.4 Deficiencia de biotina en animales de experimentación.....	11
1.5 Suplementación de biotina.....	12
1.6 Biotina y metabolismo de glucosa.....	13
1.7 Hormona de crecimiento (GH).....	15
1.8 Factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs).....	17
2 Justificación.....	23
2.1 Hipótesis.....	23
3 Objetivo general.....	24
3.1 Estrategia experimental.....	24
4 Materiales y Métodos.....	25
4.1 Análisis estadístico.....	28
5 Resultados.....	29
6 Discusión y conclusiones.....	38
7 Apéndices.....	42
7.1 Apéndice 1: Soluciones	42
7.2 Apéndice 2: Cantidades de los componentes en las dietas proporcionadas a los ratones.....	43
7.3 Apéndice 3: Tablas con promedios y desviaciones estándar de las gráficas...	44
7.4 Apéndice 4: Valores normales de glucosa sérica en ratones.....	47
7.5 Apéndice 5: Curvas estándares promedio de los ensayos de Biotinidasa y o-Toluidina.....	48
7.6 Apéndice 6: Ejemplos de curvas estándar de los ensayos de IGF-I y GH.....	49
8 Referencias.....	50

Resumen

La biotina es una vitamina hidrosoluble del complejo B que los mamíferos no pueden sintetizar así que la obtienen de la dieta. La función clásica de la biotina consiste en ser el cofactor esencial de 5 carboxilasas que participan en la gluconeogénesis y en el metabolismo ácidos grasos y aminoácidos ramificados. Varios estudios han mostrado que la biotina afecta el metabolismo de la glucosa y modula el estado diabético. La hormona del crecimiento (GH) controla el crecimiento corporal de los animales y modula la glucosa sérica y muchas de sus funciones las ejerce a través de los factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs) los cuales son liberados en respuesta a la GH. En el hígado, el hueso y en otros tejidos al unirse la GH a su receptor se produce IGF-I cuyas concentraciones séricas reflejan en cierto grado la secreción de GH. En este trabajo se describen los efectos de la alimentación con dietas suficientes y deficiente de biotina en la producción de GH e IGF-I así como en algunos parámetros representativos del crecimiento corporal en ratones. Cada lote de ratones se dividió en tres grupos a los que les proporcionamos dieta control, dieta suficiente o dieta deficiente de biotina (grupos control, suficiente y deficiente). La dieta control es la que reciben los ratones en experimentación en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M. La dieta deficiente no contiene biotina y está preparada con 30% de clara de huevo como fuente exclusiva de proteína. La dieta suficiente es igual a la deficiente pero está adicionada con biotina para proporcionar las cantidades de la vitamina que requieren los ratones para su desarrollo normal. Las actividades de las carboxilasas en el hígado se determinaron por un método radioenzimático; la concentración de glucosa sérica y la actividad de la biotinidasa sérica se determinaron por métodos espectrofotométricos y las concentraciones séricas de GH e IGF-I se determinaron con estuches comerciales de ELISA tipo sándwich y competitivo, respectivamente. Los ratones alimentados con dieta deficiente de biotina tuvieron menor ganancia de peso corporal y reducciones en longitud nariz-ancas, largo y peso del fémur, peso del hígado, peso y celularidad del timo, concentraciones séricas de glucosa e IGF-I total y actividad específica de las carboxilasas PC y PCC hepáticas. Mientras que en los mismos

ratones deficientes de biotina se encontró mayor actividad de la biotinidasa sérica y de la concentración de GH circulante. Estos resultados indican que la deficiencia de biotina afecta el crecimiento y el desarrollo corporal del organismo por un mecanismo que involucra alteraciones en la homeostasis del sistema GH-IGF-I.

Abreviaturas usadas en este trabajo

ALS, proteína que forma un trímero con el complejo IGF-I-IGFBP-3- y es inestable con los ácidos; ALSKO, ratón knockout para la proteína ALS; DMT1, diabetes tipo 1; DMT2, diabetes tipo 2; GH, hormona de crecimiento; GHR, receptor de la GH; GHa, antagonista de la GH; IGF-I, factor de crecimiento similar a la insulina tipo I; IGFBPs, proteínas de unión a los IGFs; IGF-IKO, ratón knockout para el IGF-I; LID, ratón mutante condicional para la producción del IGF-I hepático; MCC, β -Metilcrotonil coenzima A (CoA) carboxilasa; PC, Piruvato carboxilasa; PCC, Propionil CoA carboxilasa; TEC, células tímicas epiteliales.

1 ANTECEDENTES

1.1 Biotina

La biotina es una vitamina hidrosoluble del complejo B y como tal debe proveerse en la dieta de los mamíferos ya que no la pueden sintetizar. Fue reconocida como un factor esencial de los sistemas vivos desde 1936. La molécula de biotina consiste en dos anillos heterocíclicos unidos a una cadena alifática de cuatro carbonos con un grupo carboxilo terminal (**Figura 1**). En los seres vivos la biotina está involucrada directamente en los importantes procesos metabólicos de gluconeogénesis, síntesis de ácidos grasos y catabolismo de aminoácidos en donde actúa como grupo prostético de las cinco enzimas carboxilasas que efectúan estas reacciones (19, 35).

Cuatro de estas enzimas, Piruvato carboxilasa (PC), Propionil coenzima A (CoA) carboxilasa (PCC), β -Metilcrotonil CoA carboxilasa (MCC) y Acetil CoA carboxilasa 2 (ACC2) son mitocondriales y la quinta, Acetil CoA carboxilasa 1 (ACC1), es citosólica. Después de cumplir su función estas enzimas son degradadas proteolíticamente en el sistema autofágico lisosomal (58).

La PC cataliza la conversión de piruvato a oxalacetato, un intermediario en la biosíntesis de glucosa. La ACC1 cataliza el primer paso en la biosíntesis de ácidos grasos formando malonil CoA a partir de acetil CoA. La PCC está involucrada en el catabolismo de varios aminoácidos con cadenas ramificadas y de ácidos grasos de cadena impar. La MCC cataliza la degradación de la leucina por medio de la conversión de β -metilcrotonil CoA a β -metilglutaconil CoA. Deficiencias de las carboxilasas y la consecuente acumulación de altas concentraciones de sus intermediarios metabólicos pueden tener profundos efectos en otras rutas metabólicas (**Figura 2**) (58, 35).

El paso final en la síntesis y activación de las carboxilasas es la formación de las holocarboxilasas activas por medio de la unión covalente de biotina a un residuo específico de lisina en la apoenzima. Esta unión se efectúa por la holocarboxilasa sintasa (HCS) (**Figura 1**).

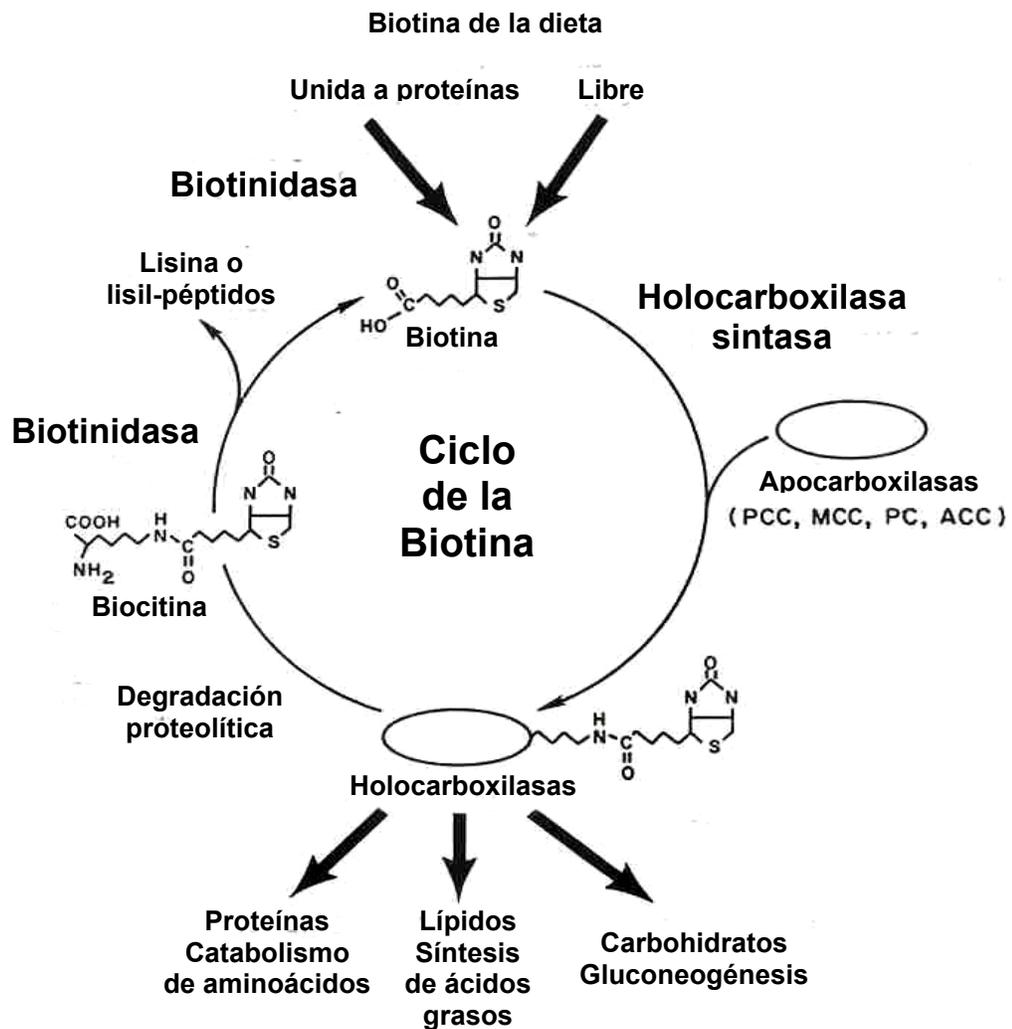


Figura 1. Ciclo de la Biotina. Las dos enzimas principales son la holocarboxilasa sintasa y la biotinidasa. La holocarboxilasa sintasa une covalentemente a la biotina con las diferentes apocarboxilasas para formar las holocarboxilasas activas. La biotinidasa libera a la biotina de la biocitina y de los pequeños péptidos biotinilados que se formaron en la degradación proteolítica de las holocarboxilasas (58).

En el proceso de la degradación proteolítica de las carboxilasas, se producen péptidos biotinilados y el dímero biotina-lisina que se llama biocitina. La biotinidasa cataliza la separación de la biotina de dichos compuestos (Figura 1) lo que permite que una parte importante de esta biotina sea reciclada. La biotinidasa está presente en la mucosa intestinal de varias especies y en el jugo pancreático y gránulos de zimógeno de las ratas. Se considera que esta enzima tiene una función importante en la digestión y absorción de la biotina en la dieta de los humanos. Una proteólisis extensiva es requerida antes de que la biotinidasa en el intestino pueda actuar en los péptidos biotinilados y producir biotina disponible para su absorción (58, 35).

1.2 Deficiencia de biotina

En 1916 fueron observados efectos tóxicos en ratas que recibían dietas que contenían una alta concentración de clara de huevo seca. Cuando la clara de huevo era la única fuente de proteínas, las ratas desarrollaron un síndrome caracterizado por trastornos neuromusculares, dermatitis severa y pérdida de pelo. Esta condición fue llamada “daño de la clara de huevo” y se mostró que era prevenida cuando la proteína se desnaturalizaba con calor o administrando alimentos adicionales como levadura, hígado o un compuesto de la yema de huevo que promovía el crecimiento de la levadura; este último fue identificado posteriormente como biotina. El inactivador de esta vitamina y causante del “daño de la clara de huevo” en las ratas es la glicoproteína avidina (19, 58).

Aunque la biotina aparece ampliamente en fuentes naturales de alimento, la concentración absoluta aún en las fuentes más ricas es muy baja en comparación con el contenido de las otras vitaminas. El hígado, riñón, yema de huevo y algunos vegetales son buenas fuentes de biotina pues contienen de 20 a 120 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, mientras que la carne, leche, fruta, cereales y productos de panadería la contienen de 1 a 10 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ (19, 58, 35).

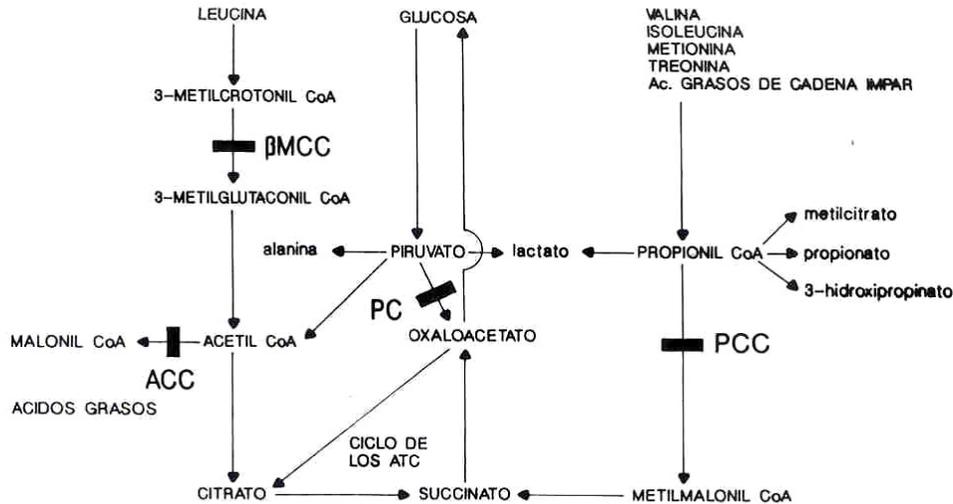


Figura 2. Vías metabólicas en las que participan las enzimas carboxilasas. Los bloques rectangulares sólidos indican la localización de las enzimas. PCC = Propionil CoA carboxilasa; β -MCC = β -Metilcrotonil CoA carboxilasa; PC = Piruvato carboxilasa; ACC = Acetil CoA carboxilasa (58).

1.3 Deficiencia de biotina en humanos

Hay dos defectos en las enzimas del ciclo de utilización de la biotina en humanos. Ambos trastornos resultan en Deficiencia Múltiple de Carboxilasas (DMC). La deficiencia en la holocarboxilasa sintasa, también conocida como DMC neonatal consiste en un defecto en la biotinilación y debe su nombre a que los síntomas se presentan poco después del nacimiento. Los síntomas clínicos incluyen dificultades en la alimentación y respiración, hipotonía, convulsiones, letargia y a veces hay retraso en el desarrollo y coma. Algunos niños presentan enrojecimiento cutáneo y alopecia. Los niños afectados presentan acidosis metabólica, aciduria orgánica e hiperamonemia leve o moderada. Los niños con esta deficiencia usualmente mejoran con la administración de 10 mg de biotina oral al día (19, 58).

La DMC Juvenil o de aparición tardía es causada por defecto de biotinidasa, lo que ocasiona una deficiencia en el reciclamiento de la biotina ya que no se puede reciclar la endógena ni liberar la de las proteínas en la dieta. Las características clínicas de la deficiencia de biotinidasa comúnmente incluyen convulsiones, hipotonía, ataxia, problemas respiratorios, pérdida de la audición, atrofia óptica, retraso en el desarrollo, enrojecimiento cutáneo, y alopecia. Otros signos incluyen conjuntivitis e infecciones fúngicas que probablemente se deben a anormalidades en la inmunorregulación. Los niños con esta deficiencia han sido tratados exitosamente con dosis de 5 a 20 mg de biotina oral al día (19, 57, 58, 35).

Han sido reportadas disfunciones inmunorreguladoras en varios niños con deficiencia de biotinidasa. Tres niños de una familia afectados por DMC juvenil tuvieron dermatitis por la levadura *Candida* (58). Uno de estos niños tenía deficiencia de inmunoglobulina A (IgA) y no respondió a la inmunización con neumococos, mientras que otro tenía cantidades subnormales de linfocitos T en la sangre periférica. Un tercer niño afectado, que fue estudiado antes del tratamiento con biotina, tenía cantidades normales de linfocitos B y T y respondió normalmente a la prueba dérmica con *Candida*. Un cuarto paciente tenía inmunoglobulinas séricas totales y linfocitos B normales, pero solamente la mitad de los niveles normales de linfocitos T. La actividad de los leucocitos para eliminar la *Candida* estaba reducida en este paciente y los neutrófilos carecían de actividad de mieloperoxidasa. Después de que el niño fue tratado con biotina, las funciones inmunológicas fueron normales (58)

Hay trastornos que involucran la actividad deficiente de sólo una de las carboxilasas y se ha encontrado que estos pacientes responden al tratamiento con biotina oral. El primer paciente descrito fue reportado en 1971 y tenía β -metilcrotonil glicinuria, trastorno donde las concentraciones de ácido β -metilcrotonico y β -metilcrotonilglicina eran muy elevadas en la orina. Varios días después de comenzar el tratamiento con biotina oral, los síntomas se resolvieron y se normalizaron los metabolitos urinarios (23, 24).

Las manifestaciones clínicas de la deficiencia de biotina se han desarrollado en niños y adultos que consumieron huevos crudos, los cuales contienen avidina activa, así como en pacientes que durante mucho tiempo recibieron una alimentación parenteral total sin biotina.

Estos últimos también tienen una baja actividad de la biotinidasa en el suero, probablemente debido a la deficiencia nutricional de proteínas (19, 58).

1.4 Deficiencia de biotina en animales de experimentación

Los trastornos producidos por la deficiencia de biotina también se han observado y estudiado en varios modelos de animales de experimentación. Se ha reportado que las ratas deficientes de biotina no desarrollan autoinmunidad experimentalmente inducida, además de presentar una reducción en el tamaño y celularidad del timo (42). Los cobayos alimentados durante 7-8 semanas con una dieta que contiene avidina, presentaron una reducción en el número de linfocitos B y T y un mayor porcentaje de neutrófilos (40). Se ha reportado que la deficiencia de biotina causa una maduración anormal en los huesos de pollos y pavos (6). Los pollos alimentados con una dieta purificada deficiente de biotina presentaron una reducción en el crecimiento y en el peso corporal así como patas torcidas y dermatitis (5, 54). La deficiencia de biotina en la dieta no solo afecta a los animales vertebrados, también afecta a los artrópodos. Cuando las moscas de la fruta *Drosophila melanogaster* de la cepa Canton-S son alimentadas con dietas que tienen diferentes cantidades de avidina y biotina, se observó un efecto diferencial entre machos y hembras tanto en el tiempo de vida como en la resistencia a la exposición al estrés oxidativo, siendo los machos aún más susceptibles que las hembras (29). Las moscas deficientes de biotina tienen menor actividad específica de la PCC y disminución en la concentración de biotina libre. La exposición de estas moscas al frío, al calor y al estrés oxidativo fue asociada con la movilización de biotina de fuentes aún desconocidas, sin importar el sexo o la cantidad de biotina y avidina en la dieta. Además, la cruce de machos y hembras deficientes de biotina produce una menor eclosión (larvas nacidas/huevo) (29).

En nuestro laboratorio está establecido un modelo experimental murino para estudiar la participación de la biotina en el funcionamiento del sistema inmune y en el crecimiento corporal. En este modelo cada lote de ratones de la cepa BALB/cAnN se divide en tres grupos experimentales: control, suficiente de biotina y deficiente de biotina. El grupo control es

alimentado con la misma dieta comercial que reciben los ratones de experimentación en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM (LM-485, Cat. T.7012.15, Harlan Teklad), los ratones del grupo deficiente con una dieta que carece de biotina y tiene 30% de clara de huevo seca como única fuente de proteína (TD-01363, Harlan Teklad); y los ratones del grupo suficiente con una dieta que también contiene 30% de clara de huevo seca pero adicionada con 0.004 g (16.4 μ mol) de biotina/kg (TD-01362, Harlan Teklad). Como ya se dijo, la clara de huevo contiene avidina, una glicoproteína que une a la biotina formando un complejo no covalente que impide la absorción de la vitamina por el intestino (19). Durante las primeras 6 semanas de estudio, los ratones alimentados con la dieta deficiente de biotina tuvieron una ganancia de peso corporal menor a la de los controles y entre las semanas 7 a 20 de estudio hubo una pérdida progresiva de peso (2). Adicionalmente, los ratones deficientes de la vitamina, en comparación con los ratones suficientes de biotina, tuvieron reducciones estadísticamente significativas en el peso de hígado, bazo y timo, así como reducción en la talla corporal, lo que sugiere que la biotina afecta el desarrollo y crecimiento corporal (2, 4).

1.5 Suplementación de Biotina

En los humanos sanos la suplementación con 8.8 μ mol biotina/día afecta la expresión del 0.8% de los genes estudiados (4 de 478). En estos voluntarios el análisis por PCR de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) muestra que la abundancia de los mRNAs que codifican para IL-1 β , IFN- γ y para la cadena α de la enzima MCC aumentaron en 5.6, 4.3 y 8.9 veces, respectivamente, mientras que no se afectó la abundancia de los mRNAs que codifican para la endoglina, una glicoproteína transmembranal que forma parte del complejo del receptor de TGF β , ni para la enzima PCC. En contraste, la abundancia del mRNA que codifica para IL-4 disminuyó 6.8 veces en las PBMC de los humanos suplementados (56). Por otra parte, la suplementación con 6.14 μ mol de biotina al día durante 28 días incrementa las actividades de las enzimas PCC, PC y ACC en las PBMCs de humanos sanos (3).

1.6 Biotina y metabolismo de glucosa

La glucosa es un monosacárido de 6 carbonos (hexosa) el cual es el combustible principal de la mayoría de los organismos y ocupa una posición central en el metabolismo. Es relativamente rica en energía potencial; la oxidación completa de la glucosa a dióxido de carbono y agua procede con un cambio de energía libre estándar de -2840 kJ/mol. El almacenamiento de glucosa en polímeros de alto peso molecular como el almidón o el glucógeno, permite que la célula tenga un gran reservorio de unidades de hexosa conservando la osmolaridad citosólica relativamente baja. Cuando súbitamente se incrementan las demandas de energía, la glucosa rápidamente puede ser liberada de estos polímeros de almacenamiento intracelulares y usarse para producir ATP aeróbica o anaeróticamente. La glucosa no sólo es un combustible, también es un precursor versátil capaz de suplir una amplia cantidad de metabolitos intermediarios para reacciones biosintéticas. En las plantas y animales la glucosa puede tener tres destinos principales: 1) reserva energética (como polisacárido o sacarosa); 2) oxidación a un compuesto de tres carbonos vía glicólisis (piruvato); y 3) oxidación a pentosas por la ruta de pentosas fosfatadas (fosfogluconato) (37).

La diabetes mellitus es una enfermedad en la que los niveles de glucosa en la sangre son mas elevados que en los individuos sanos. Esta alteración se produce porque la insulina no es secretada en cantidad suficiente o no estimula eficientemente a sus células blanco. A pesar de los niveles anormalmente altos de glucosa, las células están en inanición ya que no es internalizada. En la diabetes la hidrólisis de triacilglicerol, la oxidación de ácidos grasos, la gluconeogénesis y la formación de cuerpos cetónicos están elevados y esta condición es conocida como cetoacidosis (53). Hay dos tipos principales de diabetes mellitus: la diabetes mellitus juvenil o Tipo 1 (DMT1) que se desarrolla en los niños y su control depende de la administración de insulina; y la diabetes mellitus de adultos o Tipo 2 (DMT2) no dependiente de insulina, que se desarrolla después de los 40 años de edad.

En la diabetes tipo 1 la insulina está ausente o casi ausente porque el páncreas tiene células β defectuosas o bien carece de ellas. Esta enfermedad autoinmune en la que selectivamente se destruyen las células β pancreáticas se desarrolla a lo largo de varios años. Los síntomas clásicos surgen cuando más del 80% de estas células han sido destruidas y la esperanza de vida se reduce hasta un tercio como resultado de complicaciones degenerativas como mal funcionamiento del riñón y enfermedades cardiovasculares (53).

La diabetes tipo 2 usualmente ocurre en individuos obesos no necesariamente con una predisposición genética para esta condición en la que hay niveles normales o elevados de insulina. Como consecuencia, los niveles de glucosa en la sangre son cada vez mayores y sus complicaciones empeoran con el tiempo. Mientras que los desarreglos metabólicos de la diabetes tipo 1 son explicados fácilmente por la falta de insulina, las bases metabólicas de la diabetes tipo 2 no resultan tan evidentes. Una anomalía previa al desencadenamiento de la enfermedad es la hiperinsulinemia, la cual se encuentra asociada a una resistencia a la insulina, es decir que la insulina a concentraciones normales no es capaz de producir sus efectos, requiriendo mayor cantidad de ella para obtener funcionalidad: La diabetes sobreviene cuando las células β pancreáticas no son ya capaces de producir la cantidad extra de insulina para contrarrestar los efectos de la resistencia y es en esta etapa en donde se hace evidente la elevación anormal de la glucosa postprandial en el avance de la enfermedad. Es importante hacer hincapié que es esta incapacidad de la célula β para secretar insulina adicional, el evento crítico en el desarrollo de la diabetes tipo 2. Una subsiguiente disminución de insulina produce franca hiperglucemia tanto en ayuno como después de la ingestión de alimentos, esta hiperglucemia a su vez produce toxicidad en las células β afectando aún más su función secretora de insulina.

Varios estudios han mostrado que la biotina afecta el metabolismo de la glucosa. Se han observado correlaciones inversas entre las concentraciones de biotina y de glucosa en el suero de pacientes diabéticos. El estado diabético puede ser amortiguado por el tratamiento con biotina. Se ha observado una reducción de la hiperglucemia en pacientes con DMT1 y DMT2

tratados con biotina (34, 11). En pacientes diabéticos con hemodiálisis, las dosis farmacológicas de biotina mejoran su tolerancia a la glucosa oral (28). Los pacientes con DMT2 tienen el mismo estado funcional de biotina que los individuos no diabéticos, determinado por las actividades específicas de las enzimas PC, PCC y ACC en las PBMCs. La administración de dosis farmacológicas de biotina a individuos diabéticos induce un aumento de 2 a 3 veces en la actividad de las carboxilasas de los linfocitos periféricos (3), y en los diabéticos con concentraciones séricas de triacilglicerol mayores de 160 mg/dl, éste disminuyó a valores normales después de la suplementación con biotina (Revilla-Monsalve C, Zendejas I, Báez-Saldaña A, Rojas-Ochoa A, Vilches A y Fernandez-Mejía C. Manuscrito en preparación).

La deficiencia de biotina en ratas ha sido ligada a hiperglicemia y a la reducción en la utilización de la glucosa (12, 15). La suplementación de biotina mejora la tolerancia a la glucosa e insulina en ratones diabéticos KK, modelo animal para estudiar la diabetes tipo 2 (43). En ratas diabéticas, la administración de esta vitamina incrementa las actividades de algunas de las enzimas involucradas en la glicólisis en el hígado (13).

La biotina también afecta la expresión de genes que son críticos en el metabolismo de la glucosa. La glucocinasa es una enzima que tiene un importante papel en la homeostasis de la glucosa. La glucocinasa pancreática regula la secreción de insulina por las células β y la hepática regula la concentración postprandial de glucosa en la sangre así como la captura de glucosa en el hígado. La biotina regula el gen de la glucocinasa hepática a nivel transcripcional en ratas en ayuno (9, 14). Los islotes de Langerhans de ratas deficientes de biotina tienen el 50% de la actividad de glucocinasa y la mitad de su mRNA, además de una reducción en la secreción de insulina (45).

1.7 Hormona de crecimiento (GH)

Muchas bacterias, microorganismos y células en cultivo no pueden crecer en medio sin biotina (19); y el peso corporal de ratas, ratones, cerdos y pollos disminuye cuando son alimentados con dietas deficientes de biotina lo cuál sugiere que esta vitamina afecta el

crecimiento de los organismos (2,4,19). Los dos elementos fundamentales en el crecimiento de un tejido son la hipertrofia o el aumento del tamaño de las células y la hiperplasia o el aumento en el número de células por proliferación mitótica. En los vertebrados la hipertrofia se limita a una fase del crecimiento de los tejidos y el crecimiento continuo requiere de la multiplicación celular (18). La hormona de crecimiento (GH), también conocida como somatotropina, es un miembro de la familia de factores de crecimiento en la que se incluyen a la prolactina, lactogénos placentarios, proliferinas y somatolactina. Los miembros de la familia de la GH son secretados como monómeros de 22-25kDa y generalmente no son glicosilados (55).

Como su nombre lo indica, la GH controla principalmente el crecimiento corporal de los animales. La GH es una hormona hipofisaria (específicamente de la hipófisis anterior o *pars distalis*) que de acuerdo a su estructura primaria es un polipéptido lineal de 191 aminoácidos. En los vertebrados de edad juvenil produce un aumento en el crecimiento del esqueleto y de los tejidos blandos alcanzando su máxima expresión en la pubertad, aunque también ejerce muchos efectos metabólicos que persisten durante toda la vida como lipólisis y aumento del transporte de aminoácidos y de síntesis de proteínas en la célula (18, 10, 55). Debido a que la GH incrementa la toma de aminoácidos en el músculo esquelético, se ha sugerido que este tejido es el blanco principal de los efectos fisiológicos de la GH (32). En la rata macho, la GH es secretada en pulsos discretos con bajos niveles entre picos. En contraste, en la rata hembra la secreción de GH exhibe un patrón menos pulsátil y tiene niveles entre picos relativamente altos. Un dimorfismo sexual similar en el patrón de secreción de esta hormona en la rata ha sido reportado en los humanos (32). Por medio de hibridación *in situ* e inmunocitoquímica, se ha demostrado que la GH se expresa en la médula ósea, bazo, timo y nódulos linfáticos de humanos y de ratas y en la amígdala humana. Las ratas en desarrollo expresan esta hormona en tejidos linfoides mientras que las ratas adultas no la expresan (10).

La secreción de la GH está bajo control hipotalámico, es estimulada por la hormona liberadora de la GH (GHRH) e inhibida por la somatostatina (SRIF) (18, 47). Estas dos hormonas actúan uniéndose a receptores acoplados a proteínas G (GPCR) (47). Después de ser liberada por la glándula pituitaria la GH forma un complejo con una proteína de unión (GHBP)

identificada en el suero de muchas especies que esencialmente corresponde al dominio extracelular del receptor hepático de la GH (GHR). Se ha demostrado que la GHBP mejora los efectos promotores del crecimiento de la GH *in vivo* probablemente por incrementar su vida media. La GH del complejo GHBP se une a su receptor (GHR) altamente expresado en el hígado y tejido adiposo aunque también se encuentra en otros tejidos incluyendo intestino, cerebro, testículos, corazón, timo y músculo esquelético (44, 55). El GHR pertenece a la superfamilia de receptores de citocinas clase I cuyos procesos de transducción de señales utilizan cinasas de tirosina de la familia Janus (Jak) asociadas con transductores de señales y activadores de transcripción pertenecientes al grupo de reguladores transcripcionales, Stat (27).

La GH es una sustancia diabetogénica porque produce un aumento en la concentración de glucosa en la circulación, este efecto metabólico se debe en parte a que la GH antagoniza los efectos de la insulina. La GH también estimula la producción hepática de glucosa. El mecanismo mediante el cual la GH afecta la concentración sérica de glucosa no es bien conocido. El control de la secreción de la GH resulta del balance entre factores metabólicos, neuroendocrinos y navales. En los mamíferos la disminución de la concentración de glucosa en el plasma (hipoglucemia) durante el ayuno, estimula la secreción de GH y por el contrario la hiperglucemia de la obesidad la inhibe. Hay evidencias que indican que la GH reduce en sus células blanco el número de receptores a la insulina. La administración aguda de GH a explantes de grasa y de otros tejidos causa un efecto transitorio de toma de glucosa similar al de la insulina. En contraste, la exposición crónica de GH lleva a una resistencia a la insulina asociada con hiperinsulinemia que se debe principalmente a un defecto en el post-receptor de la señalización de la insulina (18, 32, 55).

1.8 Factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs)

La GH ejerce muchas de sus acciones somatogénicas a través de los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF-I e IGF-II) que son liberados subsecuentemente en respuesta a la GH (26).

Los IGFs son dos polipéptidos de 7-kDa estructuralmente relacionados que comparten una homología con la proinsulina. A diferencia de la insulina, los IGFs I y II se expresan ubicuamente, aunque de una manera altamente regulada. Están presentes en el suero y casi todos los tipos de células de los mamíferos pueden sintetizar y exportar ambos factores. En el hígado y en los tejidos periféricos como el hueso, cartílago y músculo al unirse la GH a su receptor (GHR), se produce IGF-I. El hígado es el principal productor del IGF-I en la circulación y en los otros tejidos su producción actúa de manera autocrina/paracrina. Estas proteínas fueron inicialmente llamadas somatomedinas debido a sus propiedades promotoras del crecimiento en numerosos tejidos y su nombre actual se debe a su estructura y a la incapacidad de los anticuerpos anti-insulina para suprimir su bioactividad. El sistema regulador de los IGFs en cada órgano es tejido-específico, aunque todos comparten ciertos componentes como son: ligandos (IGF-I e IGF-II), proteínas de unión (IGFBPs 1-6), receptores de IGFs (tipo I y II), y proteasas IGFBP-específicas. Los IGFs tienen un papel clave en el crecimiento lineal pre-adolescente, producen cambios metabólicos rápidos y tienen efectos promotores del crecimiento a largo plazo como reguladores autocrinos de la proliferación celular. La secreción y acción biológica de los IGFs son aspectos críticos del anabolismo fetal dependiente de la disponibilidad de insulina y nutrientes. Aunque ambos IGFs son mitógenos, el IGF-II es más activo durante la vida prenatal que el IGF-I (30, 38, 46, 47).

Las concentraciones séricas del IGF-I reflejan en cierto grado la secreción de la GH y han sido utilizadas clínicamente como un indicador del *status* de la GH (46). Los niveles de IGF-I en el plasma se correlacionan con la talla en los humanos. Los niños constitucionalmente altos tienen elevados niveles de IGF-I en el plasma, así como líneas de ratones seleccionadas por sus altos niveles séricos de IGF-I muestran un incremento en el peso corporal (32).

El IGF-I y la insulina tienen efectos tanto compartidos como individuales. La administración de IGF-I modifica el metabolismo de las proteínas incrementando su síntesis así como inhibiendo la proteólisis, mientras que la insulina principalmente actúa inhibiendo la proteólisis. El IGF-I también aumenta la toma de la glucosa en los tejidos periféricos, efecto que es similar al de la insulina (32).

Desde su descubrimiento hace más de 40 años, el IGF-I ha sido considerado un mediador de la actividad de la GH en el hueso. En el esqueleto, la GH estimula la producción local de IGF-I por los osteoblastos y condrocitos (46), lo que culmina en un proceso de proliferación y diferenciación de condrocitos en la placa de crecimiento epifisial de los huesos largos, seguida por la calcificación e incorporación al hueso metafisial (32).

El crecimiento y remodelación del hueso está reducido a las 2 semanas de edad en ratones knockout (KO) para el receptor de la GH (GHR-KO). Esta disminución se debe a la reducción prematura en la proliferación de condrocitos y en el crecimiento cortical del hueso. Aunque el grosor y volumen trabecular del hueso no cambian, su recambio o tasa de formación fue reducida significativamente así como muchos marcadores histomorfométricos de la formación y reabsorción del hueso. Estos resultados indican una clara función de la GH en el alto nivel del recambio del hueso observado durante el crecimiento. El tratamiento con IGF-I humano a los ratones carentes de GHR, restableció completamente todos los defectos observados en el crecimiento y remodelación del hueso, lo que indica un efecto directo de este factor en los osteoblastos y condrocitos. En contraste, los ratones knockout para el factor de transcripción Stat5ab no presentaron las mismas alteraciones que los ratones GHR-KO, lo que indica que no se necesita la activación de Stat5 para la remodelación del hueso (49).

Las acciones biológicas de los IGFs son moduladas por una familia de al menos 6 proteínas de unión a los IGFs (IGFBPs), que son producidas por muchos tejidos y se encuentran en la circulación y en los compartimentos extracelulares. Las IGFBPs varían en longitud de 216 a 289 aminoácidos y están compuestas de dominios compartidos amino y carboxilo terminales ricos en cisteína mientras que la porción central de cada IGFBP es única. Más del 90% de los IGFs presentes en la sangre y otros fluidos biológicos están unidos a IGFBPs, interacción que sirve para propósitos específicos como mantener las reservas de estos factores de crecimiento (50, 22), inhibir o potenciar sus efectos e incluso pueden tener efectos independientes (30). La IGFBP-3 en conjunto con otra proteína, la subunidad inestable al ácido (ALS), forma un trímero de 150 kDa con el IGF-I el cual es el responsable de mantener los niveles de IGF-I en la sangre y también sirve para prolongar la vida media del IGF-I sérico de 10 minutos a 15 horas y para

prevenir los efectos hipoglucémicos de los IGFs libres. Otras IGFBPs como IGFBP-1, IGFBP-2 e IGFBP-4, pueden cruzar las barreras endoteliales y transportar IGFs desde la circulación a los tejidos periféricos. Las IGFBPs que se encuentran en los ambientes extracelulares de diversos tejidos, pueden regular la accesibilidad del IGF a sus receptores y/o proveer un depósito local de almacenamiento. Estas funciones locales pueden ser moduladas por interacciones con componentes tanto de la matriz extracelular como de la superficie celular. Los niveles locales de varias IGFBPs son modificados por medio de proteólisis específicas, de esta manera las interacciones dinámicas entre los IGFs y sus proteínas de unión regulan su disponibilidad y por lo tanto su función. Todas las IGFBPs inhiben el crecimiento porque impiden la unión del IGF a su receptor, sin embargo, el secuestro de IGF por las IGFBPs puede mejorar sus efectos presentándolo y liberándolo lentamente a su receptor y a su vez, esto protege al receptor de la regulación negativa por la alta exposición al IGF-I (50, 22).

Las funciones biológicas de los IGFs son mediadas por una familia de receptores transmembranales, que incluyen al receptor de insulina, al del IGF-I y del IGF-II/manosa-6-fosfato. El receptor IGF tipo I (IGF-1R) se expresa ubicuamente y con el receptor de insulina comparte >50% de identidad de aminoácidos en su secuencia. Puede unir insulina, IGF-I, o IGF-II, aunque la afinidad para la insulina es 100 veces menor que para IGF-I (46, 50).

El grupo del Dr. LeRoith desarrolló un ratón mutante condicional para el IGF-I producido en el hígado (LID), el cual crece normalmente sugiriendo que otros mecanismos además de la forma endocrina del IGF-I pueden estar involucrados. Aunque el 75% del IGF circulante es proporcionado por el hígado, un crecimiento y desarrollo normal son posibles aún en ausencia de la producción del IGF-I hepático (60). Los ratones hembras LID tratadas a largo plazo con GH humano recombinante (rhGH) responden al crecimiento post-natal en términos de peso y longitud corporal mientras que los machos son resistentes a este tratamiento. Los autores de este trabajo sugieren que esta respuesta sexualmente dimórfica se debe a diferencias programadas genéticamente en los patrones de secreción de la GH (33). Los ratones dobles mutantes IGF-IKO y knockout para la subunidad inestable al ácido (ALSKO) tuvieron 85 a 90% menor concentración de IGF-I plasmático, también presentaron reducciones en el peso

corporal, longitud nariz-ancas y longitud del fémur. Sin embargo, estos dobles mutantes presentaron niveles séricos elevados de GH e insulina en comparación con los controles y con los ALSKO (61). Por otra parte, utilizando ratones LID los autores del grupo del Dr. LeRoith produjeron ratones transgénicos para el antagonista de la GH (GHa) lo cual permite bloquear la acción de la GH dando origen a los dobles mutantes LID+GHa. Tanto en los ratones GHa como en los dobles mutantes LID+GHa se presentaron reducciones significativas en los niveles séricos de IGF-I, glucosa e insulina así como en el peso corporal, aunque estos dobles mutantes tienen niveles elevados de grasa corporal y leptina (62).

El perfil nutricional de un individuo afecta profundamente las concentraciones de GH e IGF-I séricos. Por ejemplo, la desnutrición de proteínas y calorías limita severamente la síntesis de IGF-I en el hígado, lo que causa una reducción del 50% en su concentración circulante (46). Con modelos de manipulación dietética en ratas, como deficiencia de lisina, de potasio, de zinc o por exceso de selenio, la secreción de GH está afectada además de producir retraso en el crecimiento y presentar bajas concentraciones de IGF-I sérico (51).

En el ayuno, la cantidad de IGFBP-1 en circulación se incrementa y una IGF-I con mayor avidéz. Esto ocurre porque hay una disminución en la disponibilidad del sustrato y concentraciones suprimidas de insulina (46). En ratas, la restricción dietética causa que las concentraciones séricas de insulina disminuyan; además las ratas diabéticas deficientes de insulina tienen bajos niveles de IGF-I sérico asociados con una reducción en la unión de GH al GHR en el hígado y el reemplazo de insulina restaura ambos parámetros a niveles normales. Por esto Thissen et al. 1999 (52) sugieren que la insulina puede regular las concentraciones séricas de IGF-I, tal vez a través de cambios en la unión de GH a su receptor en el hígado.

Estudios efectuados en ratones normales y ratones knockout para el receptor de GH (GHR-KO) muestran que la restricción calórica al 70% desde el destete, produce una reducción significativa en el peso corporal solamente en los animales normales mientras que las concentraciones séricas de glucosa e insulina son menores por la restricción calórica para ambos fenotipos. El IGF-I circulante también disminuye significativamente en los ratones normales con restricción calórica, mientras que en los ratones GHR-KO no es detectable ni en los que se

alimentaron *ad libitum*. Estos datos indican un deterioro en la acción de la GH en los ratones GHR-KO, que son más sensibles a la insulina y secretan menos insulina en respuesta a la glucosa (1).

En los órganos linfoides del sistema inmune, los IGFs tienen una función importante. Los IGFs y sus receptores han sido descritos en el timo de humanos y roedores. Los receptores son expresados principalmente por los timocitos, mientras que los factores IGF-I e IGF-II son producidos por macrófagos y células tímicas epiteliales (TEC) respectivamente (21).

Existen diversos reportes que demuestran que el IGF-I tiene una función importante en la proliferación y supervivencia de los timocitos. En los timocitos humanos la síntesis de DNA puede ser estimulada directamente por el IGF-I *in vitro*. En ratas y ratones, el tratamiento *in vivo* con IGF-I estimula la timopoyesis incrementando el tamaño y la celularidad del timo significativamente; además de duplicar los linfocitos inmaduros (CD4⁺CD8⁻) y aumentar la masa del timo sin cambiar el número de células dobles positivas. Colectivamente, estos estudios apoyan que el IGF-I ejerce sus efectos mitogénicos preferentemente en los timocitos inmaduros doble negativos (21, 36). El IGF-I ha sido de interés particular en el contexto de la involución del timo. Las concentraciones circulantes de IGF-I declinan con la edad en ratas y humanos. El IGF-I promueve la recuperación del timo después del tratamiento con ciclosporina. Dada su función como mitógeno para los timocitos y su efecto antiapoptótico en diferentes sistemas celulares, puede ser uno de los factores cuya reducción contribuye al declive de la timopoyesis con la edad. Esta posibilidad ha surgido porque se ha visto que la administración de IGF-I a roedores y primates viejos incrementa la celularidad del órgano aunque la producción de timocitos no es restaurada a los niveles presentes en los animales jóvenes (10, 36, 31).

2 Justificación

Aunque se sabe que la deficiencia nutricional de calorías y proteínas puede afectar las concentraciones séricas de factores de crecimiento como los IGFs y la GH, se han hecho pocos estudios para determinar la participación individual de los múltiples nutrimentos en las alteraciones de estos factores.

Nuestro laboratorio ha demostrado que los ratones que reciben una dieta deficiente de biotina presentan una reducción en la talla y el peso corporal así como la involución acelerada del timo; sin embargo, el mecanismo de estos efectos no se conoce.

En este trabajo estudiamos si la biotina afecta los niveles circulantes de la GH y del IGF-I como posibles factores a través de los cuales la deficiencia de biotina deteriora el crecimiento.

2.1 Hipótesis

El grupo de ratones con dieta deficiente de biotina presentará alteraciones en las concentraciones séricas del sistema GH e IGF-I en comparación con los grupos de ratones alimentados con dieta control y dieta suficiente de biotina.

3 Objetivo General

Con el fin de analizar algunos de los factores que intervienen en el deterioro del crecimiento de los ratones deficientes de biotina, se determinarán las concentraciones séricas de GH, IGF-I y glucosa en los ratones deficientes de biotina.

3.1 Estrategia experimental

Determinar en los ratones en estudio a las 0, 2, 4, 8, 12, 16 y 20 semanas los siguientes parámetros:

- 1 Peso corporal y largo nariz-ancas
- 2 Longitud y peso del fémur
- 3 Peso del hígado y del timo
- 4 Contenido de células en el timo
- 5 Concentración de glucosa sérica
- 6 Actividad de biotinidasa sérica
- 7 Concentraciones séricas de GH e IGF-I
- 8 Actividad específica de las carboxilasas PCC y PC en el hígado

4 Materiales y Métodos

El procedimiento que se presenta a continuación se basa en el modelo experimental establecido en el laboratorio (2, 4), pero modificado en la edad de los ratones de 3 semanas en lugar de 4 al inicio de la experimentación.

Las composiciones de las soluciones utilizadas en esta sección se encuentran detalladas en el Apéndice 1. En el Apéndice 2 se presenta una tabla que describe las cantidades de los componentes en las dietas proporcionadas a los ratones.

Ratones. Los ratones macho de la cepa BALB/cAnN se obtuvieron de la colonia de crianza del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M. y fueron cuidados y manipulados según los procedimientos establecidos por el Comité Ético para la Experimentación con Animales de este Instituto. Los ratones estuvieron en condiciones de barrera microbiológica con ciclos de 12 horas de luz y oscuridad y se les permitió el consumo de agua y alimento *ad libitum*. Dos lotes de 60 a 66 ratones de 3 semanas de edad fueron divididos en tres grupos experimentales. El grupo control fue alimentado con la misma dieta comercial que reciben los ratones para experimentación en el bioterio (LM-485, Cat. T.7012.15, Harlan Teklad); los ratones del grupo deficiente fueron alimentados con una dieta que carece de biotina y tiene un 30% de clara de huevo seca como única fuente de proteína (TD-01363, Harlan Teklad) y los ratones del grupo suficiente con una dieta que también contiene 30% de clara de huevo seca pero adicionada con 0.004 g (16.4 μ mol) de biotina/kg (TD-01362, Harlan Teklad).

Los análisis se efectuaron a las 0, 2, 4, 8, 12, 16 y 20 semanas después de recibir las dietas descritas. El día del experimento, 3 a 5 ratones de cada grupo se sometieron a ayuno por 5-6 horas antes de iniciar la toma de muestras. Los ratones se anestesiaron con éter dietílico, se pesaron y se sangraron a blanco por el plexo axilar. Después de extraer la sangre, cada ratón fue puesto sobre una regla de metal con las 4 extremidades extendidas a los lados y se midió la longitud hasta el inicio de la cola colocando en 0 el punto distal de la nariz. Inmediatamente después los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, se extrajo el timo, el hígado y

el fémur y se registró el peso correspondiente. Los hígados fueron congelados a -70°C hasta el momento de medir las actividades enzimáticas de las carboxilasas. El largo del fémur se midió con un vernier después de eliminar el músculo adherido. El suero sanguíneo se obtuvo por centrifugación y se separó en las alícuotas convenientes para congelarlo a -70°C hasta el momento de los análisis de la concentración de glucosa, actividad de biotinidasa y concentraciones de GH e IGF-I.

Contenido de células en el timo. Las células del timo fueron separadas de las cápsulas fibrosas presionando el timo con pinzas rectas y dispersándolas suavemente en PBS*. Una alícuota de la suspensión de células de este órgano en cada ratón se midió en un contador automático Beckman Coulter T890 o en una cámara de Neubauer.

Determinación de la actividad específica de PCC y PC. El día del análisis, los hígados se descongelaron y todos los preparativos para medir las actividades enzimáticas se efectuaron en baño de hielo. Cada hígado se homogenizó en PBS con pistilo de teflón adaptado a un motor (TALBOYS modelo 101; Troemner. LLC. Thorofore, NJ). Los homogenados se centrifugaron en una centrífuga a $1200 \times g$ durante 10 min a 6°C y se desechó el sobrenadante. El pellet se resuspendió y los eritrocitos se lisaron con 2 ml de solución hemolizante durante 2 minutos. Después se agregó PBS frío (13 mL) y se centrifugó nuevamente como se indicó anteriormente. Nuevamente se desechó el sobrenadante, el botón de células libre de eritrocitos se resuspendió y una alícuota se diluyó con amortiguador de lisis. La suspensión de hepatocitos se lisó en un sonicador (Serie 4710; Cole Parmer Instrument Co, Chicago) a 24 W durante 2 ciclos de 30 descargas de 1 s cada una. La actividad enzimática fue determinada en las muestras sonicadas por un método radioenzimático que utiliza $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (8) modificado por nosotros (4). La concentración de proteínas en las muestras sonicadas se determinó por el método de Bradford (7).

Determinación de glucosa sérica. La concentración de glucosa en el suero se midió por el método espectrofotométrico de o-Toluidina reportado por Henry *et al.* (25). Los sueros se analizaron por duplicado y las densidades ópticas se midieron a 625 nm por duplicado en un lector de ELISA (Multiskan Ascent, Thermo Labsystems; o UltraMicroplate Reader EL_X808,

Bio-Tek Instruments, Inc.). La concentración de glucosa se calculó por regresión lineal a partir de la curva estándar de glucosa (Apéndice 5).

Determinación de la actividad de la biotinidasa en el suero. Es la implementación del método espectrofotométrico de Knappe (reportado por Wolf (57)). Este método utiliza el sustrato sintético biotín-p-aminobenzoato del cual se libera el ácido p-aminobenzoico (PABA) por la acción de la biotinidasa. Los sueros se analizaron por duplicado, la reacción de color también se hizo por duplicado y las densidades ópticas se midieron a 540 nm en un lector de ELISA (Multiskan Ascent, Thermo Labsystems; o UltraMicroplate Reader EL_x808, Bio-Tek Instruments, Inc.). La cantidad de producto formado se calculó por regresión lineal a partir de la curva estándar con PABA (Apéndice 5).

Determinación de las concentraciones de GH e IGF-I. Estas hormonas se midieron con estuches comerciales de Diagnostic Systems Laboratories, Inc. siguiendo las instrucciones del fabricante. El estuche Active Rat IGF-I EIA (DSL-10-2900) es un inmunoensayo competitivo de unión enzimática. Los estándares, controles y muestras que contienen IGF-I fueron incubados con IGF-I de rata marcado con biotina y un suero de cabra anti-IGF-I de rata en pozos de microtitulación cubiertos con una gamma globulina de conejo anti-cabra donde los antígenos marcados con biotina y los no marcados compiten por un número limitado de sitios de unión IGF-I anti-rata. Después de la incubación y los lavados, la reacción se reveló con el sistema estreptavidina-HRPO usando como sustrato tetrametilbenzidina (TMB). Al final se depositó una solución ácida para detener la reacción y se leyó la placa a 450 nm con referencia de 620 nm. Los cálculos de las concentraciones también se hicieron siguiendo las instrucciones del estuche (Apéndice 6).

El estuche Active Mouse/Rat Growth Hormone ELISA (DSL-10-72100) es un inmunoensayo tipo sándwich de un paso amplificado enzimáticamente. En el ensayo, los estándares, controles y muestras fueron incubados en pozos de microtitulación cubiertos con anticuerpos para GH anti-rata/ratón en presencia de otros anticuerpos de detección de GH anti-rata/ratón marcados con la enzima HRPO. Después de una incubación y lavados, la reacción se reveló con el sustrato tetrametilbenzidina (TMB). Al final se depositó una solución ácida para

detener la reacción y se leyó la placa a 450 nm con referencia de 620 nm. Los cálculos de las concentraciones también se hicieron siguiendo las instrucciones del estuche (Apéndice 6).

4.1 Análisis estadístico

Se compararon las medias por medio de un ANOVA de 2 vías utilizando el software STATISTICA 5.0 (StatSoft). *Se consideró $p < 0.05$ como valor significativo. La prueba *Post Hoc* fue la prueba de Tukey HSD.

5 RESULTADOS

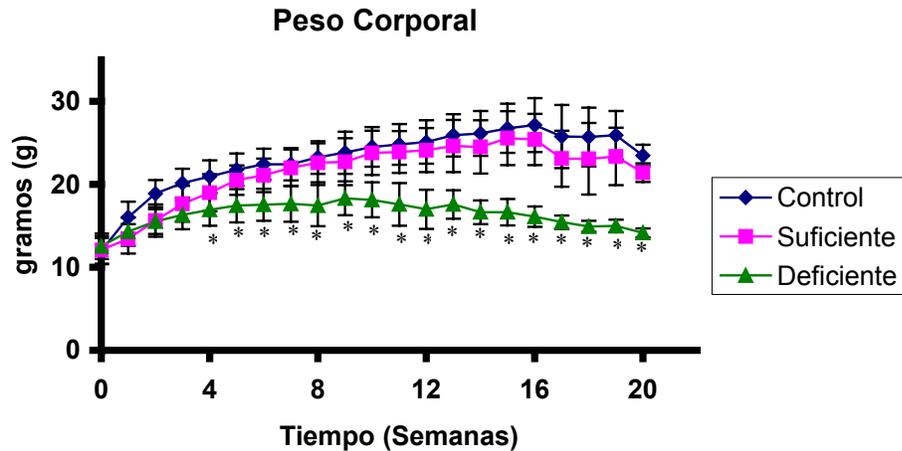
Los resultados que se presentan a continuación son los datos combinados de dos lotes de 60-66 ratones machos BALB/cAnN, excepto para las actividades de las carboxilasas en el hígado en los cuales el número de muestras analizadas fue menor. Detalles de cada una de las figuras se presentan en los cuadros correspondientes del Apéndice 3. El intervalo de concentración normal de glucosa en el suero de los ratones está en el Apéndice 4. En el Apéndice 5 se encuentran las curvas estándar promedio de los ensayos realizados para determinar la concentración de glucosa y la actividad de biotinidasa en el suero de los ratones. En el Apéndice 6 se muestran las curvas estándar obtenidas con los estuches comerciales para medir IGF-I y GH.

La Ganancia de Peso Corporal es Menor en los Ratones Deficientes de Biotina.-

Para observar si la presencia y deficiencia de biotina en la dieta afecta a los ratones a nivel general se midió el peso corporal durante 20 semanas de estudio a partir del destete a las 3 semanas de edad. El peso de los ratones al destete ($t = 0$) fue 12.5 ± 1.5 g. Los ratones alimentados con las dietas control y suficiente mostraron ganancia de peso corporal hasta las 16 semanas de estudio cuando alcanzaron su mayor peso de 26 ± 3.2 g; mientras que los ratones deficientes de biotina tuvieron un peso máximo de 17 ± 1.9 g a las 4 semanas, que se mantuvo hasta las 10 semanas para después disminuir hasta 14 ± 0.5 g a las 20 semanas (* $p < 0.0003$; **Figura 1**). Durante las 20 semanas de estudio, el peso corporal de los tres grupos de ratones se comportó como lo reportamos previamente (2).

La Deficiencia de Biotina Produce Disminución en el Largo Nariz-Ancas y

Longitud y Peso del Fémur.- Debido a que la deficiencia de biotina produce pérdida de peso corporal, determinamos en los ratones en estudio si también se afectaba su talla corporal. Además, medimos el largo y peso del fémur como un miembro representativo del esqueleto que nos indica si las alteraciones en la talla corporal se pueden deber a deformaciones óseas. El largo nariz-ancas fue 7.6 ± 0.3 cm. al inicio de la experimentación. En los ratones de los grupos control y suficiente aumentó hasta 9.9 ± 0.4 cm. a partir de las 16 semanas (**Figura 2**). Los



.....**Figura 1.** Peso corporal promedio (\pm SD) de ratones BALB/cAnN machos con dietas Control (\blacklozenge), Suficiente de biotina (\blacksquare), y Deficiente de biotina (\blacktriangle). * $p < 0.0003$

ratones del grupo deficiente de biotina tuvieron un patrón diferente; crecieron igual que los grupos control y suficiente sólo las dos primeras semanas de experimentación y aunque a las 8 semanas alcanzaron la máxima longitud nariz-ancas de 8.9 ± 0.3 cm, este parámetro fue, desde las 4 semanas, significativamente menor que el de los ratones con dietas control o suficiente (* $p < 0.00001$). El formato de esta cinética se correlacionó exactamente con el largo del fémur, ya que también alcanzó el valor máximo de 1.58 ± 0.06 cm. a las 16 semanas en los ratones de los grupos control y suficiente y también fue significativamente menor desde las 4 semanas en los ratones deficientes de biotina (* $p < 0.0096$; **Figura 3**). La cinética del peso de los fémures fue diferente a las del largo nariz-ancas y largo del fémur para los tres grupos experimentales (**Figura 4**). En los grupos control y suficiente hubo 2 fases de aumento en el peso del fémur; de 0 a 8 semanas y de 12 a 16 semanas con las correspondientes etapas constantes de 8 a 12 y de 16 a 20 semanas. En cambio, el peso del fémur de los ratones deficientes de biotina fue igual que en los ratones con dietas control y suficiente solamente hasta las 4 semanas. A partir de este tiempo se mantuvo constante pero significativamente menor desde las 8 semanas de

experimentación siendo de 45 ± 1.9 mg cuando el peso del fémur de los ratones con dietas control y suficiente fue de 54 ± 3.4 mg (* $p < 0.00001$).

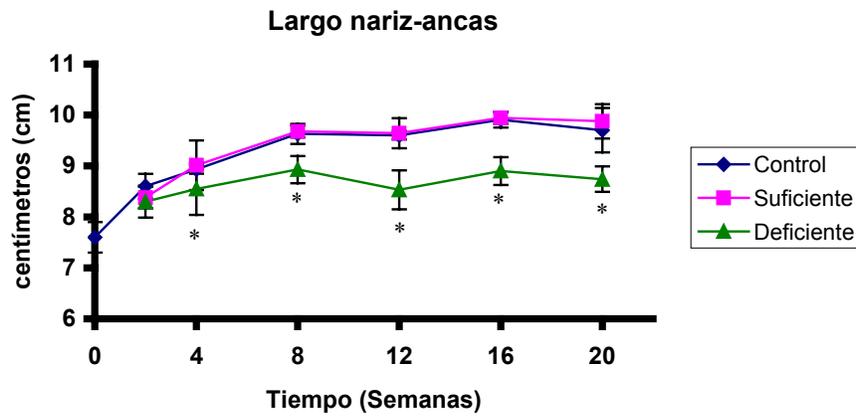


Figura 2. Largo nariz-ancas de ratones machos BALB/cAnN alimentados con dietas control (◆), suficiente (■), y deficiente de biotina (▲). Los valores representan el promedio \pm SD para cada tiempo de estudio. * $p < 0.00001$.

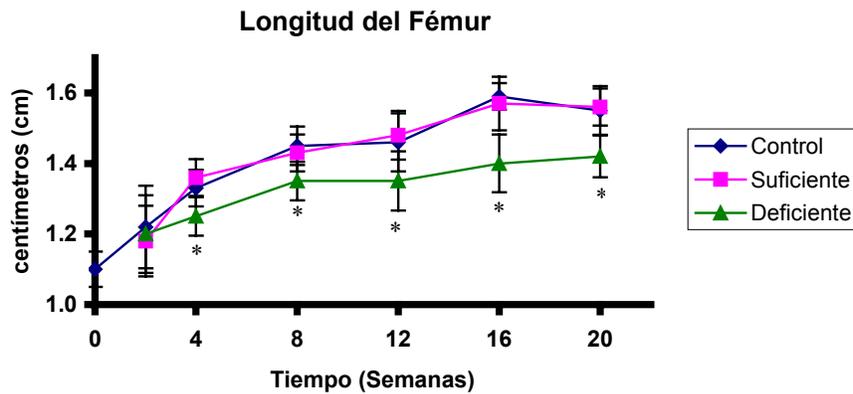


Figura 3. Longitud promedio (\pm SD) del fémur de ratones BALB/cAnN machos con dietas control (◆), suficiente de biotina (■), y deficiente de biotina (▲). * $p < 0.0096$

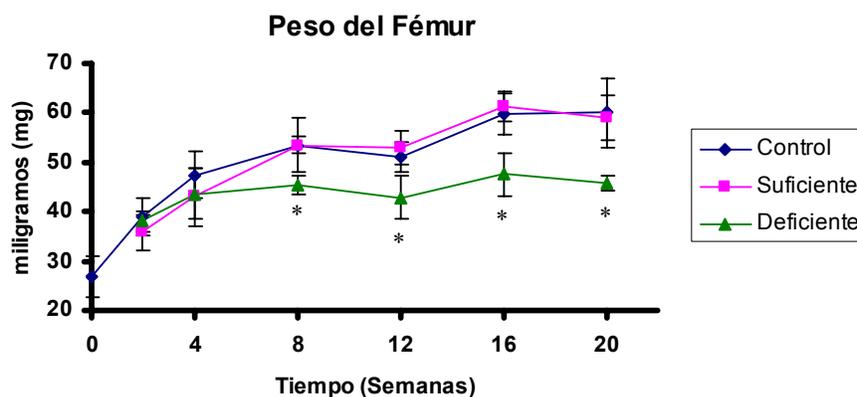


Figura 4. Peso promedio (\pm SD) del fémur de ratones BALB/cAnN machos alimentados con dietas control (\blacklozenge), suficiente (\blacksquare), y deficiente de biotina (\blacktriangle). * $p < 0.00001$

La Deficiencia de Biotina También Disminuye el Peso de Hígado y Timo y la Celularidad del Timo.- Para determinar si la disminución en el peso corporal por la deficiencia de biotina afecta proporcionalmente a un órgano en particular, se midieron el peso del hígado, el peso del timo y la celularidad del timo. Los ratones de los grupos control y suficiente duplicaron el peso del hígado en las primeras 8 semanas de estudio de 596 ± 92 mg ($t = 0$) al máximo peso de 1147 ± 110 mg (**Figura 5**). En cambio, en el mismo intervalo, el peso del hígado de los ratones del grupo deficiente de biotina se mantuvo constante y después de las 8 semanas además disminuyó hasta 497 ± 29 mg a las 20 semanas (* $p < 0.00001$). El peso del timo en los ratones de tres semanas de edad ($t=0$) fue 76 ± 12 mg el cual durante las primeras 4 semanas de experimentación disminuyó hasta 50 ± 17 mg en los ratones con dietas control y suficiente de biotina y así se mantuvo hasta las 20 semanas. Mientras que en los ratones del grupo deficiente de biotina el peso del timo disminuyó más pronunciadamente siendo significativamente menor desde las 4 semanas de estudio; continuando la reducción hasta las 16 semanas cuando pesó 18 ± 4.5 mg (* $p < 0.00001$, **Figura 6**). La reducción en el peso del timo se correlacionó directamente con la celularidad de este órgano (**Figura 7**). Al inicio de la experimentación el contenido de timocitos fue $268 \pm 16 \times 10^6$. Para los 3 grupos, en las primeras 2 semanas de estudio el número de timocitos disminuyó ligeramente, pero entre las 2 y 4 semanas la

reducción fue más intensa, teniendo $118 \pm 32 \times 10^6$ timocitos en los grupos control y suficiente y $38 \pm 32 \times 10^6$ células en el timo del grupo deficiente; valor significativamente menor desde este tiempo y hasta el final del estudio ($*p < 0.00001$). Las células en el timo de los ratones con dietas control y suficiente se mantuvieron constantes entre las 4 y 16 semanas, presentando un nuevo decremento a las 20 semanas cuando tuvieron $58 \pm 28 \times 10^6$ timocitos. En el timo de los ratones deficientes de biotina la forma de disminución de la celularidad fue paralela a la de los grupos suficiente y control pero en mayor magnitud, ya que a las 20 semanas tuvieron $7.8 \pm 2.0 \times 10^6$ timocitos.

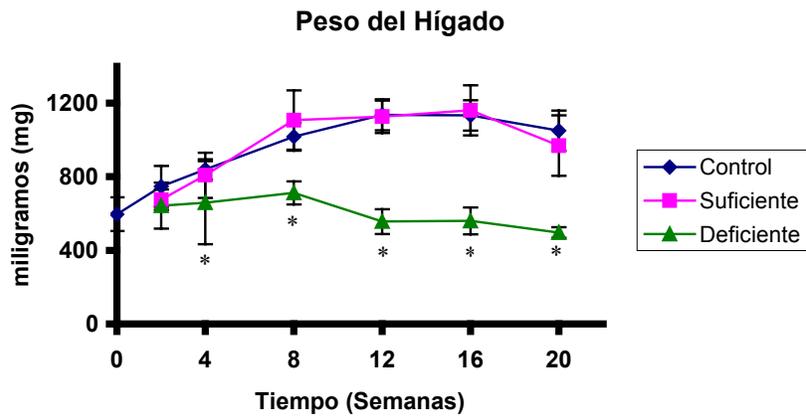


Figura 5. Peso promedio (\pm SD) del hígado de ratones machos BALB/cAnN con dietas control (\blacklozenge), suficiente de biotina (\blacksquare), y deficiente de biotina (\blacktriangle). $*p < 0.00001$

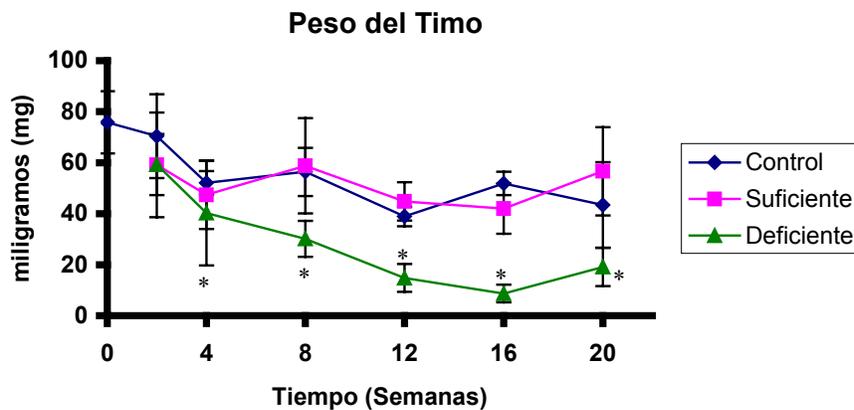


Figura 6. Peso promedio (\pm SD) del timo de ratones machos BALB/cAnN alimentados con las dietas control (\blacklozenge), suficiente de biotina (\blacksquare), y deficiente de biotina (\blacktriangle). $*p < 0.00001$

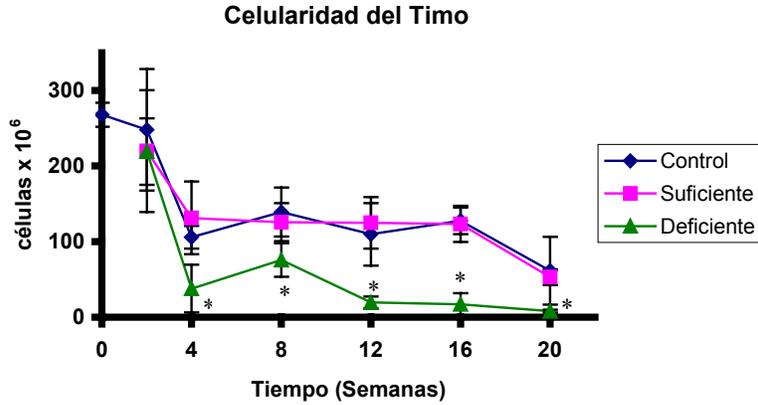


Figura 7. Celularidad del Timo (\pm SD) de ratones machos BALB/cAnN con dietas control (\blacklozenge), suficiente (\blacksquare), y deficiente de biotina (\blacktriangle). $p < 0.6378$

La Concentración Sérica de Glucosa Disminuye Significativamente en la Deficiencia de Biotina.- Debido a que la PC es la enzima que lleva a cabo el primer paso de la gluconeogénesis, se determinó la concentración de glucosa en el suero de los ratones alimentados con las diferentes dietas. La concentración de glucosa en el suero de los ratones que recibieron dietas control y suficiente se mantuvo en 119 ± 35 mg. glucosa/100 mL durante el estudio (**Figura 8**). El mismo formato de los parámetros descritos anteriormente se observó para la glucosa circulante en los ratones deficientes de biotina. Fue significativamente menor desde las 4 semanas de experimentación y continuó disminuyendo hasta las 20 semanas con la dieta deficiente de la vitamina ($*p < 0.00001$).

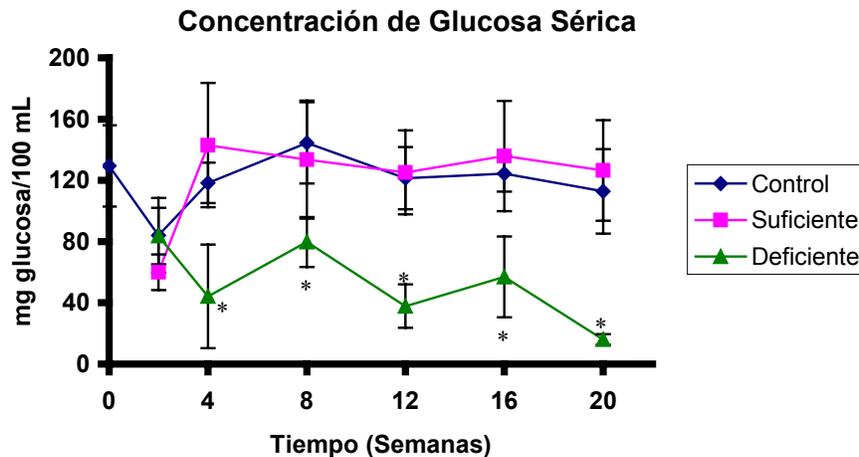


Figura 8. Concentración de glucosa sérica (\pm SD) de ratones BALB/cAnN machos alimentados con dietas control (\blacklozenge), suficiente (\blacksquare), y deficiente de biotina (\blacktriangle). $*p < 0.00001$

La Deficiencia de Biotina Aumenta la Actividad de Biotinidasa en el Suero.- Para determinar si la deficiencia de biotina tiene un efecto en la biotinidasa se midió la actividad enzimática de esta enzima hidrolítica en los ratones alimentados con las diferentes dietas. En contraste con la reducción en todos los parámetros anteriormente mencionados, para los ratones deficientes de biotina, la actividad de la biotinidasa sérica en este grupo aumentó significativamente (* $p < 0.0048$; **Figura 9**). Durante el estudio la actividad promedio de la biotinidasa sérica en los ratones con dietas control y suficiente se mantuvo en 5.9 ± 15 nmol de producto formado/mL x min., mientras que en los ratones deficientes de biotina fue en promedio de 6.9 ± 1.8 nmol de producto formado/mL x min.

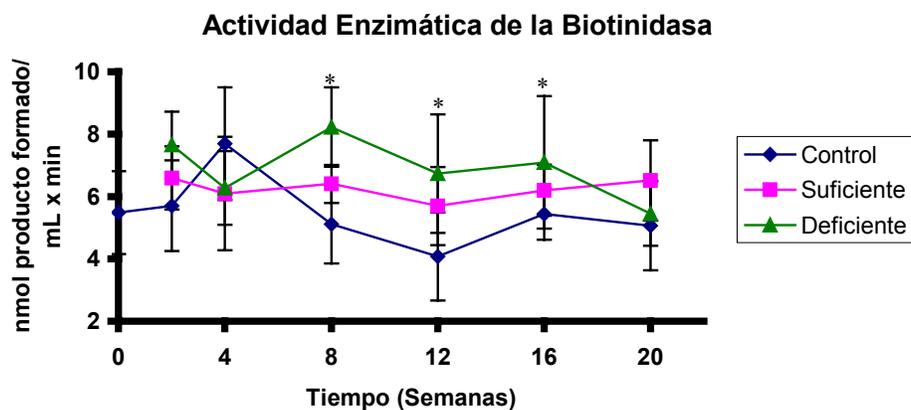


Figura 9. Actividad enzimática de la enzima Biotinidasa (\pm SD) de ratones BALB/cAnN machos con dietas control (◆), suficiente de biotina (■), y deficiente de biotina (▲). * $p < 0.0048$

Las Concentraciones Circulantes de GH e IGF-I están Alteradas por la Deficiencia de Biotina.- Para determinar si la biotina tiene un efecto en el eje GH-IGF-I se midieron las concentraciones circulantes de estos factores de crecimiento en los ratones alimentados con las diferentes dietas. Las concentraciones circulantes de estas dos hormonas se mantuvieron constantes durante la experimentación en los ratones de los grupos suficiente y control (**Figuras 10 y 11**). En los ratones deficientes de biotina el patrón de las concentraciones séricas de IGF-I total se correlacionó con el largo de la nariz a las ancas, largo del fémur y peso del fémur en el

mismo grupo de ratones, ya que disminuyeron significativamente desde las 8 semanas de experimentación (**Figura 11**, * $p < 0.0088$). En contraste, la concentración de GH en el suero de los ratones con dieta deficiente de biotina se mantuvo constante como en los ratones de los grupos control y suficiente durante 12 semanas y aumentó solamente a las 16 y 20 semanas cuando fue de 322 ± 115 y 224 ± 56 ng GH/ml respectivamente (**Figura 10**, * $p < 0.00001$).

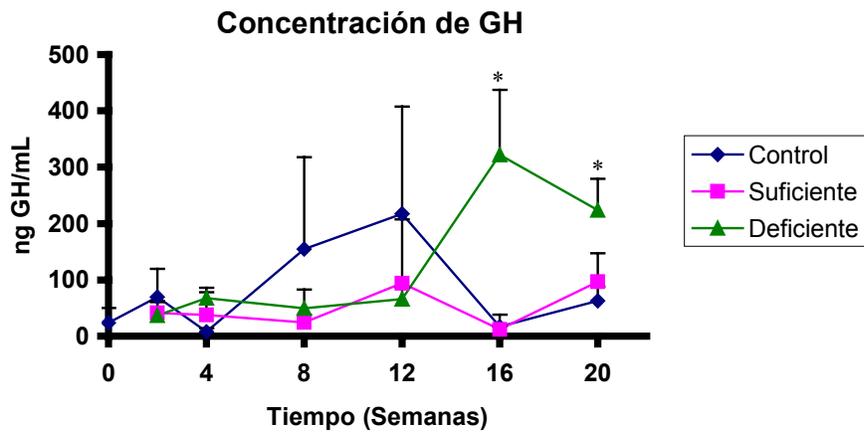


Figura 10. Concentración de GH (\pm SD) de ratones BALB/cAnN machos con dietas control (\blacklozenge), suficiente de biotina (\blacksquare), y deficiente de biotina (\blacktriangle). * $p < 0.00001$

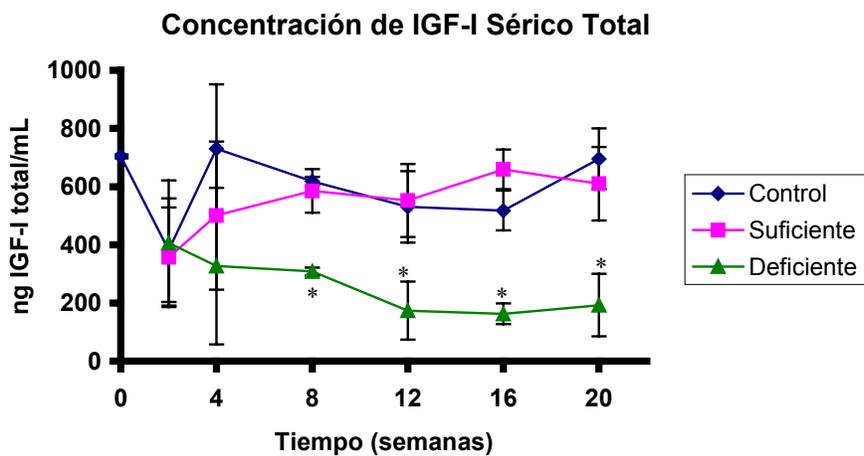


Figura 11. Concentración de IGF-I (\pm SD) de ratones BALB/cAnN machos alimentados con las dietas control (\blacklozenge), suficiente de biotina (\blacksquare), y deficiente de biotina (\blacktriangle). * $p < 0.0088$

Inspección del Estado Funcional de Biotina.- Se analizaron las actividades específicas de las enzimas PCC y PC en hígados de ratones de cada grupo en todos los tiempos de estudio con el fin de revisar el estado funcional de la biotina. Durante las 20 semanas, la actividad específica de PCC en los ratones alimentados con las dietas control y suficiente fue 11930 ± 6554 pmol CO₂ fijado/min x mg proteína y de PC fue de 36355 ± 17859 de pmol CO₂ fijado/min x mg proteína. Mientras que en los hígados analizados de los ratones deficientes de biotina de 2 a 20 semanas la actividad específica de PCC fue 3528 ± 1092 de pmol CO₂ fijado/min x mg proteína y de PC 13623 ± 9067 de pmol CO₂ fijado/min x mg proteína. Estos resultados concuerdan con los previamente reportados (2, 4), además que confirman que los ratones alimentados con la dieta depletante de biotina tienen un estado funcional de biotina significativamente menor que los alimentados con dietas control y suficiente (*p< 0.001; **Tabla 1**).

Tabla 1 Actividad específica de las carboxilasas PCC y PC (pmol CO₂ fijado/min x mg proteína)

	Control y Suficiente	Deficiente
Carboxilasas	Promedio ± D.E.	Promedio ± D.E.
PCC	11930 ± 6554	3528 ± 1092
PC	36355 ± 17859	13623 ± 9067

Para todos los parámetros analizados en este trabajo, no se encontraron diferencias significativas entre los ratones alimentados con las dietas control y suficiente de biotina; mientras que los ratones deficientes de biotina sí las tuvieron con estos dos grupos.

Además de lo anterior todos los ratones con dieta deficiente de biotina mostraron, a partir de la quinta semana de experimentación, edema palpebral y pérdida del brillo corneal por daño epitelial, así como 2 a 3 de cada 6 ratones presentaron alopecia en la porción dorsal a partir de la sexta semana.

8. Discusión

En este trabajo se demuestra que la deficiencia de biotina en los ratones causa alteraciones en el crecimiento corporal (peso y largo) y en el hígado y timo y que estos efectos son más rápidos cuando la edad inicial de los ratones es de 3 semanas en lugar de 4. Esta modificación fue diseñada para acortar los tiempos de aparición de los efectos observados y como se esperaba, fue muy redituable ya que se acortaron desde 2 hasta 8 semanas éstos y otros efectos descritos (2, 4).

Recapitulando brevemente los resultados aquí presentados, a las 4 semanas de estudio los ratones alimentados con la dieta deficiente de biotina mostraron disminuciones significativas en el peso corporal, largo nariz-ancas y del fémur; peso del hígado y del timo; celularidad del timo y concentración sérica de glucosa, mientras que las disminuciones en el peso del fémur, actividad de biotinidasa en el suero y concentración sérica de IGF-I se presentaron a partir de las 8 semanas de experimentación y el aumento en la concentración de GH sérica hasta las 16 semanas.

Además de ser un tema muy amplio y complejo, el crecimiento es un aspecto fundamental del desarrollo. El tamaño corporal alcanzado por el crecimiento está predominantemente controlado genéticamente a través de mecanismos generales (en muchos tejidos) y locales (órgano o tejido específicos) que actúan positiva o negativamente. Los factores de crecimiento y las hormonas son las moléculas de señalización que determinan el desarrollo y el crecimiento postnatal.

Entre los factores de crecimiento que afectan el desarrollo del organismo se encuentran la GH y el IGF-I. En el ratón se conocen 6 mutaciones clásicas de la GH o sus reguladores y todas ellas producen enanismo. Estas mutaciones son: miniature (*mn*), diminutive (*dm*), pygmy (*pg*), y los ratones enanos deficientes de GH Snell (*dwarf*, *dw*)/Jackson (*dw^j*), Ames (*df*) y little (*lit*). Por otra parte, los ratones knockout para el IGF-I crecen menos que los silvestres y a los 2 meses de edad tienen aproximadamente el 30% del peso normal y el desarrollo del hueso está disminuido (17).

Ciertos microorganismos y células en cultivo no pueden crecer en medio sin biotina (19). Las ratas, cerdos, pollos (19) y ratones (2, 4), pierden peso cuando son alimentados con dietas deficientes de biotina y si la deficiencia es crónica, el crecimiento se anula (2,4). Sin embargo, hasta ahora, el mecanismo por el cual la biotina produce este efecto no ha sido estudiado.

En este trabajo la GH sérica en los ratones deficientes de biotina se mantuvo dentro de los niveles de los ratones de los grupos control y suficiente y además, en la fase crónica, la deficiencia de biotina produjo un aumento en la concentración de esta hormona (Figura 10). Opuestamente, la concentración de glucosa disminuyó en el grupo deficiente de biotina (Figura 8). En los mamíferos se conoce una asociación inversa entre la hipoglucemia y la GH sérica, aunque el mecanismo que la produce no se conoce bien (18, 55). Este mecanismo parece estar alterado en la deficiencia de biotina, puesto que la respuesta de la GH a la hipoglucemia no se observó simultáneamente.

Muchas de las acciones somatogénicas de la GH se llevan a cabo a través del IGF-I que es liberado subsecuentemente en respuesta a esta hormona (26). La administración sistémica de GH estimula el crecimiento longitudinal del hueso y del músculo esquelético, mientras que el tratamiento con IGF-I aumenta el tamaño de tejidos linfoides (bazo y timo) y riñón (32). En el hígado y en los tejidos periféricos como el hueso, cartílago y músculo al unirse la GH a su receptor, se produce IGF-I en donde actúa de manera autocrina/paracrina. La respuesta del IGF-I hepático a la GH parece estar alterada en los ratones deficientes de biotina, ya que a pesar de tener concentraciones séricas normales de GH (Figura 10), el crecimiento corporal (Figura 1) y del hígado (Figura 5) están afectados en estos ratones, lo que sugiere que otros componentes del sistema GH-IGF-I también podrían estar alterados.

El hígado es el tejido que contiene la mayor cantidad de biotina y carboxilasas (19) y también produce el 75% del IGF-I en circulación (26), adicionalmente es muy sensible a la deficiencia de biotina ya que las actividades específicas de las carboxilasas se reducen 70% desde las 4 semanas de alimentación deficiente de biotina (2, 4 y el presente trabajo). Las concentraciones circulantes de IGF-I están disminuidas en los ratones deficientes de biotina

(Figura 11) y aunque es probable que esta reducción se deba a disfunciones del hígado por la deficiencia de la biotina, se deben diseñar otros estudios que permitan corroborar esta hipótesis.

Como se mencionó anteriormente en Antecedentes (1.7 y 1.8), la restricción alimenticia de proteínas y calorías afecta la producción de GH e IGF-I por el organismo (51). En este trabajo mostramos que la deficiencia de biotina causa una rápida disminución (50 al 60%) en la concentración circulante de IGF-I (Figura 11). Esta disminución en IGF-I no es concomitante a la reducción en la producción de GH, ya que esta última no disminuye y además aumenta desde las 16 semanas de experimentación en tanto que la disminución de IGF-I se observa a partir de las 8 semanas. Teniendo en cuenta que en este estudio los ratones fueron alimentados *ad libitum* y que la dieta deficiente de biotina contiene el 150% de proteína que en la dieta control tradicional (4), estos hallazgos sugieren que la disminución en la producción del IGF-I se produce por un mecanismo diferente al aporte proteico, mecanismo que en las condiciones de deficiencia de biotina tampoco responde a la GH.

Por otra parte, las reducciones en el peso corporal, largo nariz-ancas y largo y peso del fémur en los ratones deficientes de biotina, no se pueden correlacionar con la disminución del IGF-I sérico, ya que los ratones LID con sólo el 25% del IGF-I sérico se desarrollan normalmente aún en ausencia de la producción del IGF-I hepático (60). Más bien, todas estas características de los ratones deficientes de biotina además de la baja concentración de glucosa sérica y la alta concentración de GH circulante, son las mismas que están descritas tanto en los ratones dobles mutantes IGF-IKO y ALSKO (61) como en los dobles mutantes LID+GHa (62). Los dobles mutantes IGF-IKO y ALSKO tuvieron además de estas características, niveles séricos elevados de insulina (61), mientras que los dobles mutantes LID+GHa tuvieron también niveles bajos de insulina y altas concentraciones de grasa corporal y leptina (62), pero estas determinaciones no se efectuaron en este trabajo.

La biotina y el IGF-I también tienen efectos en los órganos linfoides del sistema inmune. La secreción de timulina, proliferación de TEC y adhesión de timocitos a TEC son moduladas por el IGF-I, además de que los timocitos y TEC producen y expresan IGF-I (48). Adicionalmente, el tratamiento *in vivo* a ratas y ratones con IGF-I tiene efectos selectivos en los

timocitos inmaduros dobles negativos CD4⁻CD8⁻ y revierte parcialmente la involución del timo por envejecimiento (21, 36, 10, 31). La rápida involución del timo que se observa en los ratones deficientes de biotina (4 y el presente trabajo), junto con la baja producción de IGF-I aquí reportada sugieren que la biotina participa en la regulación del sistema IGF-I en el timo, aunque para diseccionar el mecanismo preciso es necesario estudiar también con este modelo, a las IGFBPs, los receptores de IGFs (tipo I y II) y proteasas IGFBP-específicas. Desafortunadamente, en el timo de los ratones IGF-I knockout, ni en el de los dobles mutantes IGF-IKO y ALSKO o LID+GHa se han abordado estudios fenotípicos y funcionales de este órgano, ni bioquímicos y moleculares de la biotina. Estas manipulaciones genéticas proporcionarían información valiosa para estos procesos.

Se sabe que la deficiencia congénita de biotinidasa o de holocarboxilasa sintasa en humanos produce DMC (58) y está reportado que la deficiencia de biotina en ratas (19) y ratones (2, 4) produce un fenotipo similar al de la DMC; sin embargo, no se conocen estudios del efecto de la deficiencia experimental de biotina en la actividad de la biotinidasa sérica. Contrario a lo esperado, en esta investigación encontramos que la actividad de biotinidasa en el suero de los ratones deficientes de biotina está aumentada desde las 2 semanas de experimentación. Aunque parece lógico que la deficiencia de biotina ejerza una regulación positiva en la actividad de la biotinidasa sérica para asegurar el reciclamiento de la biotina en el organismo, este es el primer trabajo que explora esta posibilidad y, como para otros efectos descritos anteriormente, se necesita profundizar en el estudio de los mecanismos involucrados en este hallazgo.

Conclusión

Los estudios anatómicos y bioquímicos de este trabajo sugieren que las afectaciones en el desarrollo corporal y en el crecimiento de hígado y timo involucran la alteración en la homeostasis del eje GH-IGF-I, aunque se deben estudiar con más detalle los otros componentes del sistema IGF-I.

Apéndices

Apéndice 1: Soluciones

1) PBS 1X pH 7.4

NaH₂PO₄ Anhidro 1.9 mM
Na₂HPO₄ Anhidro 8.1 mM
NaCl 154 mM
Disolver en 900 ml de H₂O
Ajustar pH con NaOH 1M o HCl 1M
Aforar con H₂O a 1 litro
Almacenar a 6°C

2) PBS*

Preparar 950 ml de PBS 1x
Agregar 50 ml de Suero Fetal Bovino
Ajustar pH a 7.4
Aforar a 1 litro con H₂O
Filtrar con membrana 0.45 µm
Almacenar a 6°C

3) Solución Hemolizante

KHCO₃ 10 mM
NH₄Cl 155 mM

4) Amortiguador de Lisis pH 8.0

Tris 50 mM
EDTA 0.025 mM

5) Estándar de Glucosa

Glucosa 1 mg/ml en H₂O

6) o-Toluidina

9% v/v o-Toluidina
0.5% m/v Thiourea en Ácido Acético Glacial

7) Sustrato Artificial para la Biotinidasa Sérica

Sal de sodio del ácido biotínico 4-amido benzoico 1 mM
KBP 100 mM

8) Amortiguador KBP pH 6.0

KBP 100 mM
EDTA 10 mM
DTT 2mM

9) PABA

Ácido 4-amidobenzoico 1 mM en H₂O

10) TCA

TCA al 30% en H₂O

11) Nitrito de Sodio 1.6 mg/ml en H₂O

12) Sulfamato de Amonio 8 mg/ml en H₂O

13) HNED Clorhidrato de N-1-naftil etilendiamina 1.6 mg/ml en H₂O

Apéndice 2: Cantidades de los componentes en las dietas proporcionadas a los ratones

Dieta Control LM-485	g/kg	Dieta Deficiente de biotina	g/kg
Proteínas ¹	199.20	Sólidos de clara de huevo seca	300.0
Extracto libre de Nitrogeno ¹	536.6	Dextrosa, monohidratada ²	537.344
Grasa ¹	56.7	Aceite de maíz	100.0
Fibra ¹	43.7	Celulosa	20.0
Ácido linoleico ¹	29.0	Mezcla mineral, AIN-76 ()170915	35.0
Cenizas ¹	64.8	Fosfato de calcio, dibásico	3.41
Minerales ³	26.468	Vitamina B-12 (0.1% triturada en manitol)	0.03
Calcio	9.8	Pantotenato de calcio	0.066
Biotina	0.00077	Citrato de colina dihidrogenada	3.497
Cianocobalamina	0.009	Ácido fólico	0.002
Ácido pantoténico	0.087	Menadiona	0.05
Colina	2.23	Niacina	0.099
Ácido fólico	0.0067	Piridoxina HCl	0.022
Menadiona	0.0084	Riboflavina	0.022
Niacina	0.1001	Tiamina HCl	0.022
Piridoxina HCl	0.0169	Palmitato de trans-retinol (palmitato de vitamina A seca 500,000 U/g)	0.04
Riboflavina	0.0137	Colecalciferol (vitamina D-3 seca 500,000 U/g)	0.004
Tiamina HCl	0.0953	Acetato de 2-ambo- α -tocoferol (acetato de vitamina E seca 500 U/g)	0.242
Trans-retinol (vitamina A)	0.059	Color (soluble)	0.15
Colecalciferol (vitamina D-3)	0.0048		
2-ambo- α -tocoferol (vitamina E)	0.0229		

1 Composición de nutrientes indicada por Harlan Teklad.

2 En la dieta suficiente de biotina (TD.01362), 0.004 g dextrosa/kg fueron sustituidos con 0.004 g (16.4 μ mol) de biotina.

3 Minerales (g/kg): fósforo: 6.6; sodio: 3.2; cloro: 5.4; potasio: 8.3; magnesio: 2.5; hierro: 0.28411; manganeso: 0.09334; zinc: 0.06359; cobre: 0.02306; yodo: 0.00261; cobalto: 0.00072; selenio: 0.00016.

Apéndice 3: Tablas con promedios y desviaciones estándar de las gráficas

Cuadro 1 Peso Corporal (g)

Tiempo (Semanas)	Control		Suficiente		Deficiente	
	Promedio \pm D.E.	n	Promedio \pm D.E.	n	Promedio \pm D.E.	n
0	12 \pm 1.5	43	12 \pm 1.7	47	13 \pm 1.5	40
1	16 \pm 1.9	37	13 \pm 1.8	46	14 \pm 1.7	40
2	19 \pm 1.6	37	16 \pm 2.0	45	16 \pm 1.5	40
3	20 \pm 1.7	31	18 \pm 2.2	39	16 \pm 1.7	34
4	21 \pm 1.9	31	19 \pm 2.2	38	17 \pm 1.9	34
5	22 \pm 1.9	25	21 \pm 1.8	28	17 \pm 2.0	28
6	22 \pm 1.9	25	21 \pm 2.0	28	18 \pm 1.9	28
7	22 \pm 1.9	25	22 \pm 2.2	28	18 \pm 2.2	28
8	23 \pm 2.0	25	23 \pm 2.3	28	17 \pm 2.5	28
9	24 \pm 2.6	19	23 \pm 2.8	22	18 \pm 2.0	21
10	25 \pm 2.4	19	24 \pm 2.7	22	18 \pm 2.1	21
11	25 \pm 2.5	19	24 \pm 2.5	22	18 \pm 2.6	21
12	25 \pm 2.6	19	24 \pm 2.6	22	17 \pm 2.4	20
13	26 \pm 2.5	13	25 \pm 3.2	15	18 \pm 1.7	14
14	26 \pm 2.7	13	25 \pm 3.2	15	17 \pm 1.4	14
15	27 \pm 3.0	13	26 \pm 3.3	15	17 \pm 1.6	14
16	27 \pm 3.3	13	25 \pm 3.1	15	16 \pm 1.2	14
17	26 \pm 3.8	6	23 \pm 3.4	8	15 \pm 0.8	7
18	26 \pm 3.5	6	23 \pm 4.3	8	15 \pm 0.7	7
19	26 \pm 2.9	6	23 \pm 3.5	8	15 \pm 0.8	6
20	24 \pm 1.3	3	21 \pm 1.1	5	14 \pm 0.5	5

Cuadro 2 Largo Nariz-Ancas (cm)

Tiempo (Semanas)	Control		Suficiente		Deficiente	
	Promedio \pm D.E.	n	Promedio \pm D.E.	n	Promedio \pm D.E.	n
0	7.6 \pm 0.3	8				
2	8.6 \pm 0.2	6	8.4 \pm 0.2	6	8.3 \pm 0.3	6
4	8.9 \pm 0.1	6	9.0 \pm 0.5	8	8.6 \pm 0.5	6
8	9.6 \pm 0.2	6	9.7 \pm 0.1	6	8.9 \pm 0.3	6
12	9.6 \pm 0.1	6	9.6 \pm 0.3	7	8.5 \pm 0.4	6
16	9.9 \pm 0.2	7	9.9 \pm 0.1	7	8.9 \pm 0.3	7
20	9.7 \pm 0.4	6	9.9 \pm 0.3	8	8.7 \pm 0.3	5

Cuadro 3 Longitud del Fémur (cm.)

Tiempo (Semanas)	Control		Suficiente		Deficiente	
	Promedio \pm D.E.	n	Promedio \pm D.E.	n	Promedio \pm D.E.	n
0	1,10 \pm 0,05	8				
2	1,22 \pm 0,12	6	1,18 \pm 0,10	6	1,20 \pm 0,11	6
4	1,33 \pm 0,05	6	1,36 \pm 0,05	8	1,25 \pm 0,06	6
8	1,45 \pm 0,06	6	1,43 \pm 0,05	6	1,35 \pm 0,06	6
12	1,46 \pm 0,08	6	1,48 \pm 0,07	7	1,35 \pm 0,08	6
16	1,59 \pm 0,04	7	1,57 \pm 0,08	7	1,40 \pm 0,08	7
20	1,55 \pm 0,07	6	1,56 \pm 0,05	8	1,42 \pm 0,06	5

Cuadro 4 Peso del Fémur (mg)

Tiempo (Semanas)	Control		Suficiente		Deficiente	
	Promedio \pm D.E.	n	Promedio \pm D.E.	n	Promedio \pm D.E.	n
0	27 \pm 4.1	8				
2	40 \pm 3.8	6	36 \pm 3.6	6	38 \pm 2.2	6
4	47 \pm 4.7	6	43 \pm 6.0	8	44 \pm 5.2	6
8	54 \pm 5.5	6	54 \pm 1.8	6	45 \pm 1.9	6
12	51 \pm 2.9	6	53 \pm 3.2	7	43 \pm 4.5	6
16	60 \pm 4.2	7	61 \pm 2.9	7	48 \pm 4.3	7
20	60 \pm 7.0	6	59 \pm 4.6	8	46 \pm 1.7	5

Cuadro 5 Peso del Hígado (mg)

Tiempo Semanas	Control		Suficiente		Deficiente	
	Promedio \pm D.E.	n	Promedio \pm D.E.	n	Promedio \pm D.E.	n
0	596 \pm 92	8				
2	747 \pm 111	6	676 \pm 56	6	643 \pm 125	6
4	840 \pm 55	6	808 \pm 122	8	659 \pm 226	6
8	1018 \pm 75	6	1108 \pm 161	6	712 \pm 63	6
12	1137 \pm 85	6	1126 \pm 88	7	557 \pm 68	6
16	1133 \pm 83	7	1161 \pm 137	7	561 \pm 73	7
20	1050 \pm 109	6	970 \pm 164	8	497 \pm 29	5

Cuadro 6 Peso del Timo (mg)

Tiempo (Semanas)	Control		Suficiente		Deficiente	
	Promedio \pm D.E.	n	Promedio \pm D.E.	n	Promedio \pm D.E.	n
0	76 \pm 12	8				
2	70 \pm 16	6	59 \pm 21	6	59 \pm 12	6
4	52 \pm 4.6	6	47 \pm 13	8	40 \pm 21	6
8	56 \pm 9.4	6	59 \pm 19	6	30 \pm 7.0	6
12	39 \pm 3.8	6	45 \pm 7.5	7	15 \pm 5.5	6
16	52 \pm 4.6	7	42 \pm 9.9	7	8,7 \pm 3.5	7
20	44 \pm 16.8	6	57 \pm 17	8	19 \pm 7.5	5

Cuadro 7 Celularidad del Timo x10⁶ células

Tiempo (Semanas)	Control		Suficiente		Deficiente	
	Promedio \pm D.E.	n	Promedio \pm D.E.	n	Promedio \pm D.E.	n
0	268 \pm 16	3				
2	248 \pm 80	6	220 \pm 81	6	219 \pm 44	6
4	106 \pm 15	3	131 \pm 48	4	38 \pm 32	3
8	139 \pm 33	6	126 \pm 25	6	76 \pm 22	6
12	110 \pm 41	6	125 \pm 34	7	20 \pm 7.9	6
16	128 \pm 18	7	124 \pm 24	7	17 \pm 14	7
20	62 \pm 45	6	53 \pm 11	8	7,8 \pm 2.0	5

Cuadro 8 Concentración de glucosa sérica (mg glucosa/100 mL)

Tiempo (Semanas)	Control		Suficiente		Deficiente	
	Promedio \pm D.E.	n	Promedio \pm D.E.	n	Promedio \pm D.E.	n
0	129 \pm 27	8				
2	84 \pm 25	6	60 \pm 12	6	84 \pm 19	6
4	118 \pm 13	6	143 \pm 41	8	44 \pm 34	6
8	144 \pm 27	6	134 \pm 39	5	80 \pm 16	6
12	121 \pm 20	6	125 \pm 27	7	38 \pm 14	6
16	124 \pm 12	7	136 \pm 36	7	57 \pm 26	7
20	113 \pm 28	6	127 \pm 33	8	24 \pm 24	5

Cuadro 9 Actividad específica de la Biotinidasa (nmol producto formado/ml x min)

Tiempo (Semanas)	Control		Suficiente		Deficiente	
	Promedio \pm D.E.	n	Promedio \pm D.E.	n	Promedio \pm D.E.	n
0	5.5 \pm 1.3	8				
2	5.7 \pm 1.5	6	6.6 \pm 1.0	6	7.7 \pm 1.1	6
4	7.7 \pm 1.8	6	6.1 \pm 1.8	8	6.3 \pm 1.2	6
8	5.1 \pm 1.3	6	6.4 \pm 0.6	5	8.2 \pm 1.3	6
12	4.1 \pm 1.4	6	5.7 \pm 1.3	7	6.7 \pm 1.9	6
16	5.4 \pm 0.8	7	6.2 \pm 0.8	7	7.1 \pm 2.1	7
20	5.1 \pm 1.4	6	6.5 \pm 1.3	8	4.9 \pm 1.6	5

Cuadro 10 Concentración de GH sérico (ng GH/ml)

Tiempo (Semanas)	Control		Suficiente		Deficiente	
	Promedio \pm D.E.	n	Promedio \pm D.E.	n	Promedio \pm D.E.	n
0	24 \pm 26	4				
2	70 \pm 50	3	42 \pm 19	3	37 \pm 25	6
4	8.2 \pm 6.1	4	38 \pm 40	5	67 \pm 19	5
8	155 \pm 163	6	24 \pm 14	5	49 \pm 34	8
12	217 \pm 190	6	94 \pm 114	9	66 \pm 21	6
16	17 \pm 21	4	12 \pm 6.4	5	322 \pm 115	5
20	63 \pm 26	8	97 \pm 51	9	224 \pm 56	5

Cuadro 11 Concentración de IGF-I sérico total (ng IGF-I total/ml)

Tiempo (Semanas)	Control		Suficiente		Deficiente	
	Promedio \pm D.E.	n	Promedio \pm D.E.	n	Promedio \pm D.E.	n
0	704	2				
2	381 \pm 178	4	357 \pm 171	5	406 \pm 215	6
4	731 \pm 221	4	501 \pm 254	5	327 \pm 269	5
8	619 \pm 15	2	585 \pm 75	2	308 \pm 14	3
12	531 \pm 123	5	553 \pm 126	7	174 \pm 100	4
16	518 \pm 68	3	659 \pm 68	4	163 \pm 36	3
20	696 \pm 104	4	610 \pm 126	5	193 \pm 108	3

Apéndice 4: Valores normales de glucosa sérica

Glucosa serica: 62-175 mg/100 ml

Wolfenson S., Lloyd M., *Handbook of laboratory animal management and welfare*, Oxford University Press Inc., New York, U.S.A., 1994, Chapter 8, Biological data, página 11

Glucosa serica: 106-278 mg/100 ml

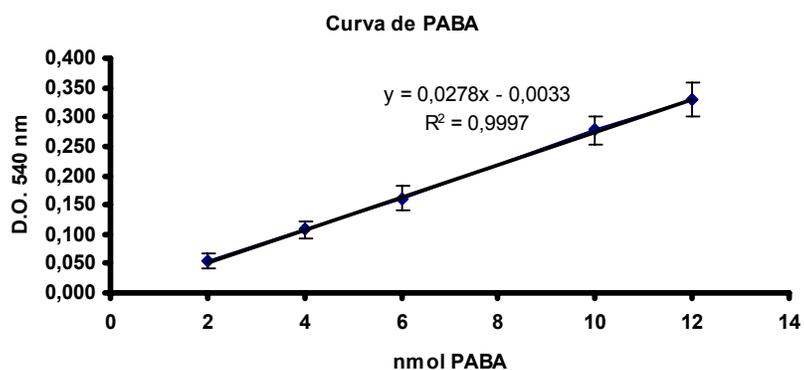
Suckow MA, Danneman P, Brayron C. Eds., *The Laboratory Mouse*, CRC Press, 2001, Boca Raton, Florida, Chapter 1 Important biological features, página 9

Apéndice 5: Curvas estándar promedio de los ensayos de Biotinidasa y o-Toluidina

Ensayos de Biotinidasa

nmol PABA	D.O. Promedio \pm Dev Est	%C.V.	n
2	0.054 \pm 0.012	22.7	17
4	0.107 \pm 0.016	14.6	17
6	0.161 \pm 0.021	12.9	17
10	0.277 \pm 0.025	8.9	17
12	0.329 \pm 0.029	8.8	17

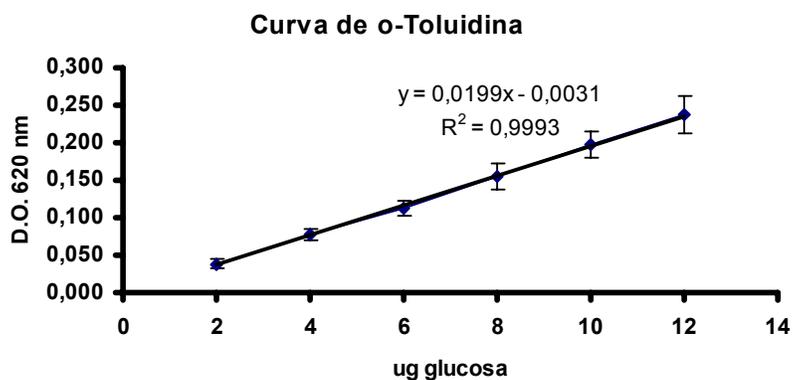
Blanco 0.042 \pm 0.016 %c.v. 39.5 n = 18



Ensayos de Glucosa

ug glucosa	D.O. Neta Promedio \pm Dev Est	% C.V.	n
2	0.038 \pm 0.006	15.2	10
4	0.077 \pm 0.008	10.2	10
6	0.113 \pm 0.010	9.0	9
8	0.155 \pm 0.018	11.5	9
10	0.198 \pm 0.017	8.6	18
12	0.237 \pm 0.025	10.7	10

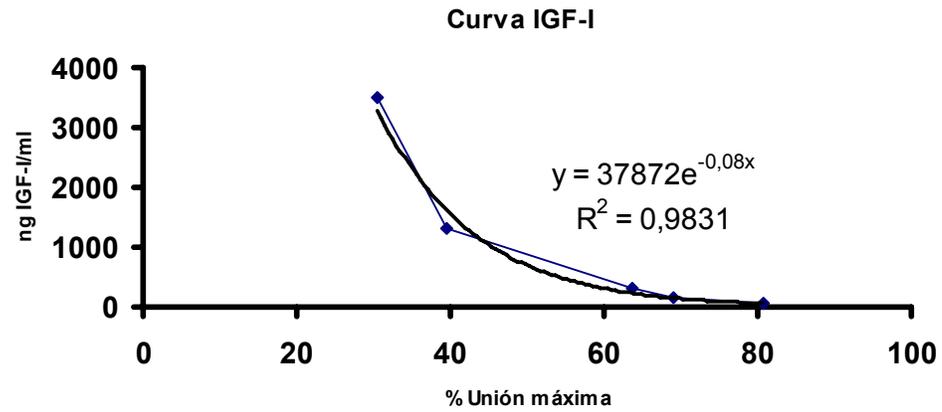
Blanco 0.039 \pm 0.013 %c.v. 33.9 n = 18



Apéndice 6: Ejemplos de curvas estándar de los ensayos de IGF-I y GH

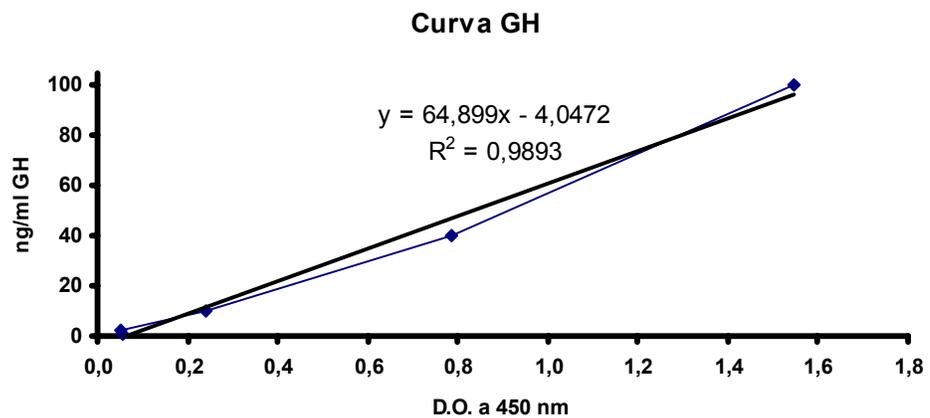
Ensayo IGF-I

Estándar	D.O. Prom	% Unión Max	ng IGF-I/ml
A	1,141	100	0
B	0,921	80,7	50
C	0,787	69,0	150
D	0,726	63,6	325
E	0,450	39,4	1300
F	0,349	30,6	3500



Ensayo GH

Estándar	D.O. Prom	ng GH/ml
A	0.0865	0
B	0.055	1
C	0.050	2,5
D	0.240	10
E	0.785	40
F	1.549	100



Referencias

- 1 Al-Regaiey K.A., Masternak M.M., Bonkowski M., Sun L., Bartke A., Long-lived growth hormone receptor knockout mice: interaction of reduced insulin-like growth factor I/Insulin signaling and caloric restriction. *Endocr* 2005;146:851-860
- 2 Baez-Saldaña A., Diaz G., Espinoza B., Ortega E., Biotin deficiency induces changes in subpopulations of spleen lymphocytes in mice. *Am J Clin Nutr* 1998; 67:431-7
- 3 Baez-Saldaña A., Zendejas-Ruiz I., Revilla-Monsalve C., Islas-Andrade S., Cárdenas A., Rojas-Ochoa A., Vilches A., Fernandez-Mejia C., Effects of biotin on pyruvate carboxylase, acetyl-CoA carboxylase, propionyl-CoA carboxylase, and markers for glucose and lipid homeostasis in type 2 diabetic patients and nondiabetic subjects. *Am J Clin Nutr* 2004; 79:238-43
- 4 Baez-Saldaña A., Ortega-Soto E., Biotin deficiency blocks thymocyte maturation, accelerates thymus involution, and decreases nose-rump length in mice. *J Nutr* 2004; 179 (8): 1970-77
- 5 Bain, S.D., Newbrey, J.W., Watkins, B.A., Biotin deficiency may alter tibiotarsal bone growth and modeling in broiler chicks. *Poult Sci* 1988; 67: 590-595
- 6 Balnave, D., Clinical symptoms of biotin deficiency in animals. *Am J Clin Nutr.* 1977; 30: 1408-1413
- 7 Bradford M.M., 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
- 8 Burri B.J., Sweetman L., Nyhan W.L., Heterogeneity of holocarboxylase synthetase in patients with biotin-responsive multiple carboxylase deficiency. *Am J Hum Genet* 1985;37:326-37
- 9 Chauhan J., Dakshinamurti K., Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats. *J Biol Chem* 1991;266:10035-8
- 10 Clark R., The somatogenic hormones and insulin-like growth factor-1: Stimulators of lymphopoiesis and immune function. *Endocr Rev* 1997; 18:157-79
- 11 Coggeshall J.C., Heggens J.P., Robson M.C., Baker H., Biotin status and plasma glucose levels in diabetics. *Ann NY Acad Sci* 1985; 447:389-92
- 12 Dakshinamurti K., Modi V.V., Mistry S.P., Biotin deficiency produces hyperglycemia. *Proc Soc Exp Biol Med* 1968; 127:396-400
- 13 Dakshinamurti K., Terrago-Litvak L., Hong H.C., Biotin and glucose metabolism. *Can J Biochem* 1970; 48: 493-500
- 14 Dakshinamurti K., Li W., Transcriptional regulation of the liver phosphoenolpyruvate carboxykinase by biotin in diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 1994;132:127-32
- 15 Deodhar A.D., Mistry S.P., Regulation of glycolysis in biotin-deficient rat liver. *Life Sci* 1970;9:581-588

- 16 Dorshkind K., Horseman N.D., The Roles of Prolactin, Growth Hormone, Insulin-Like Growth Factor-I, and Thyroid Hormones in Lymphocyte Development and Function: Insights from Genetic Models of Hormone and Hormone Receptor Deficiency. *Endocr Rev* 2000; 21(3):292-312
- 17 Efstratiadis A. Genetics of mouse growth. *Int. J. Dev. Biol.* 1998;42:955-976
- 18 Fanjul M.L., Hiriart M., Fernández de Miguel F., 1998, *Biología Funcional de los Animales*, Facultad de Ciencias U.N.A.M./Siglo Veintiuno Editores, México, 581 pp.
- 19 Friedrich W., Biotin. In: *Vitamins*. Berlin: Walter de Gruyter, 1988:753-805
- 20 Gagnerault M.C., Postel-Vinay M.C., Dardenne M., Expression of Growth Hormone Receptors in Murine Lymphoid Cells Analyzed by Flow Cytometry. *Endocr* 1996; 137(5): 1719-26
- 21 García-Suárez O., Pérez-Pérez M., Germanà A., Esteban I., Germanà G., Involvement of Growth Factors in Thymic Involution. *Microsc Res Tech* 2003;62:514-523
- 22 Grimberg A., Cohen P., Role of insulin-like growth factors and their binding proteins in growth control and carcinogenesis. *J Cell Physiol* 2000;183:1-9
- 23 Gompertz D., Draffman G.H., Watts J.L., Hull D., Biotin-responsive β -methylcrotonylglycinuria. *Lancet* 1971; 2:22
- 24 Gompertz D., Bartlett K., Blair D., Stern C.M.M., Child with a defect in leucine metabolism associated with beta hidroxyisovaleric aciduria and beta-methylcrotonylglycinuria. *Arch Dis Child* 1973; 48:975
- 25 Henry R.J., Cannon D.C., Winkelman J.W., 1974, *Clinical Chemistry: Principles and Technics*, Second Edition, Harper & Row, Publishers, Inc. Hagerstown, Maryland, pages. 1285-1287
- 26 Jones J.I., Clemmons D.R., Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 1995; 16: 3-34
- 27 Kelly P.A., Finidori J., Moulin S., Kedzia C., Binart N. Growth Hormone Receptor Signalling and Actions in Bone Growth. *Horm Res* 2001;55(suppl 2):14-17
- 28 Koustikos D., Fourtounas C., Kapetanaki A., et. al., Oral glucose test after high-dose i.v. biotin administration in normoglycemic hemodialysis patients. *Ren Fail* 1996;18:131-7
- 29 Landenberger A., Kabil H., Harshman L.G., Zempleni J., Biotin deficiency decreases life span and fertility but increases stress resistance in *Drosophila melanogaster*. *J Nutr Biochem* 2004;15:591-600
- 30 LeRoith D., Werner H., Beitner-Johnson D., Roberts C.T., Molecular and Cellular Aspects of the Insulin-Like Growth Factor I Receptor. *Endocr Rev* 1995; 16:2:143-163
- 31 LeRoith D., Yanowski J., Kaldjian E.P., Jaffe E.S., LeRoith T., Purdue K., Cooper B.D., Pyle R., Adler W., The effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on the immune system of aged female monkeys. *Endocr* 1996;137:1071-1079
- 32 LeRoith D., Bondy C., Yakar S., Liu J., Butler A., The Somatomedin Hypothesis: 2001. *Endocr Rev* 2001; 22:53-74

- 33 Liu J., Yakar S., LeRoith D., Mice deficient in liver production of insulin-like growth factor I display sexual dimorphism in growth hormone-stimulated postnatal growth. *Endocr* 2000; 141: 4436-4441
- 34 Maebashi M., Makino Y., Furukawa Y., Ohinata K., Kimura S., Takao S., Therapeutic evaluation of the effect of biotin on hyperglycemia in patients with non-insulin diabetes mellitus. *J Clin Biochem Nutr* 1993; 14:211-8
- 35 McMahon R.J., Biotin in metabolism and molecular biology. *Annu Rev Nutr* 2002; 22:221-239
- 36 Montecino-Rodriguez E., Clark R., Dorshkind K., Effects of insulin-like growth factor administration and bone marrow transplantation on thymopoiesis in aged mice. *Endocr* 1998; 139:4120-4126
- 37 Nelson D.L., Cox M.M., Lehninger Principles of Biochemistry, 4th Edition, Worth Publishers, New York, 2005: 242-244, 521
- 38 O'Dell S.D., Day I.N.M., Molecules in focus Insulin-like growth factor II (IGF-II). *Int. J. Bioch. and Cell Biol.* 1998; 30: 767-771
- 39 Parrizas M., Saltiel A.R., LeRoith D., Insulin-like growth factor 1 inhibits apoptosis using the phosphatidylinositol 3'-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem* 1997; 272:154-161
- 40 Petrelli, F., Moretti, P., Campanati, G., Studies on the relationship between biotin and the behavior of B and T lymphocytes in the guinea-pig. *Experientia* 1981; 37: 1204-1206
- 41 Ponce Castañeda M.V., López Casillas F., En: *Biología celular y molecular*, Jiménez García L.F., Merchant Larios H., Ed. Pearson Educación, México, 2003:206-207
- 42 Rabin, B.S., Inhibition of experimentally induced autoimmunity in rats by biotin deficiency. *J. Nutr.* 1983; 113: 2316-2322
- 43 Reddi A., DeAngelis B., Frank O., Lasker N., Baker H., Biotin supplementation improves glucose and insulin tolerances in genetically diabetic KK mice. *Life Sci* 1988; 42:1323-1330
- 44 Renaville R., Hammadi M., Portetelle D., Role of the somatotrophic axis in the mammalian metabolism. *Dom Animal Endocrinol* 2002; 23:351-360
- 45 Romero-Navarro G., Cabrera-Valladares G., German MS., Matschinsky FM., Velazquez A., Wang J., Fernandez-Mejia C., Biotin regulation of pancreatic glucokinase and insulin in primary cultured rat islets in biotin-deficient rats. *Endocr* 1999;140:4595-4600
- 46 Rosen C.J., Serum insulin-like growth factors and insulin-like growth factor-binding proteins: clinical implications. *Clin Chem* 1999; 45:8:1384-1390
- 47 Salvatori R., Growth Hormone and IGF-I. *Revin Endocr & Metabol Disord* 2004;5:15-23
- 48 Savino W, Poste-Vinay M.C., Smaniotta S. y Dardenne M. The thymus gland: a target organ for growth hormone. *Scand. J. Immunol.* 2002;55:442-452

- 49 Sims N.A., Clement-Lacroix P., da Ponte F., Bouali Y., Binart N., Moriggl R., Goffin V., Coschigano K., Gaillard-Kelly M., Kopchick J., Baron R., Kelly P.A., Bone homeostasis in growth hormone receptor-null mice is restored by IGF-I but independent of Stat 5. *J Clin Invest* 2000;106:1095-1103
- 50 Stewart C.E.H., Rotwein P., Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiol Rev* 1996; 76: 1005-1026
- 51 Thissen JP., Ketelslegers JM., Underwood LE., Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocr Rev* 1994; 15:80-101
- 52 Thissen JP., Underwood LE., Ketelslegers JM., Regulation of insulin-like growth factor-I in starvation and injury. *Nutr Rev* 1999;57:167-176
- 53 Voet D., Voet J.G., Pratt C.W., *Fundamentals of Biochemistry Upgrade Edition*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 2001:687-689
- 54 Watkins, B.A., Bain, S.D., Newbrey, J.W., Eicosanoic fatty acid reduction in the tibiotarsus of biotin-deficient chicks. *Calcif Tissue Int.* 1989; 45: 41-46
- 55 Welniak L.A., Sun R., Murphy W.J., The role of growth hormone in T-cell development and reconstitution. *J Leukoc Biol* 2002;71:381-387
- 56 Wiedmann S., Eudy J.D., Zempleni J., Biotin supplementation increases expression of genes encoding interferon- γ , interleukin-1 β , and 3-methylcrotonil-CoA carboxylase, and decreases expression of the gene encoding interleukin-4 in human peripheral blood mononuclear cells. *J Nutr* 2003; 133: 716-719
- 57 Wolf B., Grier R.E., Allen R.J., Goodman S.I., Kien C.L., Biotinidase deficiency: the enzymatic defect in late-onset multiple carboxylase deficiency. *Clin Chim Acta* 1983; Jul 15;131(3):273-281
- 58 Wolf B., Disorders of Biotin Metabolism. In: Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D., editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 7th ed. New York: McGraw-Hill Inc, 1995:3151-77
- 59 Xu X., Mardell C., Xian C.J., Zola H., Read L.C., Expression of functional insulin-like growth factor-1 receptor on lymphoid cell subsets of rats. *Immunology* 1995; 85:394-9
- 60 Yakar S., Liu J.L., Stannard B., Butler A., Accili D., Sauer B., LeRoith D., Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 7324-7329
- 61 Yakar S., Rosen C.J., Beamer W.G., Ackert-Bicknell C.L., Wu Y., Liu J.L., Ooi G.T., Setser J., Frystyk J., Boisclair Y.R., LeRoith D., Circulating levels of IGF-I directly regulate bone growth and density. *J Clin Invest* 2002; 110: 771-781
- 62 Yakar S., Setser J., Zhao H., Stannard B., Haluzik M., Glatt V., Bouxsein ML., Kopchick JJ., LeRoith D., Inhibition of growth hormone action improves insulin sensitivity in liver deficient IGF-I mice. *J Clin Invest* 2004; 113: 96-105